**TITLE** : Genetics Marker for genetic relationship and identification of freshwater pufferfish in Northeast of Thailand

**RESEARCHER** : Assistant professor Dr. Puntivar Kaewmad
Professor Dr.Alongkoad Tanomtong
Assistant Professor Kannikar Thongdonpriang

**Organization** : Major Biology, Faculty of Science and Technology

**ACADEMIC YEAR** : 2018

# ABSTRACT

Cytogenetics of five fish species in the family Tetraodotidae of Thailand was studied. These include *Tetraodon cochinchinensis*, *T. suvattii*, *T. palembangensis*, *T. fluviatilis* and *Dichotomyctere nigroviridis*. Chromosome was prepared from kidney tissues followed by conventional staining and NOR banding techniques. The results showed that the diploid chromosome numbers were 40, 40, 36, 40 and 42, respectively and the fundamental numbers (NF) or chromosome arm were 74, 78, 72, 76 and 80 for male and female, respectively. Sex chromosomes could not be identified. The marker chromosome is NOR-bearing chromosomes which found one chromosome pair in all puffers. NOR locations were on region adjacent to the centromere of short chromosome in *T.cochinchinensis*, *T.suvattii*, *T. palembangensis* and *T. fluviatilis*, respectively while these were on region adjacent to the telomere of short arm chromosome in *D. nigroviridis*. The karyotypic formula composed of metacentrics-submetacentrics-acrocentrics amd telocentrics as follow: 12-10-12-6, 16-22-0-2, 20-16-0-0, 16-12-8-4 and 18-8-12-4, respectively.

The study of genetic diversity of three puffer fish populations using RAPD-PCR analysis, RAPDs generated by 3 primers produced 27 distinguishable and reproducible DNA bands. The average size of the amplified DNA fragments ranged

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

from 100 to 2,000 bp. An UPGMA (unweighted pair groups with arithmetric means) dendrogram clearly showed that three populations could be divided into three groups; *T.cochinchinensis*, *T.suvattii and T. palembangensis*. The genetics relationship shown that *T.cochinchinensis* and *T.suvattii* are more genetically close than *T. palembangensis* and DNA fingerprints can be used to separate the population of fish from two habitat of water clearly.

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

# กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้ได้ศึกษาข้อมูลพื้นฐานด้านพันธุกรรมโดยใช้เครื่องหมายทางพันธุกรรมในการตรวจสอบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม และจัดจำแนกปลาปักเป้าน้ำจืด ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการจำแนกปลาปักเป้าที่พบในธรรมชาติ และยังสามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการปรับปรุงพันธุ์ปลา เพื่อพัฒนาลูกผสมของปลากลุ่มนี้ต่อไป นอกจากนี้ยังได้รับความร่วมมือจากหลายภาคส่วนไม่ว่าจะเป็น อาจารย์ เจ้าหน้าที่ นักศึกษาสาขาวิชาชีววิทยา ทำให้รายงานเล่มนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี และที่สำคัญอย่างยิ่งขอขอบคุณสำนักงานวิจัยแห่งชาติที่ได้ให้ทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน ปี 2560 จึงขอขอบคุณไว้ ณ โอกาสนี้

คณะผู้วิจัย

2561

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

**ชื่อเรื่อง** : การใช้เครื่องหมายทางพันธุกรรมในการตรวจสอบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม และจัดจำแนกปลาปักเป้าน้ำจืด ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย

**ผู้วิจัย** : ผศ.ดร.พันธิวา แก้วมาตย์
ศ.ดร.อลงกลด แทนออมทอง
ผศ.กรรณิการ์ ทองดอนเปรียง

**หน่วยงาน** : สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

**ปีที่แล้วเสร็จ** : 2561

## บทคัดย่อ

การศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ของปลาวงศ์ปลาปักเป้าของประเทศไทย 5 ชนิด ได้แก่ ปลาปักเป้าดำ (*Tetraodon cochinchinensis*) ปลาปักเป้าควาย (*T. suvattii*) ปลาปักเป้าท้องตาข่าย (*T. palembangensis*) ปลาปักเป้าเขียว (*T. fluviatilis*) และปลาปักเป้าเขียวจุด (*Dichotomyctere nigroviridis*) เตรียมโครโมโซมจากเนื้อเยื่อไต ย้อมสีโครโมโซมแบบธรรมดาและแถบสีแบบนอร์ ผลการศึกษาพบว่ามีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ เท่ากับ 40, 40, 36, 40 และ 42 แท่ง ตามลำดับ จำนวนโครโมโซมพื้นฐาน หรือจำนวนแขนของโครโมโซมเท่ากับ 74, 78, 72, 76 และ 80 ตามลำดับ ทั้งในเพศผู้และเพศเมีย ไม่สามารถจำแนกโครโมโซมเพศได้ โครโมโซมเครื่องหมาย คือ โครโมโซมที่มีตำแหน่งนอร์ พบจำนวน 1 คู่ ตำแหน่งนอร์จะอยู่บริเวณตอนปลายของโครโมโซมใกล้เทโลเมียร์หรือเซนโทรเมียร์ โดยในปลาปักเป้าดำ ปลาปักเป้าควาย ปลาปักเป้าท้องตาข่าย และปลาปักเป้าเขียว พบนอร์ที่ตำแหน่งใกล้เซนโทรเมียร์ของโครโมโซม ส่วนปลาปักเป้าเขียวจุดพบนอร์ที่แขนข้างสั้นใกล้ตำแหน่งเทโลเมียร์ของโครโมโซม สูตรแคริโอไทป์ของปลาทั้ง 5 ชนิด ประกอบด้วยโครโมโซมชนิดเมทาเซนทริก-ซับเมทาเซนทริก-อะโครเซน ทริก และเทโลเซนทริก เท่ากับ 12-10-12-6, 16-22-0-2, 20-16-0-0, 16-12-8-4 และ 18-8-12-4 แท่ง ตามลำดับ

เมื่อทำการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค RAPD-PCR ด้วยไพรเมอร์จำนวน 10 ชนิด พบว่ามีจำนวน 3 ไพรเมอร์ สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้ จำนวน 27 แถบ เมื่อนำไปสร้างเดนโดรแกรมที่แสดงความสัมพันธ์จากความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค RAPD-PCR ของปลาปักเป้าทั้ง 3 ชนิด พบว่าความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการที่ได้จาก

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

วิธีการ UPGMA สามารถจัดกลุ่มให้ปลาปักเป้าดำ และปลาปักเป้าควาย มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมมากกว่าปลาปักเป้าเขียว และการใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของปลาปักเป้าสามารถใช้แยกกลุ่มประชากรของปลาที่มาจาก 3 แหล่งน้ำได้อย่างชัดเจน

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

# บทที่ 1
# บทนำ

## 1.1 ความสำคัญและความเป็นมาของปัญหา

ปลาปักเป้า (puffer fish) เป็นปลาปักเป้าเป็นปลาที่พบได้ในน้ำจืดและน้ำทะเล โดยพบได้ทั่วไปในประเทศที่มีอากาศร้อนและอบอุ่น เป็นปลาที่มีพิษในตัวทุกชนิด แม้บริโภคเพียงเล็กน้อยก็อาจถึงแก่ความตายได้ ถึงแม้จะผ่านการปรุงด้วยความร้อนสูงก็ตาม เพราะพิษก็ไม่ได้สลายที่อุณหภูมิสูงดังนั้นผู้จับมาบริโภคจะต้องมีความเชี่ยวชาญและรู้วิธีชำแหละเป็นพิเศษ สำหรับปลาปักเป้าทะเลในประเทศญี่ปุ่น นิยมบริโภคปลาปักเป้าโดยทำเป็นซูชิ จนเป็นอาหารประจำชาติญี่ปุ่นที่ขึ้นชื่อเป็นที่รู้จัก และมีราคาแพง ปลาปักเป้ามีลักษณะพิเศษ เมื่อถูกรบกวนจะพองตัวให้ป่องกลมคล้ายลูกโป่งได้ด้วยการสูบลมเข้ามาในช่องว่างของลำตัวโดยอาศัยลิ้นที่เชื่อมระหว่างคอหอยกับช่องว่างในลำตัวเป็นตัวควบคุม พฤติกรรมนี้มีไว้เพื่อข่มขู่ศัตรู ปลาปักเป้าทั่วโลกมี 3 วงศ์ได้แก่ Diodontidae, Tetraodontidae และ Triodontidae ทั้ง 3 วงศ์นี้มีสมาชิกอยู่ใน 19 สกุล 130 ชนิด พบในทะเลประมาณ 110 ชนิด ในน้ำจืดประมาณ 20 ชนิด (Nelson, 2004; Berra, 2001) ส่วนปักเป้าที่มีรายงานพบในประเทศไทยมีจำนวน 28 ชนิด เป็นปลาน้ำจืด 12 ชนิด (คมกริช หาสิตะพันธุ์, 2555) ปลาปักเป้าเป็นปลาที่สามารถพบได้ทั่วไปในแหล่งน้ำธรรมชาติ ไม่ว่าจะเป็นห้วย หนอง คลอง บึง รวมทั้งตามแม่น้ำสายต่าง ๆ ในบางเวลาที่ชาวบ้านออกไปหาปลามาเพื่อประกอบอาหาร หรือจำหน่ายมักจะมีปลาเหล่านี้ติดมากับอุปกรณ์หาปลาเสมอ และมีชาวบ้านจำนวนไม่น้อยที่นำปลากลุ่มนี้มาบริโภคทั้ง ๆ ที่รู้ว่าเป็นกลุ่มปลาที่มีพิษ เพราะคิดว่ามีกรรมวิธีในการกำจัดพิษออก พิษของปลากลุ่มนี้จะอยู่ตามผิวหนัง เลือด อวัยวะภายใน บางคนเชื่อว่าหากลอกหนังออก ล้างน้ำ เอาวัยวะภายในทิ้งไป ก็สามารถบริโภคเนื้อปลาได้ พิษของปลาปักเป้ามีผลให้เกิดอาการอัมพาตของระบบหายใจ และอาจทำให้เสียชีวิตได้ ดังที่เคยปรากฏเป็นข่าวให้เห็นตามหน้าหนังสือพิมพ์มาแล้ว

สำหรับในภาคอีสานนั้นมีแม่น้ำสายสำคัญ ได้แก่ **1. แม่น้ำมูล** แม่น้ำมูลเป็นแม่น้ำสายใหญ่และมีปริมาณน้ำมากที่สุดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ โดยมีต้นกำหนดมาจากระหว่างเขาวงกับเขาละมั่งในเขตอำเภอปักธงชัย จังหวัดนครราชสีมา ไหลผ่านจังหวัดนครราชสีมา บุรีรัมย์ สุรินทร์ ร้อยเอ็ด ศรีสะเกษ และไหลลงสู่แม่น้ำโขงที่อำเภอโขงเจียม จังหวัดอุบลราชธานี ซึ่งมีความยาวประมาณ 750 กิโลเมตร **2. แม่น้ำชี** เป็นสาขาหนึ่งของแม่น้ำมูล มีต้นกำเนิดจากภูเขาพยาฝ่อในเขตอำเภอเกษตรสมบูรณ์ จังหวัดชัยภูมิ นับเป็นแม่น้ำสายที่ยาวที่สุดในภาค

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ตะวันออกเฉียงเหนือ ซึ่งมีความยาวประมาณ 765 กิโลเมตร หลผ่านจังหวัดชัยภูมิ จังหวัดนครราชสีมา จังหวัดขอนแก่น จังหวัดมหาสารคาม จังหวัดร้อยเอ็ด จังหวัดยโสธร จังหวัดศรีสะเกษ และไหลไปบรรจบกับแม่น้ำมูลที่บ้านวังยาง รอยต่อจังหวัดศรีสะเกษ กับ จังหวัดอุบลราชธานี **3. แม่น้ำโขง** แม่น้ำโขงเป็นแม่น้ำที่มีความยาวและใหญ่สายหนึ่งของทวีปเอเชีย โดยมีต้นกำเนิดจากเทือกเขาสูงในทิเบต ไหลผ่านสาธารณรัฐประชาชนจีน และเป็นเส้นกั้นเขตแดนระหว่างไทยกับลาว ซึ่งมีบริเวณที่ไหลผ่านประเทศไทยในภาคตะวันออกฉียงเหนือยาวประมาณ 800 กิโลเมตร ผ่านจังหวัดเลย หนองคาย กับ บึงกาฬ นครพนม มุกดาหาร อำนาจเจริญ และอุบลราชธานี ซึ่งแม่น้ำทั้ง 5 สายนี้มีบทบาทต่อความเป็นอยู่ของประชาชนโดยรอบ การแพร่กระจายของพันธุ์ปลาในแหล่งน้ำเหล่านี้ย่อมมีความแตกต่างกันตามสภาพภูมิศาสตร์ การใช้ข้อมูลทางพันธุกรรมสามารถใช้เพื่อหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม การหาลักษณะเฉพาะทางเซลล์พันธุศาสตร์ และการใช้ข้อมูลในการช่วยจำแนกชนิดของเนื้อปลาได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ เป็นเครื่องมือที่สามารถช่วยผู้ประกอบการร้านค้า และหน่วยงานสาธารณสุขต่าง ๆ ประเมินผลกระทบหรือ ผลเสียที่เกิดจากการได้รับพิษจากสัตว์น้ำโดยเฉพาะในกลุ่มของปลาปักเป้าที่มีอยู่ในแหล่งน้ำต่าง ๆ ดังที่ได้กล่าวมาข้างต้นแล้วว่าประชาชนบางกลุ่มก็นำเนื้อมาเพื่อบริโภค

การศึกษาในครั้งนี้นอกจากจะใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกในการจำแนกปลาปักเป้าน้ำจืดแล้ว ยังได้นำความรู้ทางด้านพันธุศาสตร์เซลล์ซึ่งสามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานทางด้านการจัดจำแนก และข้อมูลพื้นฐานทางด้านการปรับปรุงพันธุ์ได้ เนื่องจากปลาปักเป้าในปัจจุบันนี้เริ่มได้รับความนิยมในการเลี้ยงเพื่อพัฒนาเป็นปลาสวยงาม ส่วนการศึกษาทางด้านอณูพันธุศาสตร์ มีบทบาทสำคัญในการพัฒนาสายพันธุ์ และหาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตที่อยู่ในสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกันได้ จากการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิค Random amplified polymorphic DNA (RAPDs) (Williams et al., 1990), เทคนิค Simple sequence repeats (SSR) หรือ เทคนิค microsatellites (Tautz, 1989), เทคนิค Amplified fragment length polymorphism (AFLP) (Vos et al., 1995) และเทคนิค Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) (Bornet et al., 2001) และเครื่องมือทางอณูพันธุศาสตร์ชนิดดีเอ็นเอบาร์โค้ดถือว่าเป็นเครื่องมือที่มีความน่าเชื่อถือ และแม่นยำในการจัดจำแนก ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมในใช้ในการจำแนกสิ่งมีชีวิตในปัจจุบัน ผู้วิจัยคาดว่าการวิจัยในครั้งนี้จะเป็นข้อมูลที่สำคัญในการพัฒนาระบบที่ใช้จัดจำแนกกลุ่มปลาปักเป้า ข้อมูลทางด้านพันธุศาสตร์เซลล์ และพันธุศาสตร์โมเลกุลสามารถนำไปวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของปลาปักเป้าที่อยู่ต่างสภาพภูมิศาสตร์กัน และสามารถบ่งบอกร่องรอยของวิวัฒนาการในกลุ่มปลาปักเป้าด้วย

มหาวิทยาลัยมหาสารคาม MAHASARAKHAM UNIVERSITY

## 1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อศึกษาสัณฐานวิทยาภายนอกของปลาปักเป้าน้ำจืดที่พบในแหล่งน้ำสายหลักในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย
2. เพื่อศึกษาเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่ได้จากการศึกษาโครโมโซมของปลาปักเป้าน้ำจืด และสร้างคาริโอไทป์มาตรฐานของปลาปักเป้าน้ำจืด
3. เพื่อศึกษาเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่สร้างจากเทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ดของปลาปักเป้าน้ำจืด
4. เพื่อศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมโดยใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของปลาปักเป้าน้ำจืดที่พบในแหล่งน้ำในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย

## 1.3 ขอบเขตการวิจัย

1. สำรวจลักษณะสัณฐานวิทยาของปลาปักเป้าน้ำจืดในแม่น้ำสายหลักในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 4 สายคือ แม่น้ำมูล แม่น้ำชี แม่น้ำสงคราม และแม่น้ำโขง

2. การเตรียมโครโมโซมโดยวิธีการเตรียมโดยตรงจากเนื้อเยื่อไตของปลาปักเป้าน้ำจืด ชนิดละ 10 ตัว คัดเลือกเซลล์ในระยะเมทาเฟส 1 เซลล์ ที่กระจายตัวดี มาสร้างคาริโอไทป์มาตรฐาน

3. การสร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอจากเทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ด โดยใช้ยีน COI เพื่อนำมาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทป์ที่มีความจำเพาะของปลาปักเป้าน้ำจืด

4. ศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของปลาปักเป้าน้ำจืดในแต่ละพื้นที่โดยการใช้ข้อมูลทางพันธุกรรมจากการใช้เทคนิค RAPD หรือ ISSR

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

## 1.4 ทฤษฎี สมมุติฐาน (ถ้ามี) และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

ปลาปักเป้าน้ำจืดสามารถพบเห็นได้ทั่วไปตามแหล่งน้ำธรรมชาติ จากการที่มีลักษณะพิเศษสามารถพองตัวได้เมื่อมีศัตรูเข้ามาใกล้ ทำให้เป็นที่สังเกตได้ง่าย ไม่นิยมนำมาประกอบอาหารเนื่องจากตามชิ้นส่วนต่าง ๆ ของร่างการมีพิษ แต่ยังมีชาวบ้านบางกลุ่มที่นิยม และมีความคิดที่พิษว่าสามารถกำจัดพิษของปลากลุ่มนี้ได้ และนำมาประกอบอาหาร แม้ในปัจจุบันจะมีการรายงานข่าวของคนที่บริโภคปลาปักเป้าแล้วเสียชีวิตน้อยลง แต่ยังยังพอมีปรากฏในข่าวบ้าง ปลากลุ่มนี้ไม่นิยมจับขึ้นมาจากแหล่งน้ำ แต่ในการทำการประมงก็มีติดมากับอุปกรณ์จับปลาบ้าง จากรูปร่างทรงกลม และลวดลายที่สวยงามของปลาปักเป้าบ้างชนิดนั้น ได้รับความ

นิยมเลี้ยงเป็นปลาสวยงามเช่น ปักเป้าจุด ซึ่งการศึกษาครั้งนี้นอกจากจะศึกษาสัณฐานวิทยาภายนอกเพื่อใช้ในการจำแนกอย่างง่ายแล้ว ยังศึกษาข้อมูลทางด้านพันธุกรรมเพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับนักปรับปรุงพันธุ์ และหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของปลาปักเป้าน้ำจืดที่อยู่ต่างแหล่งน้ำ และใช้ข้อมูลทางด้านพันธุศาสตร์โมเลกุลในการระบุชนิด เพื่อนักวิจัยสามารถนำไปใช้ในการจำแนกชิ้นเนื้อของปลากลุ่มนี้ที่อาจจะติดมากับผลิตภัณฑ์จากเนื้อปลาในอาหารอื่น ๆ ต่อไปได้

การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกของปลาปลาปักเป้าน้ำจืดที่พบในแหล่งน้ำสายหลักในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย

↓

การศึกษาเซลล์พันธุศาสตร์ และคาริโอไทป์มารตฐานของปลาปักเป้าน้ำจืดที่พบในแหล่งน้ำสายหลักในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย

↓

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

การสร้างเครื่องหมายทางพันธุกรรมเพื่อใช้ในการจำแนกปลาปักเป้าน้ำจืดที่พบในแหล่งน้ำสายหลักในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย

↓

การศึกษาความสัมพันธ์ของปลาปักเป้าน้ำจืดที่พบในแหล่งน้ำสายหลักในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย 3 สายคือ แม่น้ำมูล แม่น้ำชี และแม่น้ำโขง

## 1.5 ประโยชน์ที่ได้รับ

1 ทราบข้อมูลทางด้านสัณฐานวิทยาภายนอกของปลาปักเป้าที่อยู่ในแม่น้ำสายหลักในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เพื่อใช้ในการจัดจำแนกเบื้องต้น

2. ทราบเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่ได้จากการศึกษาโครโมโซมของปลาปักเป้า และได้คาริโอไทป์มาตรฐานของปลาในสกุลปลาเนื้ออ่อนแท้

3. ได้ข้อมูลทางพันธุกรรมที่สามารถใช้ในการระบุชนิดของปลาปักเป้าน้ำจืดด้วยเครื่องหมายทางพันธุกรรมแบบบาร์โค้ด

4. สามารถสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอเพื่อใช้ในการตรวจสอบปลาปักเป้าที่มาจากแม่น้ำสายหลักของภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

# บทที่ 2
# ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

## 2.1 แม่น้ำที่สำคัญในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

ภาคตะวันออกเฉียงเหนืออยู่ในบริเวณที่ราบสูง ซึ่งเป็นบริเวณภายในที่ไม่มีทางติดต่อกับทะเล มีแต่เทือกเขาล้อมรอบ และมีสภาพคล้ายแอ่งกระทะ ที่เทลาดจากที่สูงทางตะวันตก ลงสู่ที่ลุ่มต่ำทางด้านตะวันออก ที่มีแม่น้ำโขงเป็นขอบเขต ทางตะวันตกมีเทือกเขาเพชรบูรณ์ และดงพระยาเย็นกั้นออกจากที่ราบลุ่มเขมรต่ำ ส่วนทางด้านตะวันออก แม้ว่าจะมีลำแม่น้ำโขงกั้นเขตออกจากประเทศลาว ก็มีทิวเขาภูพานกั้นเป็นขอบชั้นใน ตัดออกจากบริเวณจังหวัดมุกดาหารผ่านจังหวัดกาฬสินธุ์ และสกลนคร ไปยังอุดรธานี ทำให้บริเวณที่ราบสูงของภาคตะวันออกเฉียงเหนือแบ่งออกเป็น 2 แอ่งใหญ่ คือ แอ่งสกลนครทางเหนือ มีลำน้ำสายเล็กหลายสาย เช่น แม่น้ำสงคราม และแม่น้ำก่ำ ไหลผ่านไปออกแม่น้ำโขง ส่วนอีกแอ่งหนึ่งคือ แอ่งโคราชอยู่ทางใต้ มีแม่น้ำมูล และแม่น้ำชี

บริเวณแอ่งสกลนคร เป็นบริเวณที่ราบอยู่ระกว่างทางด้านเหนือของเทือกเขาภูพานกับแม่น้ำโขง เรียกอีกชื่อหนึ่งว่า “อีสานเหนือ” ลำน้ำส่วนใหญ่ไหลจากเขตที่สูงของทิวเขาภูพานไปยังด้านทิศเหนือ และด้านทิศตะวันออกเฉียงเหนือแล้วไหลลงสู่แม่น้ำโขง เช่น ลำน้ำโมง ลำน้ำห้วยหลง ลำน้ำก่ำ ลำน้ำพุง ลำน้ำเลย ลำน้ำเหือง ฯลฯ ลำน้ำสำคัญของแอ่งกลนครคือ “ลำน้ำสงคราม” ส่วนบริเวณแอ่งโคราช เป็นบริเวณที่ราบลุ่มแม่น้ำมูลและแม่น้ำชี อยู่ทางทิศใต้ของเทือกเขาภูพานเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า “อีสานใต้” มีพื้นที่ขนาดใหญ่กว่าพื้นที่แอ่งสกลนครครอบคลุมพื้นที่ประมาณ 3 ใน 4 ของภาคตะวันออกเฉียงเหนือทั้งหมด นับว่าเป็นที่ราบที่มีพื้นที่กว้างขวางมากที่สุดของประเทศไทย มีความสูงเฉลี่ยประมาณ 120-170 เมตร จากระดับน้ำทะเลปานกลาง ลำน้ำสำคัญของแอ่งโคราช คือ “ลำน้ำชี” และ “ลำน้ำมูล”

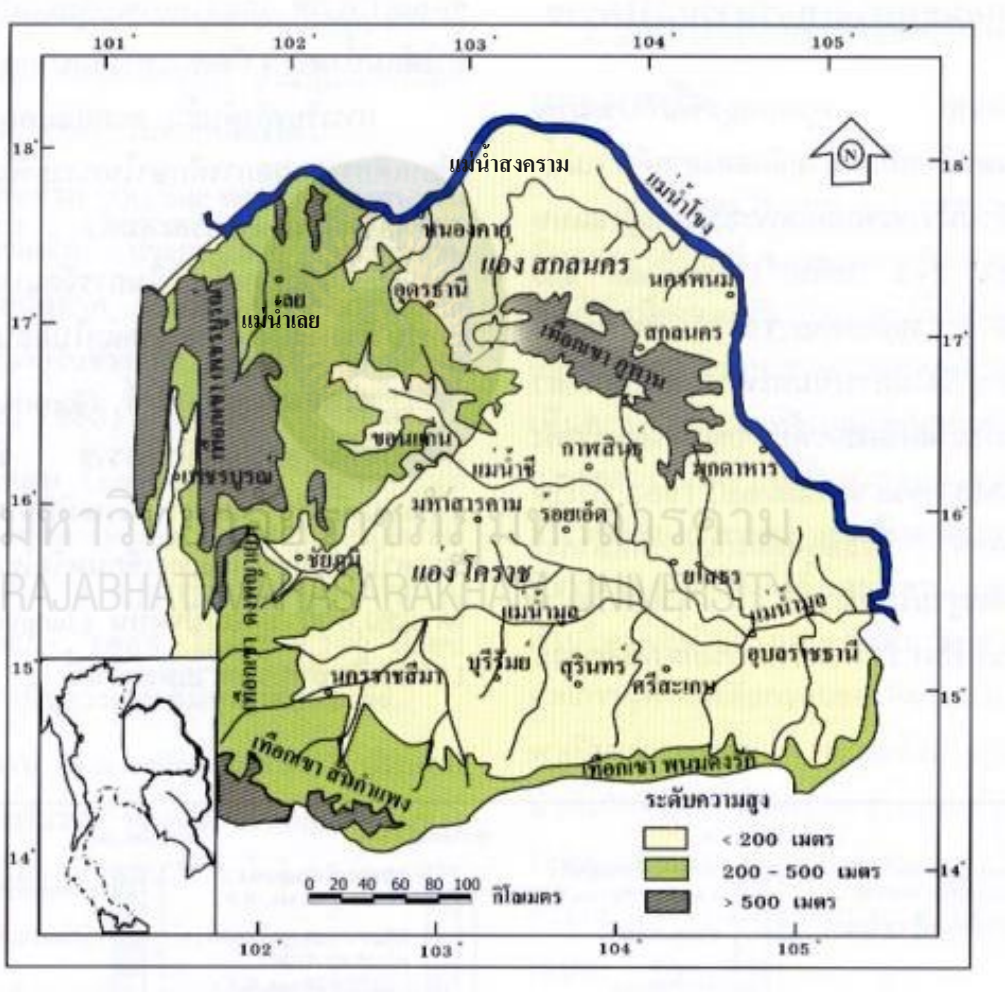
แม่น้ำที่สำคัญในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่แม่น้ำโขง แม่น้ำมูล แม่น้ำชี

**แม่น้ำโขง** เป็นแม่น้ำที่มีต้นกำเนดจากดินแดนของธิเบต ซึ่งเป็นพรมแดนของประเทศไทยกับลาวทางตะวันออกของประเทศเป็นแม่ที่มีสาขาที่เกิดจากแม่น้ำในประเทศหลายสายทั้งภาคเหนือและภาค ตะวนออกเฉียงเหนือได้แก่แม่น้ำมูลแม่น้ำชีและแม่น้ำสงครามประชนในประเทศไทยได้อาศัยแม่น้ำโขงใช้ประโยชน์ต่อการดำรงชีวิตมานาน

มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนครศรีอยุธยา
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

**แม่น้ำมูล** เกิดจากเทือกเขาสันกำแพงในเขตอำเภอปักธงชัย จังหวัดนครราชสีมาผ่านจังหวัดร้อยเอ็ดกับอุบลราชธานี ออกสู่แม่น้ำโขงที่อำเภอบ้านด่าน จังหวัดอุบลราชธานีในช่วงฤดูร้อนน้ำตื้น ฤดูฝนน้ำจะเอ่อท่วมที่ราบริมฝั่งแม่น้ำ ซึ่งเป็นประโยชน์แก่การทำนา แม่น้ำนี้ยาว 641 กิโลเมตร

**แม่น้ำชี** เป็นสาขาหนึ่งของแม่น้ำมูล มีต้นกำเนิดจากภูเขาพยาฝ่อในเขตอำเภอเกษตรสมบูรณ์ จังหวัดชัยภูมิ นับเป็นแม่น้ำสายที่ยาวที่สุดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ซึ่งมีความยาวประมาณ 765 กิโลเมตร ไหลผ่านพื้นที่ของจังหวัดขอนแก่น มหาสารคาม (เวชพล อ่อนละมัย, 2550)




ภาพที่ 2.1 แม่น้ำที่สำคัญในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

ที่มา: สถาบันรักษาความร่วมมือระหว่างประเทศแห่งมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์, 2557

**2.2 ระบบการจำแนกปลาในปัจจุบัน**

การแบ่งชั้นปลาที่มีในปัจจุบัน

ในการศึกษาอนุกรมวิธานของปลานี้จะใช้ระบบของเบิร์ก (Berg, 1940) เป็นหลักซึ่งได้จำแนกปลาทั้งที่มีชีวิตอยู่ในปัจจุบันและสูญพันธุ์ไปแล้ว 12 class ดังนี้

Phylum Vertebrata

Subphylum Acraniata

Class 1 Amphioxi ได้แก่แอมฟิออกซัส

Subphylum Craniata

Class 2 Cephalaspides สูญพันธุ์หมดแล้ว

Class 3 Petromyzontes ได้แก่ปลาปากกลม สกุล *Petromyzon*

Class 4 Pteraspides สูญพันธุ์หมดแล้ว

Class 5 Myxini ได้แก่ปลาปากกลม สกุล *Myxine*

Class 6 Pterichthyes สูญพันธุ์หมดแล้ว

Class 7 Coccostei สูญพันธุ์หมดแล้ว

Class 8 Acanthodii สูญพันธุ์หมดแล้ว

Class 9 Elasmobranchii ได้แก่พวกปลากระดูกอ่อน

Class 10 Holocephali ได้แก่ปลากระต่าย (rat fish)

Class 11 Dipnoi ได้แก่ปลาปอด

Class 12 Teleostomi ได้แก่ปลากระดูกแข็งทั่วไป

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ตามระบบของเบิร์ก ปลาที่ยังมีชีวิตอยู่ในปัจจุบันมี 6 Class ดังนี้

1. Class Petromyzontes

Order Petromyzontiformes

Family Petromyzontidae ได้แก่ ปลาแลมเพรย์ (Petromyzon)

2. Class Myxini

Order Myxiniformes

Family Myxinidae ได้แก่ ปลาแฮกพิช (Myxine)

3. Class Elasmobranchii ได้แก่ปลากระดูกอ่อน

Order Lamniformes ได้แก่ ปลาฉลามชนิดต่าง ๆ

Order Squliformes ได้แก่ปลาฉลามที่มีเงี่ยงที่ครีบหลัง

Order Rajiformes ได้แก่ปลากระเบนชนิดต่าง ๆ

Order Torpediniformes ได้แก่ปลากระเบนไฟฟ้า

4. Class Holocephali

Order Chimaeriformes

Family Chimaeridae ได้แก่ ปลากระต่าย (Chimaera)

5. Class Dipnoi

Order Ceratodiformes ได้แก่ ปลาปอดออสเตรเลีย

Order Lepidosireniformes ได้แก่ ปลาปอดแอฟริกัน และอเมริกาใต้

6. Class Teleostomi ได้แก่ ปลากระดูกแข็งทั้งหมด

Subclass Crossopterygii ได้แก่ พวกครีบคู่มีเกล็ดปกคลุม (lobe fins)

Order Coelacanthiformes ได้แก่ ปลาซีลาแค้นธ์ (coelacanth)

Suborder Actinopterigii ได้แก่ พวกครีบมีก้านครีบ (ray fins)

อันดับต่างๆ ของปลาพวกมีก้านครีบ เช่น

Order Polypteriformes ได้แก่ ปลา paddle fish

Order Acipenceriformes ได้แก่ ปลาสเตอร์เจียน

Order Amiiformes ได้แก่ ปลา Amia

Order Lepidosteiformes ได้แก่ ปลาการ์ (gar)

Order Clupeiformes ได้แก่ ปลาหลังเขียว

ฯลฯ

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

สำหรับการจัดจำแนกของแลกเลอร์ และคณะ (1962) ได้แบ่งปลาที่มีชีวิตอยู่ในปัจจุบันเป็น 3 Class คือ

**1. Class Agnatha** เป็นพวกปากไม่มีขากรรไกร ได้รวมเอาปลาปากกลมใน Class Petromyzon และ Myxini ไว้ด้วยกัน ต้นตระกูลเดิมของปลาประเภทนี้คือ คือ ออสตราโคเดิร์ม ( Ostracoderm)ซึ่งสูญพันธ์ไปแล้วในปัจจุบัน ฟอสซิลที่ถูกค้นพบครั้งล่าสุด พบว่า มีอายุกว่า 500 ล้านปีมาแล้ว และฟอสซิลที่ถูกค้นพบนั้นมีความสลับซับซ้อนมาก จึงเป็นที่น่าคาดการได้ว่า ออสตราโคเดิร์ม เก่าแก่มาก และน่าจะสูญพันธุ์ไปหมดแล้ว ปลาไม่มีขากรรไกร จัดว่าเป็นปลากระดูกอ่อน ซึ่งปลาประเภทนี้ ที่มีทั้งสิ้น 60 ชนิด แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ Petromyzontes และ Myxini ในปัจจุบัน กลุ่ม Petromyzontes มีเหลืออยู่เพียงประเภทเดียว คือ ปลาแลมป์เพรย์ (Lamprey) ส่วน Myxini ก็เหลือเพียงประเภทเดียวเช่นกัน คือ แฮคฟีช (Hagfish) ซึ่งปลาทั้ง 2 ประเภทที่เหลือนี้ เป็นปลาที่มีลำตัวคล้ายปลาไหล ทั้งสิ้น

- แลมป์เพรย์ (Lamprey) มีลำตัวยาวลักษณะคล้ายปลาไหล ลำตัวด้านหลังมักจะเป็นสีดำ มีครีบหลังและครีบหาง แต่ไม่มีครีบคู่ ไม่มีเกล็ด ปากจะอยู่ค่อนลงมาทางด้านท้อง มีลักษณะคล้ายแว่นใช้สำหรับดูด มีฟันเจริญดีอยู่ในอุ้งปาก รูจมูกมี 1 รูซึ่งอยู่กึ่งกลางด้านบนของหัว มีตา 1 คู่ ถุงเหงือก 7 ถุง และมีช่องเหงือก 7 ช่อง หัวใจประกอบด้วยเวนตริเคิล 1 ห้อง และเอเตรียม 1 ห้อง โครงร่างเป็นกระดูกอ่อนและเส้นใย และยังคงมีโนโตคอร์ดอยู่ เส้นประสาทหลัง มีการพัฒนาเป็นสมองซึ่งมีเส้นประสาทสมอง 8 - 10 คู่ ทางเดินอาหารไม่มีกระเพาะอาหาร ส่วนลำไส้บิดเป็นเกลียว มีลักษณะเพศแยก และระยะเวลาที่เป็นตัวอ่อนใช้เวลานานหลายปี

- แฮคฟีช (hagfish) เป็นปลาไม่มีขากรรไกรที่อาศัยอยู่ในทะเล โดยการกินปลาตาย หรือใกล้ตายรวมทั้งสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังที่มีลำตัวอ่อนนุ่ม กลุ่มหนอนปล้อง มอลลัสและครัสเตเชียน ดังนั้น แฮคฟีช จึงไม่เป็นปาราสิต และไม่ได้เป็นสัตว์ล่าเหยื่อ แต่ค่อนมาทางกินซากสัตว์มากว่า แฮคฟีชมีประมาณ 32 ชนิด ชนิดที่รู้จักกันดีในอเมริกาเหนือ ในมหาสมุทรแอตแลนติก คือ Myxine glutinosa และ แฮคฟีชในมหาสมุทรแปซิฟิค คือ Eptatretus stonti

แฮคฟีชกินปลาตายหรือปลาใกล้ตายโดยการกัดไชเข้าไปทางทวารหรือถุงเหงือก แล้วกินส่วนของตัวปลาที่อ่อนนุ่มเหลือไว้แต่หนังและกระดูก นอกจากนี้แอคฟีชยังกินปลาที่ชนแหอวนลอยอยู่ ทำความเสียหายให้แก่ชาวประมง แต่หลังจากมีการประมงโดยใช้อวนลากขนาดใหญ่ที่มีประสิทธิภาพสูง จึงเป็นปัญหาทำให้แฮคฟีชลดลง

**2. Class Chondrichthyes** เป็นพวกปลากระดูกอ่อน ได้รวมเอาปลาใน Class Elasmobrachii และ Holocephali เข้าด้วยกัน ปลากระดูกอ่อนที่มีชีวิตประมาณ 625 ชนิด แม้ว่าปลากระดูกอ่อนจะมีชนิดและการแพร่กระจายน้อยกว่าปลากระดูกแข็ง แต่การพัฒนาอวัยวะรับความรู้สึกที่ดีการที่มีขากรรไกรและกล้ามเนื้อที่แข็งแรงจึงทำให้เป็นผู้ล่าเหยื่อ (predator)ที่มีประสิทธิภาพดีกว่าปลากระดูกแข็ง ลักษณะเด่นอีกประการหนึ่งของปลากระดูกอ่อนคือ การมีโครงร่างที่เป็นกระดูกอ่อน (cartilaginous - skeleton)และเป็นที่น่าสนใจ คือ ปลากระดูกอ่อนพัฒนาเปลี่ยนแปลงมาจากบรรพบุรุษที่เป็นปลากระดูกแข็ง

ปลาฉลาม ปลากระเบน (rays, skates: Elasmobranchii) เป็นสัตว์ทะเลทั้งหมดยกเว้นฉลามน้ำจืด 3-4 ชนิด นอกจากปลาวาฬซึ่งเป็นสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมแล้ว ปลาฉลามจัดเป็นสัตว์ที่มีกระดูกสันหลังที่มีขนาดใหญ่ที่สุด ปลาฉลามวาฬ (whale shark) มีลำตัวยาว 15 เมตร ปลาฉลามหมู (dog fish shark) มีลำตัวยาวไม่เกิน 1 เมตร ลักษณะทั่วไปของปลากลุ่ม elasmobranches คือ ลำตัวเป็นรูปกระสวย (ยกเว้นกระเบนและสเกตต์) มีครีบหางเป็นแบบเฮทเทอโรเซอคัล ปากอยู่ทางด้านท้อง มีขากรรไกร และมีถุงรับกลิ่น (olfactory sac) 1 คู่ เป็นถุงเปิดออกภายนอกคือ รูจมูก (nostril) แต่ไม่เชื่อมกับอุ้งปาก ผิวหนังมีเกล็ดแบบพลาคอย

มหาวิทยาลัยมหาสารคาม MAHASARAKHAM UNIVERSITY

(placoid) และต่อมเมือกกระจายอยู่ ฟันเปลี่ยนแปลงมาจากเกล็ด โครงร่างเป็นกระดูกอ่อนทั้งหมด ทางเดินอาหารประกอบด้วยกระเพาะรูปตัว j และลำไส้มีลิ้นวนเป็นเกลียว ระบบหมุนเวียนประกอบด้วยหัวใจ มี 2 ห้อง และเส้นเลือดแดงหลายคู่มีเหงือก 5-7 คู่ แยกกันเปิดออกภายนอกทางช่องเหงือก ไม่มีแผ่นปิดเหงือก (operculum) และไม่มีถุงลม สมองประกอบด้วยโอลแฟคทอรี่โลบ ซีรีบรัม ออฟติคโลบ ซีรีเบลลัม และเมดูลา ออบลองดาตา อย่างละ 1 คู่ และมีเส้นประสาทสมอง 10 คู่ เพศแยกและปฏิสนธิภายใน วางไข่ (oviparous) หรือออกลูกเป็นตัวหรือฟักออกจากไข่ทันทีที่วางไข่ (ovovivipararaous)

**3. Class Osteichthyes** ได้แก่ ปลากระดูกแข็งทั้งหมด และปลาปอด เป็นสัตว์ที่มีการปรับตัวและแพร่กระจายออกไปในวงกว้าง มีการปรับตัวเพื่อสามารถอยู่ในน้ำได้ทุกสภาพ ลำตัวมีหลายแบบ รูปรางอาจเพรียวและมีการปรับตัวเพื่อลดแรงเสียดทานต่อน้ำ พวกที่ล่าเหยื่อกับปลาที่ลอยตัวตามน้ำจะมีลำตัวยาวและหางที่แข็งแรง และมีกลไกลอื่นๆ ที่ช่วยในการว่ายน้ำได้ดี สำหรับพวกที่กินอาหารอยู่ตามท้องน้ำจะมีลำตัวแบนสำหรับการเคลื่อนที่ไปตามพื้นน้ำ จะเห็นว่าปลาไหลปรับตัวให้ลำตัวยาว เพื่อให้ฝังตัวลงไปในโคลน หรือเข้าไปอยู่ตามรูหรือโพลงเล็กๆ ได้ ปลาบางชนิด เช่น ปลาจิ้มฟันจระเข้ มีลักษณะคล้ายแส้ทำให้เข้าใจผิดว่า เป็นสายของอัลจีที่เคลื่อนไหวตามกระแสคลื่นในทะเล รูปร่างแบบอื่นๆ จะเป็นการปรับตัวเพื่อพรางตัวหลบหนีจากศัตรูหรือพรางตัวเพื่อล่อเหยื่อ ปลากระดูกแข็งมีลักษณะแตกต่างที่ชัดเจนแบ่งเป็น 3 ประเภทใหญ่ๆ คือ

- Crossopterygii ( ปลาโลบฟินน์ ) หรือปลาที่มีขา ปัจจุบันมีเหลือเพียงชนิดเดียว คือ ปลาซีลาแคนท์ แต่เดิมคาดว่าสูญพันธ์ไปแล้ว แต่มีผู้จับได้อีก ในค.ศ.1983 ซึ่งอยู่ในทะเลลึกมาก

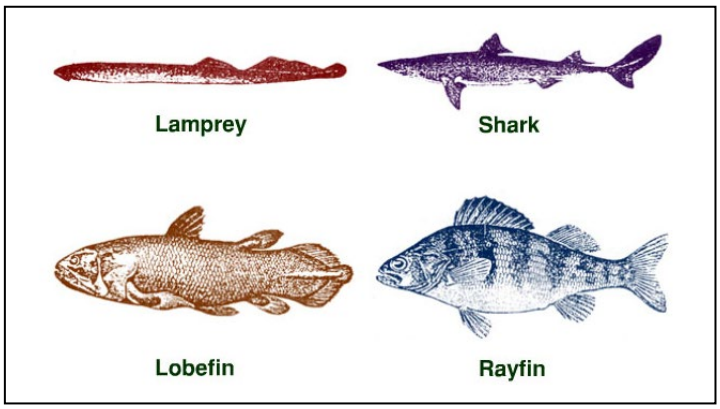
- Dipneusti (ปลามีปอด) เป็นกลุ่มปลาโบราณคงเหลืออยู่เพียงสกุล ไดแก่ สกุล *Neoceratodus* ในออสเตรเลีย สกุล *Protopteus* ในแอฟริกา และสกุล *Lepidosiren* ในอเมริกาใต้ซึ่งปอดที่มีอยู่เป็นประโยชน์มากในการเอาชีวิตรอดของปลาเหล่านี้

- Actinopterygii (ปลาที่มีก้านครีบ) คือปลากลุ่มใหญ่ซึ่งรวมเอาปลากระดูกแข็งทุกชนิดเอาไว้ บรรพบุรุษจะมีขนาดเล็ก มีเกราะหุ้มตัวหนา มีปอดและเหงือก

**การจำแนกปลากระดูกอ่อนและปลากระดูกแข็ง**

การศึกษาอนุกรมวิธานนี้เพื่อต้องการให้ทราบการจำแนกพวกปลากระดูกอ่อนในชั้น (Class) Elasmobranchii และปลากระดูกแข็ง Class Teleostomi เฉพาะที่พบในประเทศไทยและน่านน้ำใกล้เคียง ถึงอันดับ (Order) วงศ์ (Family) และชนิดของปลา โดยใน Class Elasmobranchii พบ 4 อันดับ 12 วงศ์ 65 ชนิด และในชั้น Teleostomi พบ 25 อันดับ ตั้งแต่

Clupeiformes ไปจนถึงอันดับ Pegasiformes ประมาณ 135 วงศ์ ไม่ต่ำกว่า 1,500 ชนิด รวมทั้งในน้ำจืดและน้ำเค็ม

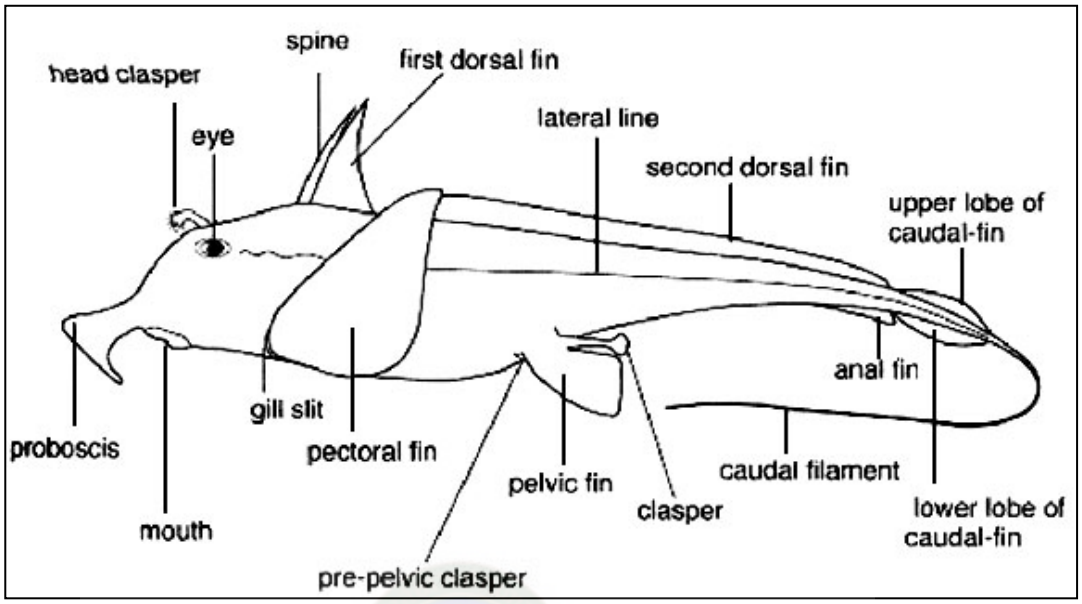



ภาพที่ 2.2 แสดงกลุ่มปลาที่มีชีวิตอยู่ในปัจจุบัน
ที่มา: http://courseware.rmutl.ac.th/courses/107/data/pict1402.htm

ตารางที่ 2.1 ความแตกต่างระหว่างปลากระดูกอ่อนและปลากระดูกแข็ง

| ปลากระดูกอ่อน | ปลากระดูกแข็ง |
|---|---|
| 1. โครงสร้างเป็นกระดูกอ่อน มีแคลเซียมสะสมอยู่ (calcified skeleton) ไม่มีเนื้อเยื่อของกระดูก (bone tissues) | 1. โครงกระดูก เกิดจากการสะสมของเซลล์กระดูก (ossified bone) |
| 2. กระดูกหัวไม่มีร่อง | 2. กระดูกหัวมีร่อง ประกอบด้วยกระดูกเป็นแผ่นแข็ง |
| 3. เหงือกมีเยื่อกั้น ทำให้มีช่องเปิดเหงือก 5 - 7 คู่ ไม่มีกระดูกปิดเหงือก | 3. เหงือกไม่มีเยื่อกั้น มีช่องเปิดเหงือก 1 คู่ มีกระดูกปิดเหงือก |
| 4. เพศผู้มี คลาสเปอร์ | 4. ไม่มีคลาสเปอร์ |
| 5. ไม่มีกระเพาะลม | 5. ส่วนมากมีกระเพาะลม บางชนิดมีปอด |
| 6. มีทวารร่วม ซึ่งเป็นช่องเปิดร่วมของทวารและช่องสืบพันธุ์ | 6. ไม่มีทวารร่วม มีช่องเปิดของทวาร และช่องสืบพันธุ์แยกกัน |
| 7. ลำไส้สั้น มีลักษณะเป็นบันไดเวียนหรือแบบม้วนเสื่อ | 7. ลำไส้เป็นแบบธรรมดา |

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY




ภาพที่ 2.3 ลักษณะภายนอกของปลากระดูกอ่อน
ที่มา: John A. Musick (2005)

การจำแนกชนิดของปลากระดูกอ่อนในอันดับและครอบครัวต่างๆ ต่อไปจะเป็นการจำแนกปลากระดูกอ่อนและปลากระดูกแข็งในอันดับและวงศ์ต่างๆ

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

**การจำแนกชนิดของปลากระดูกอ่อนในอันดับและครอบครัวต่างๆ**

Class Elasmobranchii (Chondrichthyes)

Order Lamniformes

Family Orectolobini

Subfamily Orectolobini ได้แก่ ปลาฉลามเสือ ฉลามหิน ฉลามกบ

Subfamily Rhincodontini ได้แก่ ปลาฉลามวาฬ

Family Carcharinindae ได้แก่ ฉลามหนู ฉลามหูดำ ฉลามกินคน

Family Sphyrnidae ได้แก่ ปลาฉลามหัวค้อน

Order Rajiformes

Family Rhinobatidae ได้แก่ ปลาโรนัน โรนิน

Family Pristidae ได้แก่ ปลาฉนาก

Family Trygonidae ได้แก่ ปลากระเบนทั่วไป กระบาง กระเบนธง กระเบนขาว (น้ำจืด) กระเบนทอง

Family Myliobatidae ได้แก่ ปลากระเบนนก กระเบนค้างคาว

Family Mobulidae ได้แก่ ปลากระเบนราหู กระเบนผี

Order Torpediniformes

Family Torpedinidae ได้แก่ ปลากระเบนไฟฟ้า

**การจำแนกชนิดของปลากระดูกแข็งในอันดับและครอบครัวต่างๆ**

Class Teleostomi (Osteichthyes)

Order Clupeiformes

Family Elopidae ได้แก่ ปลาตาเหลือกยาว

Family Megalopidae ได้แก่ ปลาตาเหลือกสั้น

Family Albulidae ได้แก่ ปลาเลดี้ (lady fish)

Family Clupeidae ได้แก่ ปลาหลังเขียว ตะลุมพุก กุแล กะตัก ไส้ตัน

Family Engraulidae ได้แก่ ปลาแมว หางไก่

Family Chirocentridae ได้แก่ ปลาดาบลาว

Family Chanidae ได้แก่ ปลานวลจันทร์ทะเล

Family Notopteridae ได้แก่ ปลากราย ปลาสลิด

Family Osteoglossidae ได้แก่ ปลาตะพัด

Order Scopeliformes

Family Synodidae ได้แก่ ปลาตุ๊กแก ปากคม สากกระเบือทอง

Family Harpodontidae ได้แก่ ปลาหนวดยุ่ง

Order Cypriniformes

Family Cyprinidae ได้แก่ ปลาตะเพียน แปบ สร้อย ข้าวเม่า ซิว บ้า ตะโกก ขี้ยอก กระโห้ เวียน ยี่สก กระสูบ นวลจันทร์น้ำจืด กระมัง หางไหม้ ปลาทอง กาดำ ทรงเครื่อง นางอ้าว ปลาไน จีน

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

Family Gyrinocheilidae ได้แก่ ปลาลูกผึ้ง

Family Homalopteridae ได้แก่ ปลาชนิดหนึ่งคล้ายปลาหมู

Family Cobitidae ได้แก่ ปลาหมู ซ่อนทราย ปล้องอ้อย

Family Ariidae ได้แก่ ปลากดทะเล ริวกิว

Family Plotosidae ได้แก่ ปลาดุกทะเล สามแก้ว

Family Siluridae ได้แก่ ปลาเนื้ออ่อน น้ำเงิน ชะโอน เค้า

Family Bagridae ได้แก่ ปลาแขยง ปลากด

Family Amblycipitidae ได้แก่ ปลาดัก

Family Akysidae ได้แก่ ปลาขยุย

Family Sisoridae ได้แก่ ปลากดแค้

Family Schilbeidae (Pangasiidae) ได้แก่ ปลาสวาย เทโพ สังกะวาด เทพา บึก

Family Saccobranchidae (Heteropneustidae) ได้แก่ ปลาจีด

Family Clariidae ได้แก่ ปลาดุกอุย ดุกด้าน ดุกแอฟริกัน

Order Anguilliformes

Family Anguillidae ได้แก่ ปลาตูหนา

Family Muraenidae ได้แก่ ปลาไหล morays

Family Muraenesocidae ได้แก่ ปลามังกร ยอดจาก

Family Congridae ได้แก่ ปลาไหลคอนเจอร์ (conger eel)

Family Ophichthyidae ได้แก่ ปลาไหลทะเล

Order Beloniformes

Family Belonidae ได้แก่ ปลากระทุงเหว

Family Hemirhamhidae ได้แก่ ปลาเข็ม

Family Exocoetidae ได้แก่ ปลานกกระจอก

Order Gadiformes

Family Bregmacerotidae ได้แก่ ปลากุเราแครระ

Order Syngnathiformes

Family Fistulariidae ได้แก่ ปลาปากแตร

Family Centriscidae ได้แก่ ปลาข้างใส

Family Syngnathidae ได้แก่ ปลาม้าน้ำ จิ้มฟันจระเข้

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

Order Cyprinodontiformes

Family Cyprinodontidae ได้แก่ ปลาหัวตะกั่ว

Family Poeciliidae ได้แก่ ปลาหางนกยูง หางดาบ

Order Phallostethiformes

Family Neostethidae ได้แก่ ปลาบู่ใส

Family Phallostethidae ได้แก่ ปลาบู่ใส

Order Beryciformes

Family Holocentridae ได้แก่ ปลาข้าวเม่าน้ำลึก

Order Mugiliformes

Family Sphyraenidae ได้แก่ ปลาน้ำดอกไม้ สาก

Family Mugilidae ได้แก่ ปลากระบอก

Family Atherinidae ได้แก่ ปลาหัวแข็ง

Order Polynemiformes

Family Polynemidae ได้แก่ ปลากุเรา หนวดพราหมณ์

Order Ophicephaliformes

Family Ophicephalidae (Labyrinthici) (Channidae) ได้แก่ ปลาช่อน กระสง ชะโด

Order Symbranchiformes

Family Symbranchidae (Flutidae) ได้แก่ ปลาไหลนา ไหลบึง

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

Order Perciformes

Family Centropomidae ได้แก่ ปลากะพงขาว กะพงแสม

Family Serranidae ได้แก่ ปลากะรัง

Family Theraponidae ได้แก่ ปลาข้างลาย ข้างตะเภา ออดแอด

Family Kuhliidae ได้แก่ ปลาคูเลีย (Kuhlia)

Family Priacanhidae ได้แก่ ปลาตาโต ตาพอง

Family Apogonidae ได้แก่ ปลาอมไข่

Family Sillaginidae ได้แก่ ปลาเห็ดโคน

Family Lactariidae ได้แก่ ปลาใบขนุน ญวน

Family Rachycentridae ได้แก่ ปลาช่อนทะเล

Family Carangidae ได้แก่ ปลาสีกุน หางแข็ง แข้งไก่ สำลี สละ

Family Menidae ได้แก่ ปลาพระจันทร์ ใบโพ

Family Coryphaenidae ได้แก่ ปลาอีโต้มอญ

Family Lutianidae ได้แก่ ปลากะพงเขียว กะพงแดง กะพงข้างปาน

Family Nemipteridae ได้แก่ ปลาทรายขาว ทรายแดง สายรุ้ง

Family Lobotidae ได้แก่ ปลาเสือตอ กะพงดำ กะพงหิน

Family Leioganthidae ได้แก่ ปลาแป้น ดอกหมาก

Family Pomadasyidae ได้แก่ ปลากะพงแสม ครืดคราด ข้างตะเภา

Family Sciaenidae ได้แก่ ปลาจวด

Family Lethrinidae ได้แก่ หมูสี

Family Sparidae ได้แก่ ปลาจาน อีคุด

Family Mullidae ได้แก่ ปลาหนวดฤาษี แพะ

Family Psettidae ได้แก่ ปลาผีเสื้อ ผีเสื้อเงิน โสร่งแขก

Family Pempheridae ได้แก่ ปลากระดี่ทะเล

Family Toxotidae ได้แก่ เสือพ่นน้ำ

Family Cyphosidae ได้แก่ ปลาสลิดทะเล

Family Ephippidae ได้แก่ ปลาข้าวเม่า คลุด หูช้าง

Family Drepanidae ได้แก่ ปลาหูช้าง แมลงปอ ใบโพ

Family Scatophagidae ได้แก่ ปลาตะกรับ เสือดาว

Family Chaetodontidae ได้แก่ ปลาผีเสื้อ สินสมุทร

Family Pristolepidae ได้แก่ ปลาหมอช้างเหยียบ

Family Nandidae ได้แก่ ปลาดุมชี

Family Cichlidae ได้แก่ ปลานิล หมอเทศ เทวดา ออสการ์

Family Cepolidae ได้แก่ ปลาแถบ

Family Pomacentridae ได้แก่ ปลาสลิดหิน

Family Labridae ได้แก่ ปลานกขุนทอง

Family Scaridae ได้แก่ ปลานกแก้ว

Family Opisthognathidae ได้แก่ ปลาจอฟิช (jaw fish)

Family Mugiloididae ได้แก่ ปลาตาแหงน

Family Uranoscopidae ได้แก่ ปลากบ อุบ

Family Champsodontidae ได้แก่ ปลาแคมโซดอน

มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

Family Blenniidae ได้แก่ ปลากระบี่

Family Congrogasidae ได้แก่ ปลาคอนดกกาส (congrogas)

Family Broturidae ได้แก่ ปลาโบทูรี่ (broturii)

Family Ophidiidae ได้แก่ *Hypopleuron caninum*

Family Fierasferidae ได้แก่ ปลาไข่มุก

Family Ammodytidae ได้แก่ ปลาแซนเลน (sand lances)

Family Callionymidae ได้แก่ ปลามังกรน้อย

Family Siganidae ได้แก่ ปลาสลิดทะเล

Family Acanthuridae ได้แก่ ปลาขี้ตังเป็ด

Family Gempylidae ได้แก่ ปลาสเนคแมคคาเรล

Family Trichiuridae ได้แก่ ปลาดาบเงิน

Family Scombridae ได้แก่ ปลาทู

Family Cybiidae ได้แก่ ปลาอินทรี

Family Histiophoridae ได้แก่ ปลากะโทงแทง

Family Xiphiidae ได้แก่ ปลากะโทงแทงดาบ

Family Stromateidae ได้แก่ ปลาจะละเม็ดเทา จะละเม็ดขาว

Family Nomeidae ได้แก่ ปลาดิฟฟิช (driftfish)

Family Anabantidae ได้แก่ ปลาหมอไทย หมอตาล แรด สลิด กระดี่

Family Luciocephalidae ได้แก่ปลาพิคเฮด (pikehead)

มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

Family Kurtidae ได้แก่ ปลาอนุบาล (nurseryfish)

Family Eleotridae ได้แก่ ปลาบู่ทราย (บู่จาก)

Family Gobiidae ได้แก่ ปลาบู่ ปลาเขือ

Family Periopthalmidae ได้แก่ ปลาตีน จุมพรวต

Family Scorpaenidae ได้แก่ ปลาสิงโต

Family Triglidae ได้แก่ ปลามังกร

Family Aploactidae ได้แก่ ปลาเวลเวทฟิช (velvetfish)

Family Synanceidae ได้แก่ ปลากะรังหัวโขน

Family Phatycephalidae ได้แก่ ปลาหัวแบน หางควาย

Order Dactylopteriformes

Family Dectylopteridae ได้แก่ ปลานกฮูก

Order Thunniformes

Family Thunnidae ได้แก่ ปลาโอ ปลาทูน่า

Order Pleuronectiformes

Family Psettodidae ได้แก่ ปลาซีกเดียว จักรผาน (halibut)

Family Bothidae ได้แก่ ปลาลิ้นหมา ลิ้นควาย (flounder)

Family Pleuronectidae ได้แก่ ปลาซีกเดียว ลิ้นหมา

Family Soleidae ได้แก่ ปลาซีกเดียว ลิ้นหมา (sole)

Family Cynoglossidae ได้แก่ ปลาลิ้นหมา ยอดม่วง

Order Chaudhriiformes

Family Chaudhuriidae ได้แก่ ปลาไหลหนาม (spineless eels)

Order Mastacembeliformes

Family Mastacembelidae ได้แก่ ปลาหลด กระทิง

Order Echeneiformes

Family Echeneidae ได้แก่ ปลาติด หรือ เหาฉลาม

Order Tetordontiformes

Family Triacanthidae ได้แก่ ปลาวัว

Family Balistidae ได้แก่ ปลาวัว งัว

Family Ostraciidae ได้แก่ ปลาสี่เหลี่ยม

Family Tetrodontidae ได้แก่ ปลาปักเป้า

Family Diodontidae ได้แก่ ปลาปักเป้าหนามทุเรียน

Order Batrachoidiformes

Family Batrachoididae ได้แก่ ปลาปลากบ ปลงคางคก

Order Lophiiformes

Family Onchocephalidae ได้แก่ ปลาอนาคอนโทด

Family Antennariidae ได้แก่ ปลากบ

Order Pegasiformes

Family Pegasidae ได้แก่ ปลาผีเสื้อกลางคืน มังกรทะเล จระเข้หิน

ปลาแต่ละชนิดมีรูปร่างของหัว ปาก ลำตัว และครีบแตกต่างกันไปในแต่ละกลุ่มของวงศ์ สกุล รวมถึงสีสันที่มักเปลี่ยนไปตามวัย ตามฤดูกาล และเพศ การจำแนกปลาที่อยู่ในตู้ หรือปลาที่

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ตายแล้วทำได้ง่ายกว่าปลาที่อยู่ในธรรมชาติ โดยเฉพาะมุมมองจากด้านข้าง ทำให้เห็นรายละเอียดได้ชัดเจนกว่าจากด้านบน ขนาดและรูปร่างของปลามักจะวัดความยาวของลำตัว เรียกว่าการวัดความยาวยาวมาตรฐาน (standard length) ซึ่งจะวัดจากจะงอยปากถึงปลายสุดของโคนครีบหาง ยกเว้นในพวกปลาไหลที่มีรูปร่างเรียวบาวจะต้องวัดรวมจนถึงปลายหาง เรียกว่าการวัดความยาวทั้งหมด (total length)

ลักษณะของลำตัวปลาสามารถบ่งบอกถึงกลุ่มปลาได้ เช่น รูปร่างแบนข้าง หรือแบนราบทรงกระบอกยาวหรือป้อมสั้น ไปจนถึงรูปร่างแบบงู ปลาบางชนิด เช่น กลุ่มปลาเนื้ออ่อนมีทั้งรูปร่างแบนราบที่ส่วนหัว แต่แบนข้างที่ส่วนของลำตัว กลุ่มปลาลิ้นหมารูปร่างแบนข้าง แต่มันว่ายน้ำโดยเอาด้านใดด้านหนึ่งลงขนานกับพื้น และมีตาที่ย้ายมาอยู่ด้านเดียวกันทั้งสองข้าง

ลำตัวปลาส่วนใหญ่ยังห่อหุ้มด้วยเกล็ด ซึ่งเกิดจากผิวหนังชั้นใน เกล็ดปลาทั่วไปจะโตไปพร้อมกับขนาดของปลา และมีความสัมพันธ์กับการเจริญเติบโต สำหรับกลุ่มลาที่ไม่มีเกล็ดห่อหุ้มตัว เช่น ปลาดุก ปลาสวาย ปลากด เรียกว่า ปลาหนัง

ปากและฟันของปลาสามารถบอกถึงอาหารและนิสัยการกินได้ปลาที่มีปากกว้างและฟันแหลมคมมักล่าเหยื่อชนิดต่าง ๆ ปลาที่มีปากอยู่ด้านล่างมักกินอาหารจากผิวหน้าดินหรือวัสดุต่าง ๆ ใต้น้ำ ขณะที่ปลาที่มีปากเฉียงด้านบนมักหาเหยื่อจากผิวน้ำ ปลาบางชนิดมีปากที่รูปร่างแปลกออกไปเพื่อปรับตัวกับอาหาร และวิธีการหากิน

หางปลาก็ใช้ในการจำแนกกลุ่มและวิธีว่ายน้ำได้ดี ปลาที่มีหางแฉกหรือเว้าลึกมักว่ายอยู่ระดับตั้งแต่ผิวน้ำถึงกลางน้ำ และมีนิสัยว่ายน้ำเร็ว ปลาที่มีหางมนกลมหรือตัดตรงมักว่ายน้ำช้าหรือชอบอยู่กับที่ ซึ่งรวมถึงหางแบบที่มีปลายแหลมด้วย แต่ปลาที่มีหางเรียวอย่างปลาไหล หรือปลาหลดมักชอบอยู่ในโพรงหรือรูใต้ดิน

การเคลื่อนไหวของปลาโดยการว่ายน้ำบางครั้งอาจกระโดดเหนือน้ำเมื่อตกใจ หรือไล่ล่าเหยื่อ บางชนิดมีการเลื้อยแบบงู เช่นปลาไหล เนื่องจากไม่มีครีบเช่นปลาอื่น ๆ ปลาว่ายน้ำโดยใช้กล้ามเนื้อของลำตัวเป็นหลักในการส่ายตัวไปมา เริ่มจากด้านหน้าไปส่วนหาง ครีบหางมีส่วนสำคัญในการช่วยโบกพัดน้ำผลักดันตัวไปข้างหน้า โดยมีครีบอกช่วยทรงตัว และเป็นหางเสือ ส่วนครีบอื่นใช้ช่วยเบรกหรือเป็นหางเสือ แต่ปลาบางชนิดที่มีครีบหลังหรือครีบก้นยาวก็ใช้ครีบนี้พริ้วช่วยในการว่ายน้ำด้วย เช่น ปลากราย ปลาช่อน ปลามีการดำรงชีวิตแตกต่างกันไป บางชนิดชอบอยู่โดดเดี่ยวหรือเป็นคู่ เช่น ปลาช่อน ปลากัด บางชนิดชอบอยู่เป็นฝูงใหญ่ เช่น ปลาสร้อย ปลาตะเพียน ส่วนใหญ่แล้วจะพบการอยู่เป็นฝูงได้ในช่วงวัยอ่อน และวัยรุ่น และมีพฤติกรรมเคลื่อนย้ายแหล่งอาศัยไปตามความสมบูรณ์ของอาหาร และสภาวะแวดล้อม เช่น การอพยพไปอยู่บริเวณต้นน้ำในฤดูวางไข่

สถาบันวิทยบริการ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม
MAHASARAKHAM UNIVERSITY

**ความหลากหลายของปลาน้ำจืดไทย**

**วงศ์ปลาฉนาก (Family Pristidae)**

เป็นปลากระดูกอ่อนที่มีลักษณะเด่นคือ มีจงอยปากยาวยื่น และมีฟันเลื่อย แหลมคมอยู่ 2 ด้านข้าง ส่วนหัวและ อกแบบนราบเล็กน้อย ตาเล็กมีช่องน้ำอยู่หลังตา ปากเล็กอยู่ด้านล่าง มีฟันเป็นเม็ดแข็งใช้ขบหอย ปู ที่เปลือกแข็งได้ และยังใช้จะงอยปากในการฟาดปลาที่เป็นเหยื่อและต่อสู้ศัตรู มีรูปร่างคล้ายปลาฉลามแต่มีครีบอกที่แผ่กว้างติดต่อกับส่วนหัว ช่องเหงือกอยู่ด้านล่างของลำตัวเช่นเดียวกับปลากระเบน ครีบหลัง 2 อัน มีปลายเรียวโค้งขนาดเท่าๆกัน ไม่มีครีบก้น ครีบหางบนยาวกว่าซีกล่าง ชนิดที่เคยมีรายงานพบในบึงบอระเพ็ดเพียงครั้งเดียวคือ ปลาฉนากจะงอยกว้าง *Pristis microdon* ซึ่งปกติเป็นปลาทะเล แต่ก็พบเข้ามาอยู่ในน้ำจืดเป็นบางครั้ง ปลาฉนากเคยพบเป็นครั้งคราวในแม่น้ำเจ้าพระยา และ แม่น้ำสายอื่นๆ ตอนล่าง และ พบบ่อยในทะเล ชายฝั่งของเขตอินโด – แปซิฟิค แต่ปัจจุบันเป็นปลาที่ใกล้สูญพันธุ์ และ ไม่พบมาเป็นเวลานานกว่า 10 ปี แล้ว ในน่านน้ำไทย เนื่องจากถูกล่า และมลภาวะในแม่น้ำ

**วงศ์ปลากระเบน (Family Dasyatidae)**

เป็นปลากระดูกอ่อนที่พบได้ทั้งในทะเลและในน้ำจืด มีรูปร่างที่แบนราบ มีส่วนครีบอกที่แผ่กว้างกลมรอบตัว ปากอยู่ด้านล่าง ตาอยู่ด้านบนมีช่องน้ำเข้า 1 คู่ อยู่ด้านหลัง ปลากระเบนมีส่วนหางที่เป็นเส้นยาว ที่โคนหางมีเงี่ยงอยู่ 1-2 อัน เป็นอาวุธที่สำคัญของมัน เพราะมีพิษแรงเมื่อแทงเข้าไปในเนื้อศัตรูรวมถึงคนที่จับมันโดยไม่ระมัดระวังด้วย ผิวหนังปลากระเบนเรียบนิ่มไม่มีเกล็ด ยกเว้นบริเวณกลางหลัง ปลากระเบนมีขากรรไกร และ ฟันที่แข็งแรงใช้บดขบสัตว์เปลือกแข็งได้ดี มักอาศัยอยู่บริเวณพื้นท้องน้ำแต่ก็ว่ายขึ้นมาหากินบนผิวน้ำได้ ในประเทศไทยพบปลากระเบนน้ำจืด ชนิดต่างๆ เช่น ราหูน้ำจืด และ กระเบนขาว

**วงศ์ปลากราย (Family Notopteridae)**

เป็นปลาที่ค่อนข้างโบราณ เพราะมีลักษณะคล้ายกับปลาดึกดำบรรพ์ ที่สูญพันธ์ไปแล้วบางชนิด มีรูปร่างแบนข้างมาก เรียวไปทางด้านท้าย ครีบหลังอันเล็ก ครีบก้นและครีบหางยาวติดต่อกัน มันจึงใช้ครีบก้นอันยาวนี้โบกพริ้วในการว่ายน้ำ ครีบท้องเล็กมาก ปากกว้าง มีเกล็ดเล็กละเอียด เวลาวางไข่ตัวผู้ และ ตัวเมียช่วยกันดูแล โดยวางไข่ติดกับตอไม้ แล้วจะเลี้ยงลูกจนเติบโตพอที่จะช่วยตนเองได้จึงปล่อยไป เป็นปลากินเนื้อ ที่เคยพบในประเทศไทยเช่น ปลาสลาด, ปลากราย, ปลาสะตือ

**วงศ์ปลาตูหนา (Family Anguillidae) หรือ ปลาไหลทะเล**

RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

เป็นปลาไหลแท้ที่มีวงจรชีวิตส่วนหนึ่งต้องออกไปวางไข่ในทะเลลึก แล้วตัวอ่อนจึงล่องลอยกลับมาเลี้ยงตัวที่ชายฝั่งก่อนเข้ามาเติบโตในน้ำจืดที่ไกลจากทะเลนับร้อยกิโลเมตร ปลาตูหนามีปากกว้าง มีเขี้ยวเล็กละเอียดบนขากรรไกร ครีบอกเป็นรูปกลมรี มีครีบหลังยาวติดต่อกับครีบหางที่มน และ ครีบก้นที่ยาว แม้ดูเผินๆ ว่าไม่มีเกล็ดมีเมือกลื่นหุ้มตัว แต่ที่จริงมันก็มีเกล็ดขนาดเล็กมากเรียงซ้อนฝังอยู่ใต้ผิว เป็นปลานักล่าเหยื่ออีกชนิดหนึ่งที่สามารถจับกุ้ง ปู เปลือกแข็งกินได้ รวมถึงปลาชนิดต่างๆ มักอาศัยอยู่ในแหล่งน้ำที่ใส มีตอไม้ โพรงไม้ หรือซอกหินอยู่มาก มันอาจขุดรูอยู่ได้เช่นกัน นอกจากบริเวณปากแม่น้ำแล้ว เคยพบขึ้นไปสูงถึงบริเวณน้ำตก ลำธารบนภูเขาในประเทศไทย พบปลาวงศ์นี้ในภาคใต้และภาคตะวันตกขึ้นไปถึง จ.แม่ฮ่องสอน และแม่น้ำโขง ถึง จ.เลย

**วงศ์ปลาแมว (Family Engraulididae)**

มีรูปร่างยาว ส่วนหัวโต ปากกว้าง เฉียงลง มีกระดูกขากรรไกรบนยาวยื่นออกไปทางด้านท้ายเป็นแผ่นแบน เรียว มักมีฟันเล็กแหลม ลำตัวแบนข้างมาก ครีบหลังเล็ก ครีบก้นยาว ครีบหางเว้าแฉกหรือปลายแหลม เกล็ดบางหลุดร่วงง่าย ส่วนมากเป็นปลาทะเล รู้จักกันดีได้แก่ พวกปลากะตัก และ ปลาแมว (Anchovy) ในน้ำจืดของไทย พบ 4 ชนิด

**วงศ์ปลาหลังเขียว (Family Clupeidae)**

มีลักษณะที่สำคัญคือ มีลำตัวแบนข้าง ริมฝีปากบนเป็นแผ่นกระดูกบาง ปากอยู่ตอนปลายสุดของหัวเป็นส่วนมาก มีฟันซี่เล็กและละเอียด หรืออาจไม่มีในบางชนิดมีเกล็ดบางแบบขอบเรียบ ปกคลุมทั่วตัว ครีบมีขนาดเล็ก ไม่มีก้านครีบแข็ง ครีบหางมักเว้าลึก ส่วนมากมักมีเกล็ดที่ด้านท้องเป็นสันคม มักมีสีตัวเป็นสีเงิน และ สีด้านหลังเป็นสีเขียวเรื่อ จึงเป็นที่มาของชื่อ อาศัยในทะเลเป็นส่วนมากแต่ก็พบในน้ำจืดหลายชนิด ที่พบในน้ำจืดของไทยมี 6 ชนิด

**วงศ์ปลาตะเพียน , สร้อย และ ซิว (Family Cyprinidae)**

เป็นวงศ์ที่มีจำนวนชนิดมากที่สุดในปลาน้ำจืดของไทย และ มีความหลากชนิดเป็นอันดับสามของวงศ์ปลาในโลก มีลักษณะสำคัญคือ ไม่มีฟันที่ริมฝีปาก แต่มีฟันซี่ใหญ่อยู่ในลำคอ เกล็ดเป็นแบบขอบเรียบ , บาง ครีบเป็นก้านครีบอ่อน ครีบหางเป็นแฉกเว้าส่วนมาก ครีบท้องตั้งอยู่ค่อนมาตอนกลางของลำตัวด้านท้อง รูปร่างลำตัวมักแบนข้าง หรือเป็นแบบปลาตะเพียนที่เรารู้จักดี แต่ก็มีบางชนิดลำตัวค่อนข้างกลมอาศัยเฉพาะในน้ำจืด เป็นปลาที่กินพืชโดยส่วนมาก แต่ก็พบหลายชนิดกินเนื้อ หรือ แพลงค์ตอน ตัวผู้และตัวเมียมีลักษณะคล้ายกันมาก พบในเขตร้อน , เขตอบอุ่น และ เขตหนาวเกือบทั่วโลก ยกเว้นขั้วโลก ออสเตรเลีย และ อเมริกาใต้ ในประเทศไทยชนิดที่เคยพบเช่น แปบควาย , แปบ , ซิวอ้าว ,ปลาฟักพร้า ฯลฯ

**วงศ์ปลาหมู (Family Cobitidae)**

มีลักษณะสำคัญคือบริเวณใต้ตา มีกระดูกเป็นหนามโค้งพับซ่อนอยู่ข้างละ 1 อัน ส่วนหัวและจะงอยปากยื่นแหลม ปากเล็กอาจมีติ่งรอบริมฝีปาก มีหนวดสั้นๆ 3 คู่ ครีบหลังสั้นๆ ครีบอื่นๆ มีขนาดเล็ก ลำตัวเรียวยาวและแบนข้าง ครีบหางเว้าหรือเว้าลึก ผิวหนังมีเกล็ดขนาดเล็กมากฝังอยู่จึงไม่สามารถสังเกตุได้ด้วยตาเปล่าและมีเมือกลื่นคลุมลำตัว ปลาในวงศ์นี้ไม่มีฟันที่ลำคอและที่ขากรรไกร มักอาศัยอยู่บริเวณที่มีน้ำไหลแรง อยู่ในระดับพื้นท้องน้ำ หรือ บริเวณใกล้ซอกหิน , โพรงไม้โดยพบเป็นฝูงใหญ่ อาหารส่วนใหญ่เป็นสัตว์เล็ก ฯ ที่อยู่ในดินโคลนใต้น้ำ และซากสัตว์ พบในประเทศไทยไม่น้อยกว่า 3 ชนิด

**วงศ์ปลาสร้อยน้ำผึ้ง (Family Gyrinocheilidae)**

มีลักษณะคล้ายปลาสร้อยธรรมดา แต่ลำตัวเรียวทรงกระบอก แบนข้างเล็กน้อย ส่วนหัวค่อนข้างใหญ่ ตาเล็ก ปากอยู่ด้านล่างของจะงอยปาก และมีลักษณะสำคัญ คือมีช่องเล็ก ๆ อยู่ด้านบนสุดของช่องเหงือก ริมฝีปาก มีลักษณะเป็นแผ่นดูดรูปกลมใช้ดูดกินตะไคร่น้ำตามพื้นหินและ ทราย แล้วหายใจโดยใช้น้ำผ่านเข้าช่องเปิดด้านบนฝาปิดเหงือก แล้วออกมาทางด้านข้างแทนที่จะใช้ปากสูบน้ำเข้าอย่างปลาทั่วๆ ไป พบในประเทศไทย 2 ชนิด เช่น สร้อยน้ำผึ้ง , เทศบาล

**วงศ์ปลากด, แขยง (Family Bagridae)**

เป็นปลาหนังที่ไม่มีเกล็ด มีส่วนหัวค่อนข้างแบนราบ แต่ลำตัวแบนข้างไปทางด้านท้าย ปากกว้างอยู่ที่ปลายสุดของจะงอยปาก มีฟันที่เป็นซี่เล็ก แหลม ขึ้นเป็นแถบบน ขากรรไกร และเพดาน มีหนวด 4 คู่ โดยคู่ที่อยู่ริมฝีปากจะยาวที่สุด ครีบหลังและ ครีบอกเป็นก้านแข็ง หรือเรียกว่าเงี่ยงเป็นส่วนมาก ครีบไขมันค่อนข้างยาว ครีบก้นสั้น ครีบท้องค่อนข้างเล็ก ครีบหางเว้าแฉก ในตัวผู้มักมีติ่งเล็กๆ ที่ช่องก้น เป็นปลาหนังวงศ์ ที่พบมากชนิดที่สุดของไทย มากกว่า 25 ชนิด เป็นปลากินเนื้อ ตั้งแต่แมลง สัตว์น้ำอื่นๆ ปลา และ กินซากสัตว์ ชนิดที่เคยพบเช่น แขยงหิน, แขยงข้างลาย, แขยงใบข้าว ฯลฯ

นอกจากนี้ยังรวมกลุ่มปลาดุกมูนไว้ด้วย ซึ่งมีลักษณะคือ มีส่วนหัวสั้น และ จะงอยปากเล็ก ตาเล็กมาก มีหนวดสั้น 4 คู่ คู่ที่อยู่ด้านล่างจะเป็นเส้นแบบบิดเป็นเกลียว ริมฝีปากเล็กเป็นจีบ ลำตัวแบนข้างเล็กน้อย ส่วนหลังยกสูง ครีบหลังสั้น ครีบไขมันยาวมาก ครีบหางเว้าลึก ครีบหลัง และ ครีบอกเป็นก้านแข้งปลายคม ตัวมีสีคล้ำ หรือ น้ำตาลอ่อน ด้านท้องสีจาง ในปลาเป็นๆ อาจมีแถบขวางลำตัว แนวเฉียงเป็นสีจางๆ ครีบสีจาง ครีบหางใส ขนาดพบใหญ่สุด 25 ซม. พบทั่วไป 10 –15 ซม. จับได้โดยเบ็ดราว, ข่ายลอย, ตุ้ม, ลอบ พบในแม่น้ำสายใหญ่ ๆ ตั้งแต่แม่น้ำเจ้าพระยา, บางปะกง และ แม่น้ำโขง

สถาบันวิทยบริการ
CHULALONGKORN UNIVERSITY

**วงศ์ปลากดอเมริกัน (Family Ictaluridae)**

เป็นปลาพื้นเมืองของทวีปอเมริกาเหนือ ถูกนำเข้าไปเลี้ยงในประเทศเขตอบอุ่นหลายแห่ง เช่น ในแคนาดา ทวีปยุโรป ญี่ปุ่น ในประเทศไทยได้นำเข้ามา ทดลองเลี้ยง ประมาณปี 2532 มีลักษณะดูคล้ายกับปลากด และ ปลาสวายรวมกัน คือ มีส่วนหัวใหญ่ ปากกว้าง มีหนวด 4 คู่ คู่ที่จมูกสั้น คู่ที่ริมฝีปาก และ คางยาวลำตัวเรียว และ แบนข้างที่ส่วนท้าย มีเงี่ยงที่ครีบหลัง และครีบอก ครีบไขมันเล็กและสั้นครีบก้นยาว ครีบหางเว้าลึก ตัวมีสีเทา อมน้ำตาล หรือ เหลือง ด้านท้องสีจาง มีประสีคล้ำ หรือดำอยู่กระจายห่างๆ ในปลาขนาดเล็กกว่า 20 ซม. ครีบมีสีคล้ำ พบขนาดใหญ่สุด 1.2 ม. แต่ทั่วไป 40 – 50 ซม. มีการกระจายพันธุ์ในลุ่มแม่น้ำมิสซิสซิปปี้ และแคนาดาตอนใต้ ในประเทศไทยมีการเลี้ยงกันมากที่ จ. นครสวรรค์ และพบหลุดมาในแหล่งน้ำธรรมชาติ และจับมาขายในตลาดหลังน้ำท่วมปี 2538

**วงศ์ปลาเนื้ออ่อน (Family Siluridae)**

เป็นปลาหนังที่มีรูปร่างเพรียว,ยาว และ ลำตัวแบนข้างมาก ส่วนหัวมักแบนราบ หรือแบนข้างในบางชนิด ปากกว้าง มีฟันซี่เล็ก , แหลม ขึ้นบนขากรรไกร และ เป็นแผ่นบนเพดาน มีหนวด 2-3 คู่ ครีบก้นยาวมากกว่า ครึ่งหนึ่ง ของความยาวลำตัวไม่มีครีบไขมัน ครีบหลังมักอันเล็กมาก หรือไม่มี ครีบท้องเล็ก วางไข่แบบจมติดกับวัสดุ เป็นปลากินเนื้อ เช่นแมลง ปลาเล็ก กุ้ง และ สัตว์หน้าดินต่างๆ เป็นวงศ์ของปลาหนังที่มีการกระจายพันธุ์กว้าง ตั้งแต่ยุโรป,เอเชียตอนบน ,อินเดีย ถึงอินโดนีเซีย เป็นปลาเศรษฐกิจที่สำคัญของแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ รวมถึงประเทศไทย พบในไทยราว 30 ชนิด และอย่างน้อย 7 ชนิด พบบ่อยในท้องตลาด บางชนิดเป็นปลาสวยงามที่มีชื่อเช่น ปลาก้างหระร่วง , คางเบือน , แดงไท ฯลฯ

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

**วงศ์ปลาหวีเกศ (Family Schilbeidae)**

ลักษณะสำคัญคือ มีหนวด 3-4 คู่ มีร่องเก็บของแต่ละเส้นที่จะงอยปากข้างแก้ม และ ใต้คาง รูจมูกช่องหลังมักใหญ่กว่าช่องหน้า และ อยู่ชิดกัน ครีบอก และ ครีบหลัง มีก้านครีบแข็ง ครีบไขมันมีขนาดเล็ก ครีบก้นยาว ลำตัวมักแบนข้าง มีการกระจายพันธุ์ ตั้งแต่ ทวีป แอฟริกา อินเดีย เอเชียอาคเนย์ และ เขตซุนดา ที่พบในไทย มี 4 สกุล 5 ชนิด เช่น สังกะวาดขาว และหวีเกศ

**วงศ์ปลาสวาย, สังกะวาด (Family Pangasiidae)**

รูปร่างเพรียวส่วนท้องใหญ่ ลำตัวแบนข้างเล็กน้อย ส่วนหัวโต ตาโต มีหนวดเพียง 2 คู่ รูจมูกช่องหน้า และ หลังมีขนาดเท่าๆกัน มีครีบไขมันเล็ก ครีบท้องเล็ก ฐานครีบก้นยาว กระเพาะมีขนาดใหญ่รูปรียาว มี 1-4 ตอน พบขนาดตั้งแต่ไม่เกิน 40 ซม. จนถึงกว่า 2 ม. ในปลาบึก Pangasianodon gigas ซึ่งได้ชื่อว่าเป็นปลาหนังที่ใหญ่ที่สุด ปลาวงศ์นี้มีการกระจายพันธุ์ จาก

อินเดีย เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และ บอร์เนียว อินโดนีเซีย มี 21 ชนิด และ พบในไทย 12 ชนิด เช่น สวาย, สวายหนู, สังกะวาดท้องคม ฯลฯ

**วงศ์ปลาแค้ (Family Sisoridae )**

แตกต่างจากปลาหนังในวงศ์อื่น ๆ คือมีส่วนหัวโตปากกว้างมาก และ อยู่ด้านล่างผิวหนังบนหัว และ ตัวไม่เรียบ อาจสากหรือเป็นตุ่มนิ่มเล็กๆ บนหัวมีสันตื้น ไปถึงด้านหลัง ครีบไขมัน มีขนาดเล็กมีหนวด 4 คู่ หนวดที่ริมฝีปาก เป็นเส้นแบนและแข็ง หนวดที่จมูก สั้นหนวดใต้คางยาว ส่วนมากครีบหลังและครีบอกมีก้านแข็งแหลมคม ครีบท้องใหญ่ ครีบก้นเล็ก ครีบหางเว้าแฉก ปลาวงศ์นี้มีการกระจายพันธุ์เฉพาะในเขตร้อนของเอเชีย พบมากกว่า 50 ชนิด ประมาณ 17 ชนิด พบในไทย มี 2 ชนิด คือ แค้วัว, แค้ควาย

**วงศ์ปลาดุก (Family Clariidae)**

มีลักษณะที่เด่นชัดคือ ส่วนหัวกลมแบนราบตาเล็กอยู่ด้านข้างของหัว ปากเล็ก อยู่ตอนปลายสุดของจะงอยปาก มีหนวดรอบปาก 4 คู่ยาวเท่าๆกัน ครีบอกมีก้านแข็งแหลมคม และ มีพิษแรงปานกลางถ้าถูกทิ่มแทง ครีบหลังไม่มีก้านครีบแข็งยาวเกือบเท่าลำตัวเช่นเดียวกับครีบก้น ครีบหลังและครีบท้องเล็กปลายมน ปลาดุก มีอวัยวะพิเศษรูปร่างคล้ายก้อนฟองน้ำ สีแดงสดอยู่ในช่องเหงือกตอนบน ใช้ช่วยหายใจโดยใช้อากาศเหนือน้ำได้ จึงทำให้ปลาดุกอยู่เหนือน้ำ ได้นานกว่าปลาชนิดอื่น ๆ และมันยังสามารถใช้แถก คืบคลานบนบกได้ เมื่อมีฝนตกน้ำไหลหลาก และเป็นที่มาของชื่อภาษาอังกฤษ ที่เรียกว่า “ Walking catfish” ปลาดุกมีการวางไข่โดยขุดโพรง หรือ ทำรัง และบางชนิดตัวผู้ ตัวเมียช่วยกันดูแลไข่จนฟักเป็นตัว ไข่เป็นแบบไข่ติด ปลาในวงศ์นี้มีการกระจายพันธุ์กว้างตั้งแต่ทวีปอัฟริกา ถึง เอเชีย ในประเทศไทยพบ 6-7 ชนิด เช่น ดุกด้าน, ดุกอุย และ ดุกเนื้อเลน ฯลฯ

มหาวิทยาลัยมหาสารคาม
MAHASARAKHAM UNIVERSITY

**วงศ์ปลาจีด (Family Heteropneustidae)**

พบตั้งแต่อินเดีย ถึง ประเทศไทย มีเพียงชนิดเดียวในประเทศไทย คือ จีด

**วงศ์ปลากดทะเล, ปลาอุก (Family Ariidae)**

เป็นปลาที่อยู่ในบริเวณน้ำกร่อย ปากแม่น้ำ และ ในทะเล ส่วนมากรูปร่าง คล้ายปลาสวายแต่มีส่วนหัวโตกว่า และ แบนราบเล็กน้อย ครีบหลังยกสูง มีก้านแข็งคมเช่นเดียวกับครีบอก ครีบก้นสั้น ครีบหางเว้าลึก มีหนวด 1-3 คู่รอบปาก ปลาวงศ์นี้มีการวางไข่ โดยตัวผู้เป็นผู้อมไข่ไว้ในปากรอจนกว่าจะฟักเป็นตัว ไข่มีฟองขนาดใหญ่ ตั้งแต่ 0.5 – 1 ซม. แล้วแต่ชนิด พบกระจายพันธุ์ทั่วเขตร้อนของโลก พบในประเทศไทย ประมาณ 20 ชนิด และพบในน้ำจืดราว 6 ชนิด

**วงศ์ปลาบู่ใส (Family Phallostethidae)**

เป็นปลาขนาดเล็ก มีรูปร่างเพรียว หัวเล็ก ตาเล็ก ใต้คางมีขดกระดูกเป็นอวัยวะพิเศษใช้ในการสืบพันธุ์ เรียก Priapium มีรูปร่างแตกต่างกันแล้วแต่ชนิด มีครีบหลัง 2 ตอน ตอนแรกเล็กมาก มีเพียง 1 ก้านครีบสั้น ๆ ตอนหลังมีขนาดเล็ก ทั้งสองส่วนอยู่ค่อนไปด้านท้ายลำตัว ครีบหางเว้าตื้น ครีบก้นใหญ่ ครีบอกเล็ก ไม่มีเกล็ด ตัวมักใส อยู่เป็นฝูงเล็ก ๆ ในบริเวณผิวน้ำของแม่น้ำและ แหล่งน้ำนิ่ง ทั้งน้ำจืด และ น้ำกร่อย พบในเขตเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ถึงฟิลิปปินส์ ทั้งหมด 4 สกุล 20 ชนิด มีขนาดใหญ่สุด 3.7 ซม. ทั่วไปประมาณ 2 ซม. ในประเทศไทย พบอย่างน้อย 3 ชนิด

**วงศ์ปลาเข็ม (Family Hemirhamphidae)**

มีรูปร่างทรงกระบอกเรียว ลำตัวแบนข้างเล็กน้อย หรือกลม ลักษณะที่เด่นชัด คือมีจะงอยปากล่าง ยื่นยาวกว่าปากบนมาก ตาโต ครีบหลังค่อนไปทางด้านท้ายลำตัว มีเกล็ดค่อนข้างเล็ก มักพบในบริเวณน้ำกร่อย และ ทะเล ชอบว่ายหากินอยู่บริเวณใกล้ ผิวน้ำ กินแมลง ลูกปลาเป็นอาหาร รวมถึงแพลงค์ตอนพืช ออกลูกเป็นตัว โดยผสมพันธุ์ ภายในตัว พบทั่วไปในทะเลเขตร้อน พบในน้ำจืดของประเทศไทย 5 ชนิด ปลาในวงศ์นี้ ที่ใช้ประโยชน์ เป็นปลาสวยงาม คือ ปลาเข็มหม้อ พบบ่อยในลุ่มแม่น้ำเจ้าพระยา ตอนล่าง บึงบอระเพ็ด และยังถูกนำมาเลี้ยงใช้ต่อสู้กันแบบปลากัด

**วงศ์ปลากระทุงเหว (Family Belonidae)**

มีจะงอยปากทั้งบน และ ล่างยื่นยาวมาก และ แข็งแรง มีฟันเล็กแหลมบนขากรรไกรทั้งบนและล่าง รูปทรงกระบอกยาวเรียว ครีบหลัง และ ครีบก้นมักอยู่ค่อนไปทางด้านท้าย ครีบอกใหญ่ เกล็ดเล็ก พบส่วนมากอยู่ในทะเล และ น้ำกร่อยของ เขตร้อนรอบโลก เป็นปลากินเนื้อ วางไข่ โดยเป็นไข่ติด ไข่มักมีเส้นใยหุ้มรอบ พบในน้ำจืดของไทย เพียง 1 ชนิด คือ ปลากระทุงเหวเมือง

**วงศ์ปลาชิวข้าวสาร (Family Oryziidae)**

ลักษณะลำตัวยาวเรียว แบนข้างเล็กน้อย หัวและตาโตและอยู่สูง ปากเล็กครีบหลังค่อนไปทางด้านท้าย ครีบอกอยู่ในระดับสูงเหนือช่องเหงือก ครีบหางปลายมนตัวมักใสหรือมีสีน้ำตาลอ่อน ครีบหางอาจมีสี เป็นปลาขนาดเล็กกว่า 5 ซม. อาศัยในแหล่งน้ำนิ่ง และ น้ำกร่อย อยู่เป็นฝูงใหญ่ ในบริเวณผิวน้ำ พบทั่วไปในทวีปเอเชีย ในประเทศไทยพบอย่างน้อย 5 ชนิด

**วงศ์ปลาหัวตะกั่ว (Family Aplocheilidae)**

ลักษณะรูปร่างคล้ายกับปลาข้าวสาร แต่มีขนาดใหญ่กว่ามาก หัวโต ตาโต ปากกว้างตัดตรง และ ยืดออกได้ ครีบหลังตั้งต่ำกว่าช่องเหงือก ครีบหางปลายมน แหลมเล็กน้อย เกล็ดเล็ก

มหาวิทยาลัยมหาสารคาม MAHASARAKHAM UNIVERSITY

หัวมักมีแต้มสีเงิน วาวสะท้อนแสง ตัวมีสีฟ้าอ่อน และมักมีจุดประสีสดใส ต่างๆ บนลำตัว และครีบ ขนาดใหญ่สุด 8 ซม. พบทั่วไป 6 ซม. อาศัยทั้งในแหล่งน้ำนิ่ง และ น้ำกร่อย มีการกระจายพันธุ์กว้างในเขตร้อน ตั้งแต่เอเชีย ถึง แอฟริกา ชนิดที่พบในประเทศไทย มี 1 ชนิด คือ หัวตะกั่ว

**วงศ์ปลาจิ้มฟันจระเข้ (Family syngnathidae)**

เป็นวงศ์เดียวกับม้าน้ำ รูปร่างยาวเรียว และ ลำตัวเป็นทรงสี่เหลี่ยม มีจะงอยปากยาวเป็นท่อ ปากเล็ก มีครีบหลัง และ ครีบอกอันเล็กบาง และ มักมีครีบหางอันเล็ก หรือ ไม่มี เกล็ดดัดแปลงเป็นแผ่นกระดูกแข็งหุ้มลำตัวเป็นวงหลายวง ไปจนตลอดถึงปลายหาง มีขนาดตั้งแต่ 2 ซม จนถึง 40 ซม. พบส่วนมากในทะเล และ พบในน้ำจืดทั้งแม่น้ำ และ แหล่งน้ำนิ่งที่มีคุณภาพดีเท่านั้น กินแพลงค์ตอนสัตว์ และ ลูกกุ้ง ลูกปลา ในประเทศไทย พบอย่างน้อย 25 ชนิด แต่พบในน้ำจืด 3-5 ชนิด เช่น จิ้มฟันจระเข้ยักษ์

**วงศ์ปลาจิ้มฟันจระเข้แคระ (Family Indostomidae)**

มีรูปร่างคล้ายกับปลาจิ้มฟันจระเข้ แต่มีขนาดเล็กกว่ามาก ส่วนหัวและจะงอย ปากสั้นกว่า ตาโต มีวงเกล็ดของลำตัวน้อย ส่วนหางเรียงเล็ก มีครีบหลังเป็นก้านแข็งสั้นๆ ที่ตอนหน้าของลำตัว และเป็นครีบอ่อนที่ตอนกลาง มีทั้งครีบอก ครีบท้องอันเล็ก และ ครีบก้น และ ครีบหางเป็นรูปพัด ตัวมีสีน้ำตาลอ่อนถึงคล้ำ และ มีลายสีคล้ำประ ครีบใส อาจมีประสีน้ำตาลคล้ำ ขนาดพบใหญ่สุด 3 ซม. พบทั่วไป 2 ซม. อาศัยในแหล่งน้ำนิ่งที่มีพรรณพืชหนาแน่น และ มีสภาพดีมาก รวมถึงบริเวณป่าพรุดั้งเดิม เคยมีรายงานพบว่า พบเฉพาะในทะเลสาบ Indowgi ของพม่าเท่านั้น แต่ปัจจุบันพบว่ามีชนิดใหม่ ในลุ่มแม่น้ำเจ้าพระยา ลุ่มแม่น้ำโขง ถึงภาคใต้ และ มาเลเซีย ในประเทศไทยพบ 2 ชนิด คือ Indostomus spinosus จากลุ่มแม่น้ำโขง และ บึงบอระเพ็ด แต่ปัจจุบันพบน้อยมากในบึงนี้ และ มีอีกชนิดที่พบในภาคใต้ ตั้งแต่พรุโต๊ะแดง จ. นราธิวาส ไปถึงมาเลเซีย

**วงศ์ปลาไหลนา (Family Synbranchiformes)**

มีรูปร่างเรียวยาวอย่างงู ลำตัวกลม ปลายหางแหลม ไม่มีครีบ แต่ในขณะนั้นเป็นตัวอ่อนมีครีบอกเล็กๆ ผิวมีเกล็ดละเอียดฝังอยู่ มีอวัยวะช่วยหายใจเป็นเส้นเลือดฝอยที่คอหอย มักอาศัยอยู่ในพื้นท้องน้ำริมตลิ่งโดยขุดรูอยู่และทำรังวางไข่ในรูนั้น หรืออาจอยู่ตามกอสวะรากไม้ พบทั้งในน้ำกร่อย และ น้ำจืด ตั้งแต่อินเดีย ถึง ฟิลิปปินส์ ญี่ปุ่น พบในน้ำจืดของไทย 3 ชนิด

**วงศ์ปลากระทิง (Family Mastacembelidae)**

มีรูปร่างคล้ายปลาไหล แต่มีส่วนหัวและจะงอยปากยื่นแหลม มีครีบอก ครีบหลัง และครีบก้น ครีบหางเล็ก ด้านหลังมีก้านครีบแข็งสั้นๆ แหลมคมอยู่ตลอด ตอนหน้า มีเกล็ดเล็ก ปากเล็ก และ จะงอยปาก และ ปลายจมูกเป็นงวงแหลมสั้น ๆ ปลายแฉก ตาเล็ก อาศัยอยู่ใกล้พื้นท้อง

มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

น้ำ หรือ อยู่ในโพรงไม้ และ รากไม้ พบในเขตร้อนตั้งแต่ ทวีปอัฟริกา ถึง เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ที่บอร์เนียว ประมาณ 36 ชนิด พบในไทยประมาณ 12 ชนิด

**วงศ์ปลากระจก, แป้นแก้ว (Family Ambassidae)**

มีรูปร่างเป็นรูปไข่ ส่วนหลังและ ท้องกว้าง ลำตัวแบนข้างมาก หัวโต ตาโต ปากกว้าง ครีบหลังมี 2 ตอน ตอนหน้ามีก้านแหลมแข็งแหลม ตอนท้ายมีก้านอ่อน ครีบหาง เว้าลึก ครีบก้น มีก้านแข็ง 3 อัน ครีบท้องมีก้านแข็ง 1 อัน ลำตัวมักมีลำน้ำใส หรือ ขุ่นเล็กน้อย และ มีด้านท้องสีเงิน เป็นปลากินเนื้อ พบส่วนมากในบริเวณปากแม่น้ำ อยู่รวมกันเป็นฝูง พบในเขตร้อนของชายฝั่งมหาสมุทรอินเดีย ถึง ฟิลิปปินส์ และ ออสเตรเลีย ในแหล่งน้ำจืดของไทยพบ 5 ชนิด เช่น แป้นแก้ว, อมไข่น้ำจืด, แป้นแก้วยักษ์ ฯลฯ

**วงศ์ปลาเสือตอ (Family Datnioididae)**

รูปร่างลำตัวแบนข้าง ส่วนหลังยกสูง ปากกว้าง ยืดออกได้มาก เกล็ดเล็กละเอียด ครีบหลังมี 2 ตอน ต่อเนื่องกันเป็นส่วนของก้านครีบแข็ง และ ก้านครีบอ่อน ครีบหางมน ครีบก้นสั้น ก้านครีบอันที่ 2 ยาวที่สุด ตัวมักมีแถบสีดำพาดขวางส่วนหัว และ ตัวถึงคอดหาง 5-8 บั้ง ขนาดใหญ่สุดถึง 50 ซม. อาศัยในแม่น้ำและที่น้ำหลาก พบทั้งในน้ำจืด และ น้ำกร่อยของเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ถึง นิวกินี รวม 5 ชนิด ที่พบในประเทศไทย มี 3 ชนิด เช่น เสือตอ

**วงศ์ปลาม้า, ปลาจวด (Family Sciaenidae)**

เป็นปลาทะเลส่วนมาก มีส่วนหัวโต จะงอยปากยื่นยาว แต่ปลายมน ตาโต ตั้งอยู่ค่อนไปทางด้านบนของหัว ปากมักอยู่ไปทางด้านล่าง ริมฝีปากบาง มีฟันเป็นเขี้ยวซี่เล็กๆ มักมีรูเล็กๆ อยู่ใต้คาง ครีบหลังยาวและเว้าเป็น 2 ตอน ส่วนโคนหางมักขอดกิ่ว หางอาจมีปลายแหลม หรือ ตัดตรง เกล็ดเล็ก เกล็ดบนเส้นข้างตัวขึ้นเลยไปถึงปลายครีบหาง ครีบท้องตั้งอยู่ใต้ครีบอก มีกระเพาะลมอันใหญ่ และ มีกล้ามเนื้อรอบซึ่งทำเสียงได้เวลาถูกจับ พบในเขตร้อนรอบโลกมากกว่า 270 ชนิด พบในน้ำจืดน้อยชนิดแต่ส่วนมากพบในน้ำกร่อย ในประเทศไทยพบเกือบ 40 ชนิด แต่ที่พบในน้ำจืดมีเพียง ชนิดเดียว คือ ม้า

**วงศ์ปลากุเรา (Family Polynemidae)**

มีรูปร่างทรงกระบอกสั้น ลำตัวแบนข้างเล็กน้อย ส่วนหัวและจะงอยปากทู่ ปากกว้างอยู่ด้านล่างของจะงอยปาก ตาเล็กมีเยื่อไขมันปกคลุม ตั้งอยู่ตอนปลายของหัว ครีบหลังแบ่งเป็น 2 ตอนห่างกัน ตอนแรกเป็นก้านแข็งอันสั้น ตอนท้ายเป็นก้านอ่อน ครีบหางเว้าลึก ครีบอกเป็น 2 ส่วน ส่วนบนเป็นครีบยาวแหลมส่วนล่างเป็นเส้นยาวแยกออกเป็นเส้นๆ ตั้งแต่ 4 – 14 เส้น มีความยาวแล้วแต่ชนิด เกล็ดเล็กเป็นแบบขอบหยัก (Ctenoid) เป็นปลากินเนื้อ กินกุ้ง ปู และปลาเล็ก หาเหยื่อ และ สัมผัสได้ด้วยครีบอกที่เป็นเส้น พบส่วนมากในทะเล และ น้ำกร่อย ในน้ำจืด

พบน้อยชนิด พบทั้งหมดประมาณ 30 ชนิด ในประเทศไทยมีประมาณ 10 ชนิด และ 2 ชนิดอยู่ในน้ำจืด คือ หนวดพราหมณ์

**วงศ์ปลาเสือพ่นน้ำ (Family Toxotidae)**

รูปร่างเป็นสามเหลี่ยม ส่วนหัวและจะงอยปากยื่นแหลม ตาโต ปากกว้างอยู่ปลายสุดของหัว และ ยืดหดริมฝีปากได้ดี ด้านหน้า และ ด้านหลังเป็นแนวตรง ครีบหลังอยู่ค่อนไปทางด้านท้าย มีก้านแข็ง 4 – 5 อัน ครีบหางปลายตัด ครีบอก และ ครีบท้องเล็ก เกล็ดเล็ก ตัวมักมีลายเป็นดวงดำขนาดใหญ่บนพื้นสีขาว มีความสามารถพิเศษ คือ พ่นน้ำ จับแมลงที่อยู่สูงขึ้นไปจากผิวน้ำได้ถึง 1 เมตรกว่า มักว่ายหากินอยู่ใกล้ผิวน้ำ เป็นฝูงเล็ก ๆ ว่องไวมาก อาศัยในแม่น้ำ และ น้ำกร่อยปากแม่น้ำ พบทั่วไปในเขตร้อน ของเอเชีย ถึง ออสเตรเลีย ในประเทศไทยพบ 3 ชนิด คือ เสือพ่นน้ำ , เสือดำ ฯลฯ

**วงศ์ปลาบู่ (Family Gobiidae)**

เป็นวงศ์ที่มีจำนวนชนิดมากที่สุดของปลาในโลก พบอาศัยทั้งในทะเลลึกกว่า 60 ม. ถึงลำธารในที่สูงกว่า 1,000 เมตร พบทั่วไปในเขตร้อนและเขตอบอุ่นมากกว่า 1,950 ชนิด และ ในประเทศไทยมากกว่า 300 ชนิด มีลักษณะที่ต่างจากปลาอื่น คือ มีลำตัวทรงกระบอก หรือ ยาว ส่วนหัวและจะงอยปากบน มีเส้นข้างตัว และ แถวของรูปลายประสาทอยู่บนหัวหลายแถว ครีบหลังแยกเป็น 2 ตอน ชัดเจน ครีบหางมนกลม ครีบก้นยาว ครีบอกใหญ่ ครีบท้องใหญ่จะแยกจากกันใน วงศ์ ปลาบู่ทราย แต่จะเชื่อมติดกันเป็นถ้วยส่วนมากในวงศ์ ปลาบู่ เกล็ดมีทั้งขนาดเล็กและใหญ่ เป็นปลากินเนื้อ กินแมลง สัตว์น้ำขนาดเล็ก และ ปลา วางไข่โดยตัวผู้ และ ตัวเมียช่วยกันดูแล โดยไข่ติดกับวัสดุเป็นแพ ไข่มีรูปร่างคล้ายผลองุ่น เมื่อฟักตัวจะปล่อยให้หากินเอง มีบางชนิดเท่านั้นที่มีขนาดใหญ่ ส่วนมากมีขนาดเล็กยาวไม่เกิน 20 ซม. อาศัยอยู่ในทะเล และ น้ำกร่อยเป็นส่วนมาก พบน้อยชนิดในน้ำจืด ในไทยพบประมาณ 20 ชนิด เช่น ปลาบู่ทราย

**วงศ์ปลาหมอ (Family Anabantidae)**

มี 1 ชนิดในประเทศไทย คือ ปลาหมอ รูปร่างป้อม ลำตัวแบนข้าง ส่วนหัวสั้นปลายมน ตาโต ปากกว้าง ขอบฝาปิดเหงือกเป็นหยักแข็ง เกล็ดใหญ่คลุมทั่วตัว เส้นข้างตัวขาดตอน ครีบหลังยาวเกือบเท่าความยาวลำตัว มีก้านแข็งแหลม จำนวนมาก เช่นเดียวกับครีบก้น แต่ ครีบก้นสั้นกว่า ครีบอกเล็กรูปไข่ ครีบหางปลายมน ตัวมีสีเขียว มะกอก และ มีลายประสีคล้ำที่ข้างลำตัว ครีบใส ด้านท้องสีเหลือง ขอบฝาปิดเหงือกตอนบนมีแต้มสีดำ มีอวัยวะช่วยหายใจ ขนาดพบใหญ่สุด 20 ซม. พบทั่วไป 10 – 13 ซม. พบในแหล่งน้ำนิ่งส่วนมากในทุกภาค จับได้โดย อวนลาก แห ข่าย เบ็ดธง บ่อล่อปลา ลอบ ไซ ยอก และ เบ็ดตก สามารถแถกขึ้นบก ไปหาที่กินใหม่ ได้เมื่อมีฝนตกน้ำหลาก โดยใช้ขอบฝาปิดเหงือกช่วยใน การเคลื่อนที่

มหาวิทยาลัยมหาสารคาม MAHASARAKHAM UNIVERSITY

**วงศ์ปลาสลิด, กัด (Family Belontidae)**

เป็นวงศ์ปลาที่มีลักษณะพิเศษคือ มีอวัยวะช่วยหายใจในช่องเหงือก ตอนบน และ ทำรัง หรือก่อหวอด เพื่อวางไข่ มักมีรูปร่างเรียวยาว หรือ รูปไข่ ลำตัวแบนข้าง ส่วนหัวโต ตาโต ปากเล็ก ครีบหลังสั้น แต่ครีบก้นยาวมาก มีครีบท้องอันเล็ก หรือ เป็นเส้นยาวเรียว ครีบหาง เว้าตื้น เกล็ดเล็กเป็นแบบขอบหยัก พบประมาณ 15 ชนิดในไทย มักมีขนาดเล็ก และ มีสีสันสวยงาม เปลี่ยนสีได้ดีตามสถานการณ์ ส่วนมากมีประโยชน์ เป็นปลาสวยงาม เช่น ปลากัดต่างๆ ปลากริม กระดี่มุก ฯลฯ

**วงศ์ปลาหมอตาล (Family Helostomidae)**

โค้งลาด เกล็ดใหญ่ ครีบหลัง และ ครีบก้นยาว มีก้านครีบแข็งจำนวนมาก ครีบหางมน ครีบท้องเป็นเส้นยาว ตัวมีสีเขียวอ่อนเหลือบด้านบน ตาแดง ด้านข้างลำตัวสีเขียวมะกอกเหลือบเงิน หรือ น้ำตาลอ่อน มีแถบสีจางตามแนวเกล็ด ครีบหลัง และ ครีบก้นสีคล้ำ ครีบหางสีจาง ขนาดพบใหญ่สุด 25 ซม. พบทั่วไป 10 – 15 ซม. อาศัยในแม่น้ำและแหล่งน้ำนิ่งที่มีพืชน้ำขึ้น จับได้โดยข่ายลอย ไซ ลอบ และ แห ใช้ประโยชน์โดยบริโภคแบบปรุงสด ๆ และ ทำปลาแห้ง เคยพบมากในแม่น้ำเจ้าพระยา แต่ปัจจุบันพบน้อยลงมาก และ พบบ้างในภาคใต้ ถึง มาเลเซียในปลาที่มีสีเผือกนิยมเลี้ยงเป็นปลาสวยงาม เรียกปลาจูบ

**วงศ์ปลาแรด (Family Osphronemidae)**

เป็นปลากลุ่มของปลาที่มีอวัยวะช่วยหายใจที่มีขนาดใหญ่ที่สุด พบทั้งหมด 4 ชนิด ตั้งแต่ไทย ถึง กัมพูชา ถึงบอร์เนียว แต่พบในไทยเพียงชนิดเดียว คือ ปลาแรด

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

**วงศ์ปลาช่อน (Family Channidae)**

รูปร่างทรงกระบอกเพรียว ส่วนหัวโต จะงอยปากยื่น ปากกว้าง ตาโต มีฟัน เป็นเขี้ยวบนขากรรไกร ส่วนหัวดูจากตอนบน โค้งมนคล้ายหัวของงู หัวด้านบนราบ ลำตัวค่อนข้างกลม ครีบหลังและครีบก้นยาว ครีบหางปลายมน ครีบอกใหญ่ ครีบท้องเล็ก เกล็ดใหญ่มีขอบเรียบ ปลาช่อนมีอวัยวะช่วยหายใจเป็นหงอกเนื้อสีแดง อยู่ในคอหอย จึงสามารถอยู่ในแหล่งน้ำที่มีอ็อกซิเจนต่ำได้ วางไข่โดยตัวผู้และตัวเมียช่วยกันปรับพื้นที่น้ำตื้นๆ ให้เป็นแปลงกลม แล้ววางไข่ลอยเป็นแพ ตัวผู้เป็นผู้ดูแลจนฟักแล้วเลี้ยงลูกจนโต เรียก “ ลูกครอก “ มีสีแดง,ส้ม รูปร่างคล้ายพ่อแม่ จึงปล่อยให้หากินเอง พบในเขตร้อนของอัฟริกา และ เอเชีย มีประมาณ 20 ชนิด ในไทยพบ 7 ชนิด

**วงศ์ปลานิล (Family Cichlidae)**

เป็นวงศ์ปลาที่มีหลายร้อยชนิด พบในเขตร้อนของอเมริกา แอฟริกา ถึง ศรีลังกา เป็นวงศ์ที่รู้จักกันดีจากปลาสวยงามเป็นส่วนมาก เช่น ปลาเทวดา ปลาออสการ์ ปลาหมอสี ฯลฯ แต่ที่เลี้ยงเพื่อเป็นอาหารมีอยู่ 3 ชนิด คือ ปลานิล ปลาหมอเทศ และ ปลาหมอเทศข้างลาย มีถิ่นกำเนิดในลุ่มแม่น้ำไนล์ และ อื่นๆ ในทวีปอัฟริกาจนถึงอียิปต์ ถูกนำเข้ามาในประเทศไทยในปี 2508 เป็นปลาเศรษฐกิจที่สำคัญของไทยชนิดหนึ่ง และ พบแพร่พันธุ์ทุกแหล่งน้ำของไทย

**วงศ์ปลายอดม่วง (Family Cynoglossidae)**

รูปร่างเรียวยาวส่วนท้ายแหลมดูคล้ายใบมะม่วง ตาเล็กจะงอยปากงุ้ม ปลายริมฝีปากบนเป็นติ่งแหลมโค้ง ปากค่อนข้างกว้าง ส่วนหัวหันไปทางซ้ายโดยที่ซีกขวา อยู่ด้านบน ต่างจากปลาใบไม้ ส่วนมากเป็นปลาทะเล พบในน้ำจืดน้อยชนิด ในไทยพบมากกว่า 20 ชนิด แต่พบในแม่น้ำเพียง 2 ชนิด

**วงศ์ปลาปักเป้า**

วงศ์ปลาปักเป้ามีอยู่ด้วยกันทั้งหมด 3 วงศ์ คือ Diodontidae ปลาในวงศ์นี้มีฟัน 2 ซี่ Tetraodontidae ปลาในวงศ์นี้มีฟัน 4 ซี่ และ Triodontidae ปลาในวงศ์นี้ลักษณะลำตัวแบนข้าง สำหรับในเมืองไทยพบปลาทั้ง 3 วงศ์นี้ ทั้งหมด 28 ชนิด

มีรูปร่างที่เฉพาะตัวคือ กลมป้อม ส่วนโคนหางเล็ก มีครีบหลังและครีบก้นเล็กสั้นอยู่ค่อนไปทางซ้าย ครีบอกใหญ่รูปกลมมน ครีบหางใหญ่ปลายมน ว่ายน้ำโดยใช้ครีบอกโบกพร้อมหับครีบหลัง และ ครีบ ช่องเหงือกเล็ก หัวโต จะงอยปากยื่นมีฟันเป็นปากนกแก้ว ตาโตอยู่ค่อนไปทางด้านบนของหัว รูจมูกเป็นติ่งสั้นๆ ผิวขรุขระมีหนามเล็กๆ อยู่บริเวณผิว ด้านท้อง ผิวลำตัวส่วนอื่น ๆ จะเรียบ พบมากในทะเลเขตร้อนรอบโลก และ พบในปากแม่น้ำ เป็นปลาน้ำจืดเพียง 12 ชนิด ๆที่เคยพบในไทย ได้แก่ ปักเป้าเขียว, ปักเป้าดำ

สถาบันวิทยบริการ
CHULALONGKORN UNIVERSITY

## 2.3 การจำแนกกลุ่มปลาปักเป้าในประเทศไทย

**ลักษณะทั่วไปของปลาวงศ์ปลาปักเป้าในประเทศไทย**

ในประเทศไทยพบปลาปักเป้าน้ำจืด 3 สกุล 12 ชนิด Smith (1945) และ Vidthayanon และคณะ (1997) ได้รายงานไว้ คือ สกุล *Carinotetraodon* ได้แก่ ปลาปักเป้าเหลืองตัวจ้อย (*Carinotetraodon travancoricus*) และปลาปักเป้าตาแดง (*C. lorteti*) สกุล *Chonerhinus* ได้แก่ ปลาปักเป้าทอง (*Ch. modestus*) สกุล *Tetraodon* ได้แก่ ปลาปักเป้าดำ (*T. cochinchinensis*) ปลาปักเป้าควาย (*T. suvattii*) ปลาปักเป้าท้องตาข่าย (*T. palembangensis*) ปลาปักเป้าจุดส้ม (*T. abei*) ปลาปักเป้าขน (*T. baileyi* ) ปลาปักเป้าบึง (*T.*

*brevirostris*) ปลาปักเป้าปากขวด (*T.  cambodgensis*) ปลาปักเป้าหางวงเดือน (*T. cutcutia*) และปลาปักเป้าเขียว (*T. fluviatilis)* แต่ละชนิดมีลักษณะคล้ายคลึงกัน โดยทั่วไปจะมีรูปร่างเฉพาะตัว คือ กลมป้อม ส่วนโคนหางเล็ก ครีบหลังและครีบก้นเล็กสั้นอยู่ค่อนไปทางท้าย ครีบอกใหญ่กลมมน ครีบหางใหญ่ปลายมน ว่ายน้ำโดยใช้ครีบอกโบกพร้อมกับครีบหลังและครีบก้น สามารถพองตัวได้โดยสูบน้ำหรือลมเข้าในช่องท้อง มีช่องเหงือกเล็ก มีลักษณะหัวโต จะงอยปากยื่น มีฟันลักษณะคล้ายปากนกแก้ว 4 ซี่ ตาโตอยู่ค่อนไปทางด้านบนของหัว รูจมูกเป็นติ่งสั้น ๆ ผิวขรุขระ มีเกล็ดเป็นหนามเล็ก ๆ อยู่บริเวณด้านท้อง ผิวลำตัวส่วนอื่นเรียบ พบมากในบริเวณทะเลเขตร้อนทั่วโลกและบริเวณปากแม่น้ำ ชนิดที่พบในน้ำจืดจะมีน้อยกว่าในน้ำทะเลและน้ำกร่อย ปลาปักเป้ากินอาหารโดยกินปลาขนาดเล็กที่อาศัยภายในแหล่งน้ำ เพราะมีฟันที่แหลมคม ส่วนมากนำปลาปักเป้ามาเลี้ยงเป็นปลาสวยงาม ไม่นิยมนำมาประกอบอาหารเนื่องจากบางชนิดที่พบในประเทศไทยมีพิษ เมื่อรับประทานเข้าไปอาจจะทำให้เกิดอันตรายถึงชีวิตได้ในประเทศไทยมีการนำปลาปักเป้ามาจำหน่ายในท้องตลาดในชื่อ “ปลาเนื้อไก่” ซึ่งผู้บริโภคอาจได้รับพิษสารเตร็ทโทรโดท็อกซิน (Tetrodotoxin) ทำให้รู้สึกมีอาการชาที่ริมฝีปาก ลิ้น ปลายนิ้วมือ คลื่นไส้ วิงเวียนศีรษะ แขนขาไม่มีแรง ยืนและเดินไม่ได้ หายใจลำบาก หมดสติ และอาจจะอันตรายถึงขั้นเสียชีวิตในเวลาอันรวดเร็วได้ ในหนังปลา ไข่ปลา เนื้อปลา ตับ และลำไส้ มีความทนต่อความร้อนสูง ความร้อนในการปรุงอาหาร การหุงต้ม การ แปรรูปไม่สามารถทำลายสารพิษดังกล่าวได้

ปลาปักเป้าจะพบปะปนจำหน่ายเป็นเนื้อปลาที่แล่แล้วในราคาถูก ในท้องตลาดเรียกว่าปลาไก่ สำหรับปลาปักเป้าที่มีรายงานพบในประเทศไทยมีจำนวน 28 ชนิด เป็นปลาน้ำจืด 12 ชนิด (คมกริช หาสิตะพันธุ์, 2555) การจัดจำแนกวงศ์ปลาสวายตาม Nelson, J. S. (2004)

Kingdom Animalia

Phylum Chordata

Subphylum Vertebrata

Class Actinopterygii

Order Tetraodontiformes

Family Tetraodontidae (มีฟัน 4 ซี่)

Family Triodontidae (มีฟัน 3 ซี่)

Family Diodontidae (มีฟัน 2 ซี่)

## 2.4 การศึกษาโครโมโซม

การศึกษาโครโมโซมนอกจากต้องเลือกเซลล์ระยะเมทาเฟส (metaphase) ที่โครโมโซมมีการหดสั้นมากที่สุด และต้องอาศัยเทคนิคเพื่อช่วยให้การศึกษาโครโมโซมทำได้ง่ายขึ้น ดังนี้

โคลชิซิน (colchicine) เป็นสารสกัดจากพืชตระกูลโคลชิคัม (colchicum) ใช้ในการหยุดกระบวนการสร้างเส้นใยสปินเดิล (spindle fiber) จะทำให้เซลล์ที่กำลังแบ่งตัวอยู่นั้นหยุดอยู่ในระยะเมทาเฟส โดยโคลชิซินจะไปอุดตามปลายท่อต่าง ๆ ของไมโครทูบูล (microtubule) ภายในเซลล์ ทำให้ไมโครทูบูลไม่สามารถต่อกันเป็นสายเส้นใยสปินเดิลในการช่วยดึงโครโมโซมระยะเมทาเฟสได้ (อมรา คัมภิรานนท์, 2546)

การใช้สารละลายไฮโปโทนิค (hypotonic solution) ได้แก่ โพเทสเซียมคลอไรด์ 0.075 โมลาร์ (0.075 M potassium chloride) หรือโซเดียมซิเตรต 1 เปอร์เซ็นต์ (1% sodium citrate) หรือแม้แต่การใช้น้ำธรรมชาติภายหลังการทำให้หยุดการสร้างเส้นใยสปินเดิล จะช่วยให้เซลล์พองตัวมากขึ้น (อมรา คัมภิรานนท์, 2546)

น้ำยาคงสภาพเซลล์ (fixative solution) ที่ใช้ในการตรึงเซลล์ เพื่อศึกษาโครโมโซมนิยมใช้น้ำยาตรึงเซลล์สูตรของคานอย (Carnoy's fixative) ซึ่งเป็นส่วนประกอบระหว่างเมทานอล (absolute methanol) 3 ส่วนกับกรดอะซิติกเข้มข้น (glacial acetic acid) 1 ส่วน น้ำยาตรึงเซลล์สูตรนี้สามารถซึมเข้าสู่เซลล์หรือเนื้อเยื่อได้เร็ว มีฤทธิ์ในการช่วยป้องกันการหดตัวหรือพองตัวของเซลล์ ช่วยรักษาโครงสร้างของไขมันซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของเยื่อหุ้มเซลล์ และช่วยป้องกันการตกตะกอนของโปรตีนต่าง ๆ ภายในไซโทพลาซึม (cytoplasm) (ประศาสตร์ เกื้อมณี, 2551)

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

### 2.4.1 เทคนิคการย้อมสีโครโมโซม

2.4.1.1 เทคนิคการย้อมสีแบบธรรมดา (conventional staining)

ในช่วงเริ่มแรกของการศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ของสิ่งมีชีวิตจะใช้วิธีการย้อมสีแบบธรรมดาหรือแบบดั้งเดิม โดยใช้สีย้อมที่ติดกรดนิวคลีอิก (nucleic acid) จึงเห็นโครโมโซมติดสีเข้มทั้งแท่ง โดยสีที่นิยมใช้ ได้แก่ ออร์ซีน (orcein) คาร์มีน (carmine) และสีที่นิยมมากที่สุด คือ จิมซ่า (Giemsa's) สามารถบอกจำนวน และชนิดของโครโมโซมประจำสิ่งมีชีวิตนั้น ๆ ได้ และอาจบอกลักษณะบางอย่างของโครโมโซม เช่น รอยคอดที่หนึ่ง (primary constriction) รอยคอดที่สอง (secondary constriction) และแซทเทลไลท์ (satellite) การติดสีของโครโมโซมดังกล่าวบางครั้งอาจพบว่ามีการติดสีได้ไม่เท่ากัน เช่น ในขณะที่โครโมโซมผ่านเข้าสู่วงชีพของเซลล์ (cell cycle) จะมีการยืดหดตัวไม่เท่ากัน ระยะใดที่หดตัวมากจะติดสีเข้มมาก แต่ถ้าหดตัวน้อยก็จะติดสีจางกว่า อีกทั้งในโครโมโซมแท่งเดียวกันติดสีได้ไม่เท่ากัน ขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของเฮเทอโรโครม

มาทิน (heterochromatin) และยูโครมาทิน (euchromatin) การย้อมสีโครโมโซมแบบธรรมดาในบางกรณีนั้น อาจจะไม่สามารถจำแนกโครโมโซมได้เท่าที่ควร คือ ไม่สามารถระบุแน่ชัดได้ว่าเป็นโครโมโซมแท่งที่เท่าใดและจับคู่ไม่ได้ (อมรา คัมภิรานนท์, 2546; อลงกลด แทนออมทอง, 2554)

2.4.1.2 เทคนิคการย้อมสีแถบสีแบบนอร์ (NOR-banding)

การย้อมแถบสีแบบนอร์ ซึ่งคำว่า NOR ย่อมาจาก nucleolar organizer region การย้อมสีแบบนี้อาจจะเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า silver staining โดยใช้สารละลาย silver nitrate เป็นสารย้อมโครโมโซมโดยจะติดส่วนของ nucleolar organizer เทคนิคนี้ใช้ตรวจหา NOR ซึ่งเป็นบริเวณของโครโมโซมที่มียีนที่เรียกว่า ribosomal gene (rDNA) ตำแหน่งของ NOR อยู่บริเวณ ก้านของ satellite chromosome หรือบริเวณรอยคอดที่สองของโครโมโซม NOR มีภาวะพหุสันฐาน (polymorphism) ได้ในโครโมโซมแท่งเดียวกันของมนุษย์ต่างบุคคลกัน จึงสามารถใช้เป็นโครโมโซมเครื่องหมายในการติดตามดูพฤติกรรมการถ่ายทอดบางลักษณะได้ ซึ่งการถ่ายทอดเป็นไปตามกฎของเมนเดล (อลงกลด แทนออมทอง, 2554)

2.4.1.3 เทคนิคการย้อมแถบสีแบบจี (G-banding)

เป็นเทคนิคที่นิยมทำกันมากที่สุดเพราะเป็นเทคนิคที่ทำได้ง่ายและวัสดุที่ใช้ย้อมไม่สิ้นเปลือง เทคนิคนี้เหนี่ยวนำให้เกิดแถบโดยใช้สารเคมีที่สามารถย่อยโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของโครโมโซม สารเคมีที่นิยมใช้ คือ เอนไซม์ทริปซิน (trypsin) แล้วจึงย้อมด้วยสีจิมซ่าตามปกติ ซึ่งก่อนย้อมสไลด์ต้องเติมเอนไซม์ย่อยโปรตีน เช่น เอนไซม์ทริปซิน หรือบ่มสไลด์ใน saline-citrate ที่ร้อน แถบที่เห็นมี 2 แบบ คือ แถบมืด (dark bands) และแถบสว่าง (light bands) หรือแถบสีเข้ม สลับกับจางบนแท่งโครโมโซม กลไกการติดสีอาศัยคุณสมบัติของความแตกต่างกันในองค์ประกอบของโปรตีนที่อยู่บนโครโมโซม จะติดสีได้ดีในส่วนของเฮเทอโรโครมาทินที่มีกรดอะมิโนไลซีน (lysine) และอาร์จินีน (arginine) อยู่หนาแน่น สายดีเอ็นเอจะพันกันแน่นเอนไซม์ทริปซินจึงเข้าไปย่อยโปรตีนได้น้อย บริเวณนี้จึงติดสีเข้ม (เกิดแถบสีมืด) ในทางตรงกันข้ามส่วนที่เป็นยูโครมาทินในแท่งโครโมโซมจะไม่ค่อยติดสี เพราะสายดีเอ็นเอพันอยู่อย่างหลวม ๆ เอนไซม์ทริปซินจึงเข้าไปย่อยโปรตีนได้มากบริเวณนี้จึงติดสีจาง โดยทั่วไปสไลด์ที่จะนำมาย้อมแบบจีควรทิ้งไว้สัก 3-5 วัน ที่อุณหภูมิห้องหรือบ่มในเครื่องกวนสารให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 56-60 องศาเซลเซียส นาน 16-18 ชั่วโมง หลังจากหยดตะกอนเซลล์บนสไลด์ สไลด์ที่หยดไว้นานต้องใช้เอนไซม์ทริปซินที่เข้มข้นกว่าหรือใช้เวลาในการย่อยนานกว่า เพื่อที่จะให้ได้แถบโครโมโซมที่ชัด ซึ่งในปฏิกิริยานี้เอนไซม์ ทริปซินจะไปสลาย (hydrolizes) สายโพลีเปปไทด์ (polypeptide) บริเวณที่มีด้านคาร์บอกซิล (carboxyl) ของกรดอะมิโนอาร์จินีนและไลซีน (อมรา คัมภิรานนท์, 2546; อลงกลด แทนออมทอง, 2554)

มหาวิทยาลัยมหาสารคาม MAHASARAKHAM UNIVERSITY

2.4.1.4 เทคนิคการย้อมแถบสีแบบจีที่ให้รายละเอียดสูง (high resolution G-banding)

สำหรับการย้อมแถบสีโดยทั่วไปจะใช้โครโมโซมในระยะเมทาเฟส ซึ่งเป็นระยะที่ดีที่สุดในการย้อมสีตรวจดูรูปร่าง เนื่องจากโครโมโซมหดสั้นที่สุด แต่มีข้อจำกัดในบางกรณีที่มีความต้องการให้ได้แถบสีจำนวนมาก และมีรายละเอียดเพิ่มขึ้น เพื่อความชัดเจนในการวิเคราะห์โรคทางพันธุกรรมบางโรค หรือตรวจสอบการเกิดการกลาย (mutation) ของชิ้นส่วนเล็ก ๆ บนโครโมโซม ดังนั้นจึงได้มีการปรับปรุงเทคนิคการเพราะเลี้ยงเซลล์ และทำให้เซลล์หยุดการแบ่งเซลล์ในระยะก่อนเมทาเฟส (prometaphase) หรือปลายโพรเฟส (late prophase) โดยทำให้เซลล์ในขวดเพาะเลี้ยงเกือบทั้งหมดอยู่ในระยะเดียวกัน (synchronize) ของวัฏจักรเซลล์ โดยใช้สารเคมี เช่น เมโทเทรกเซท (methotrexate) ไทมิดีน (thymidine) ฟลูออโรดีออกซียูริดีน (fluorodexyuridine) เป็นต้น ซึ่งจะทำให้ได้โครโมโซมที่ขนาดไม่หดสั้นมาก และไม่ยืดยาวเกินไป เรียกเทคนิคนี้ว่าการย้อมแถบสีแบบจีที่ให้รายละเอียดสูง ในกรณีของเซลล์เม็ดเลือดขาวจะเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 72-96 ชั่วโมง ในชั่วโมงที่ 72 ใส่สารเมโทเทรกเซทเพื่อหยุดเซลล์ให้อยู่ในระยะ S-phase เป็นเวลา 17 ชั่วโมง ต่อมาจึงใส่ไทมิดีนเพื่อให้เซลล์เข้าสู่วงชีพเซลล์ต่อไป เมื่อเก็บเกี่ยวเซลล์จะได้เซลล์ในระยะปลาย โพรเฟสเท่า ๆ กับระยะเมทาเฟส โดยระยะปลายโพรเฟสให้แถบที่ปรากฏบนโครโมโซมมนุษย์ 843-1,256 แถบ ต่อจำนวนชุดแฮพลอยด์ (haploid set) ส่วนระยะเมทาเฟสให้แถบที่ปรากฏ บนโครโมโซมมนุษย์ 320-554 แถบต่อจำนวนชุดแฮพลอยด์ ซึ่งจะให้รายละเอียดสูงกว่าการย้อมแถบสีแบบธรรมดา (Yunis, 1976; อมรา คัมภิรานนท์, 2546; อลงกลด แทนออมทอง, 2554)

สถาบันวิทยบริการ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

เมโทเทรกเซทเป็นอนุพันธ์ของกรดโฟลิก (folic acid, FA) โดยจัดว่าเป็นแอนติเมทาบอไลท์ (antimetabolite) คือ มีเป้าหมายในการยับยั้งเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลทรีดักเทส (dihydrofolatereductase, DHFR) การยับยั้งปฏิกิริยานี้เป็นไปอย่างสมบูรณ์แบบ เมโทเทรกเซทจะยับยั้งการเปลี่ยนไดไฮโดรโฟเลท (dihydrofolate, $FH_2$) ไปเป็นเตตระไฮโดรโฟเลท (tetrahydrofolate, $FH_4$) ซึ่งเป็นตัวให้คาร์บอนแก่การสังเคราะห์ dUMP ไปเป็น dTMP ซึ่งจำเป็นต่อการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ เซลล์จึงถูกยังยั้งก่อนที่จะสังเคราะห์ ดีเอ็นเอในระยะ $G_1$/S ของวงชีพเซลล์ เนื่องจากภาวะขาดไทมิดีน การยับยั้งโดยเมโทเทรกเซทจะถูกปลดปล่อยได้โดยการล้างออกและเติมไทมิดีน ซึ่งช่วงเวลาในการปลดปล่อยและเก็บเกี่ยวเซลล์จะต้องมีความเหมาะสม (ชาคริต ดวงใจ, 2534; Rooney and Czepulkowski, 1986; Wike, 1989; Rooney, 2001)

2.4.1.5 เทคนิคการย้อมแถบสีแบบซี (C-banding หรือ constitutive heterochromatin banding หรือ centromeric banding)

เป็นเทคนิคที่ทำให้ติดแถบสีเข้มบริเวณ constitutive heterochromatin ซึ่งเป็นบริเวณที่โครโมโซมขดตัวกันแน่น และเป็นตำแหน่งของดีเอ็นเอที่มีการเรียงตัวของเบสที่ซ้ำกัน (repeated sequence ชนิด satellite DNA) และมีการจำลองตัวเองช้าที่สุด ซึ่งได้แก่ บริเวณเซนโทรเมียร์ (centromere) ของเกือบ ทุก ๆ โครโมโซม ยกเว้นโครโมโซมวาย นอกจากนี้ยังพบบริเวณเทโลเมียร์ (telomere) ของโครโมโซมบางแท่งอีกด้วย เทคนิคนี้ทำโดยผ่านเซลล์ระยะเมทาเฟสในกรดไฮโดรคลอริก (HCl) และโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) แล้วอบเซลล์ในเกลือโซเดียมที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ย้อมด้วยสีจิมซ่า ส่วนของยูโครมาทินจะไม่ติดสี แต่เฮเทอโรโครมาทินจะติดสีเข้ม โดยโซเดียมไฮดรอกไซด์จะช่วยให้ดีเอ็นเอคลายจากเกลียวคู่เป็นสายเดี่ยว และเกลือโซเดียมจะช่วยในการจับคู่ คือ พันเกลียวจากสายเดี่ยวเป็นสายคู่ เทคนิคนี้สามารถใช้ในการศึกษาโครโมโซมเพศ เพราะโครโมโซมวายจะไม่ติดสีเข้มบริเวณเซนโทรเมียร์หรือบริเวณ constitutive heterochromatin (อมรา คัมภิรานนท์, 2546; อลงกลด แทนออมทอง, 2554)

2.4.1.6 เทคนิคการย้อมแถบสีแบบคิว (Q-banding หรือ Quinacrine banding)

เทคนิคนี้จะย้อมโครโมโซมให้เกิดแถบมืดและสว่างเป็นช่วง ๆ ตลอดความยาวแท่ง โครโมโซมได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ (fluorescence microscope) โดยใช้สีย้อมชนิด Quinacrine mustard มีลักษณะแถบที่เหมือนกับการย้อมแถบสีแบบซี และสามารถจำแนก ความแตกต่างของโครโมโซมทุกแท่งได้ โดยเฉพาะเซลล์ในระยะอินเทอร์เฟส (interphase) ของมนุษย์ เมื่อย้อมด้วยสีชนิดนี้จะทำให้โครโมโซมวายติดสีเขียวสว่างมากเรียกว่า Y-chromatin หรือ Y-body จึงเป็นการตรวจโครโมโซมวายของมนุษย์ได้อีกด้วย นอกจากจะใช้สี Quinacrine mustard ในการย้อมแล้วยังมีสีอื่น ๆ ที่ย้อม Q-band ได้เช่นกัน คือ beziimidazole derivative และพบว่าส่วนที่ติดสีเข้มเป็นบริเวณที่มีเบส A-T มาก (มียีนทำงานน้อย) ส่วนที่ติดสีจางเป็นบริเวณที่มีเบส G-C มาก (มียีนทำงานมาก) (อมรา คัมภิรานนท์, 2546; อลงกลด แทนออมทอง, 2554)

2.4.1.7 เทคนิคการย้อมแถบสีแบบอาร์ (R-banding หรือ reverse banding)

หลักการ คือ นำสไลด์ไปอบในฟอสเฟต บัฟเฟอร์ (phosphate buffer) พีเอช (pH) 6.5 ที่อุณหภูมิสูง 80-90 องศาเซลเซียส แล้วตามด้วยการย้อมสีจิมซ่าก็จะปรากฏแถบสีเข้มและจาง เช่นเดียวกับแถบสีแบบคิว และแถบสีแบบจี แต่แถบสีที่เกิดขึ้นจะตรงข้ามกับแถบสีแบบคิว และ แถบสีแบบจี คือ แถบที่ติดสีเข้มในแถบสีแบบคิว และแถบสีแบบจีจะติดสีจางแทนในแถบสีแบบอาร์ การย้อมสีแบบอาร์มักจะติดสีเข้มมากบริเวณเซนโทรเมียร์ บางครั้งจึงเรียกการ

มหาวิทยาลัยมหาสารคาม
MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ย้อมสีแบบนี้ว่าการย้อมแถบสีแบบที (T-banding) การย้อมสีแบบอาร์จะติดสีเข้มมากบริเวณที่มีเบส G-C มาก (มียีนทำงานมาก) แต่บริเวณที่ย้อมติดสีเข้มของการย้อมสีแบบจีและคิวจะติดบริเวณที่มีเบส A-T มาก (มียีนทำงานน้อย) การย้อมสีแบบอาร์ยังช่วยยืนยันโรคทางพันธุกรรมบางชนิดของมนุษย์ได้ถูกต้องมากขึ้น (อมรา คัมภิรานนท์, 2546; อลงกลด แทนออมทอง, 2554)

2.4.1.8 เทคนิคการย้อมสีโครโมโซมแถบสีแบบแด็บปี่ (DAPI banding)

จุดประสงค์ของการย้อมสีแบบแด็บปี่ เพื่อทำให้การจับคู่ของโครโมโซมถูกต้อง เป็นการย้อมโดยใช้ 4', 6'- ไดอะมิโน-2-ฟีลนิวลินโดน ไดไฮโดรคลอไรด์ (4', 6'- diamidino-2-phenylindole dihydrochloride) ซึ่งเมื่อย้อมโครโมโซมแล้วนำไปส่องกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ จะเห็นโครโมโซมติดสีฟ้าหรือสีอื่น ๆ จากนั้นเปลี่ยนสัญญาณจากภาพกล้องฟลูออเรสเซนซ์ให้เป็นแถบสีแบบแด็บปี่ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ ภาพที่ได้จะเหมือนกับการย้อมสีแบบจี ภายหลังจากที่ติดฉลากด้วยโมเลกุลของสารเคมีที่สามารถถูกติดตามได้ด้วยสารเรืองแสง นอกจากสี DAPI ที่ให้สีฟ้าแล้ว ยังสามารถย้อมสีโครโมโซมด้วยสารเรืองแสงโพรพิเดียมไอโอดาย (propidiumiodide) ทำให้โครโมโซมติดสีส้ม (อลงกลด แทนออมทอง, 2554)

2.4.1.9 เทคนิคการย้อมสีบนโครโมโซมด้วยเทคนิค FISH (fluorescence *in situ* hybridization หรือ FISH)

เทคนิค FISH เป็นเทคนิคที่ทำให้เกิดการเข้าคู่หรือไฮบริไดซ์ (hybridize) ระหว่างโพรบ (probe) และดีเอ็นเอเป้าหมาย (target DNA) ซึ่งอยู่ภายในโครโมโซม โพรบที่ใช้มักเป็นดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอ (DNA probe หรือ RNA probe) ซึ่งติดฉลาก (lebel) ด้วยสารเรืองแสง (fluorocein หรือ fluorophore) มีหลายสี การตรวจสอบจะทำให้เห็นสีหลายสีบนแท่งโครโมโซม ทำให้ดูเหมือนการระบายสีบนโครโมโซม จึงนิยมเรียกเทคนิค FISH อีก อย่างหนึ่งว่า “chromosome painting”

การย้อมแถบสีโครโมโซมแบบต่าง ๆ นี้มีประโยชน์ช่วยในการจับคู่โครโมโซมคู่เหมือน (homologous chromosome) ช่วยตรวจสอบเอกลักษณ์ของโครโมโซม ช่วยตรวจสอบความ ผิดปกติของโครโมโซม ช่วยตรวจสอบพฤติกรรมของโครโมโซมและช่วยในการจำแนกสิ่งมีชีวิตได้ถูกต้องยิ่งขึ้น การเปรียบเทียบทางพันธุศาสตร์เซลล์ (comparative cytogenetics) ยังเป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อช่วยอธิบายวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตได้ (อมรา คัมภิรานนท์, 2546)

**แคริโอไทป์และอิดิโอแกรม**

แคริโอไทป์ หมายถึง การนำเอาโครโมโซมแต่ละแท่งจากเซลล์ในระยะเมทาเฟส (โดยอาศัยจากเซลล์ใดเซลล์หนึ่งเท่านั้น) มาเรียงโดยการจับคู่โครโมโซมคู่เหมือนไว้ด้วยกัน เรียงตามลำดับจากขนาดใหญ่ไปหาเล็ก การวางโครโมโซมจะวางโดยใช้แขนข้างสั้นตั้งขึ้น และนิยมวาง

มหาวิทยาลัยมหาสารคาม MAHASARAKHAM UNIVERSITY

โครโมโซมเพศอยู่ที่มุมล่างขวา อิดิโอแกรมเป็นอีกคำหนึ่งที่คล้ายกับแคริโอไทป์แต่ไม่เหมือนกัน เพราะอิดิโอแกรมจะหมายถึงการเขียนภาพโครโมโซมแต่ละแท่งแล้วนำมาจัดเรียงเป็นหมวดหมู่ โดยโครโมโซมเหล่านี้ถูกวาดมาจากหลาย ๆ เซลล์เมทาเฟส ทั้งนี้เพื่อให้ภาพเขียนโครโมโซมมีลักษณะถูกต้องได้สัดส่วนเหมือนของจริงมากที่สุด

## 2.5 การศึกษาระดับโมเลกุล

ข้อมูลทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตถูกเก็บไว้ในยีน (gene) ซึ่งเป็นหน่วยพันธุกรรม หรือหน่วยควบคุมลักษณะ เป็นส่วนของดีเอ็นเอที่มีการเรียงตัวแบบอย่างเป็นระเบียบอยู่บนโครโมโซม ประกอบด้วยส่วนที่ควบคุมการแสดงออก (promoter) และส่วนโครงสร้าง (structural) ความแตกต่างของยีนเกิดขึ้นจากการเรียงตัวของลำดับของนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) ที่แตกต่างกัน การแสดงออกของยีนจะแสดงออกในรูปของลักษณะทางฟีโนไทป์ (phenotype) ข้อมูลทางพันธุกรรมเหล่านี้มีการแสดงออกผ่านทางอาร์เอ็นเอ ซึ่งเกี่ยวข้องกับขบวนการสร้างโปรตีนที่มีความจำเพาะต่อลำดับนิวคลีโอไทด์นั้นๆ ลักษณะต่างๆที่ปรากฏในสิ่งมีชีวิตเกิดจากผลรวมของการทำงานร่วมกันของโปรตีนต่างๆนั่นเอง กระบวนการปรับปรุงพันธุ์เป็นกระบวนการที่ทำการศึกษาและนำเอาลักษณะทางพันธุกรรมต่างๆ ที่ต้องการในสิ่งมีชีวิตมาใช้ จึงมีความจำเป็นที่ต้องใช้เครื่องมือที่มีความแม่นยำในการแยกความแตกต่างของลักษณะที่แสดงออกในสิ่งมีชีวิตในสายพันธุ์ที่แตกต่างกันได้

**เครื่องหมาย (marker)** คือตัวบ่งชี้ที่มีความจำเพาะเจาะจงในด้านต่างๆ ในกระบวนการปรับปรุงพันธุ์ได้นำเอาเครื่องหมายที่เป็นเครื่องบ่งชี้ลักษณะทางด้านการเกษตรต่างๆ มาใช้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการปฏิบัติให้สูงขึ้น ซึ่งเครื่องหมายที่ใช้สามารถแบ่งออกเป็น 3 ประเภทคือ

**1. Morphological markers** เป็นตัวบ่งชี้ทางสรีรวิทยา ลักษณะทางสรีรวิทยาคือลักษณะที่ปรากฏโดยทั่วไปที่สามารถสังเกตได้ ไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือใดๆเป็นตัวบ่งชี้ เป็นลักษณะที่แสดงออกภายนอก เช่น ลักษณะความสูง, ลักษณะสี, ลักษณะความแตกต่างของใบ ขนจะงอยปาก เป็นต้น

**2. Biochemical markers** คือการใช้โมเลกุลทางชีวเคมีเป็นตัวระบุถึงความแตกต่างในพืชที่ทำการศึกษา เช่น การใช้ isozyme หรือ protein ในการศึกษาพืช หรือสัตว์ต่างชนิดหรือต่างพันธุ์

**3. Molecular markers** คือการใช้ดีเอ็นเอมาเป็นเครื่องหมายในการตรวจสอบถึงความแตกต่างในระดับของยีน หรือดีเอ็นเอในพืชที่เราทำการศึกษา ซึ่งมีความถูกต้องแม่นยำ และมีความจำเพาะมากกว่าเครื่องหมายชนิดอื่น

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

เครื่องหมายโมเลกุล หรือเครื่องหมายดีเอ็นเอ คือ ลำดับเบสช่วงหนึ่งบนโครโมโซมซึ่งสามารถบ่งบอกตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่งบนโครโมโซมที่ตรวจสอบได้ และมีการถ่ายทอดไปสู่รุ่นลูกได้ ชนิดของเครื่องหมายดีเอ็นเอเครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) ที่นำมาใช้ในการตรวจสอบสามารถแบ่งตามหลักการได้ 2 ชนิดคือ

วิธีการ RFLP (restriction fragment length polymorphism) เป็นวิธีที่ใช้ตัวตรวจสอบ (probe) ซึ่งเป็นชิ้นส่วนดีเอ็นเอสายเดี่ยวขนาดเล็กที่ทราบลำดับเบส และมีความสามารถในการเข้าคู่กับสายดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสเป็นคู่สม ร่วมกับดีเอ็นเอเป้าหมายที่ถูกตัดย่อยด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzymes) โดยอาศัยหลักการการเข้าคู่กันของดีเอ็นเอคู่สม (DNA hybridization) ความแตกต่างที่ตรวจพบแสดงถึงความหลากหลายของตำแหน่งจดจำ (recognition site) ของเอ็นไซม์ตัดจำเพาะบนจีโนมนั้นๆ

เทคนิค PCR (polymerase chain reaction) เป็นวิธีการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอขึ้นในหลอดทดลองด้วยการทำปฏิกิริยาอย่างต่อเนื่องเป็นลูกโซ่โดยอาศัยเอ็นไซม์ DNA polymerase ในการทำปฏิกิริยา ซึ่งเทคนิค PCR มีข้อดีคือใช้ปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นน้อย ใช้ระยะเวลาสั้น แรงงานน้อย ค่าใช้จ่ายต่ำ และแปลผลง่าย เครื่องหมายดีเอ็นเอที่ได้รับการพัฒนามาจากเทคนิค PCR สามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภทคือ

-ประเภทที่มี primer ชนิดจำเพาะเจาะจง (specific primer) เครื่องหมายชนิดนี้ ได้แก่ Sequence-tagged site (STS) และ SSLP (simple sequence length polymorphism) หรือ microsatellite เป็นต้น

-ประเภทที่มี primer ชนิดไม่จำเพาะเจาะจง (random primer) ได้แก่ RAPDs (random amplified polymorphic DNAs) และ AFLP (amplified fragment length polymorphism) เป็นต้น

การพัฒนาการศึกษาทางด้านพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุล (Molecular genetics) ซึ่งเป็นการศึกษาลึกลงไปถึงความแตกต่างระดับโมเลกุลของยีนที่ทำหน้าที่เป็นส่วนควบคุมการแสดงออกของลักษณะต่างๆในสิ่งมีชีวิต จึงมีประโยชน์ที่จะนำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ การใช้เครื่องหมายระดับโมเลกุล (molecular markers) เป็นการใช้ดีเอ็นเอเพื่อเป็นเครื่องหมายในการตรวจสอบในระดับของยีน หรือดีเอ็นเอ ถูกนำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืช พันธุ์สัตว์ในหลายๆด้าน เช่น

การนำเอา molecular markers มาใช้ในการทำแผนที่ทางพันธุกรรม (genetic mapping) และการหาตำแหน่งของยีน (gene tagging) เป็นการใช้ molecular markers ในการกำหนดตำแหน่งบนจีโนม เพื่อเป็นการวางแผนผังในจีโนม และนำข้อมูลที่ได้มาใช้ในการหาตำแหน่งของยีนที่ควบคุมลักษณะตามที่ต้องการว่าอยู่บนตำแหน่งไหนของโครโมโซม นำมาใช้ใน

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

การแยกยีน และเพิ่มจำนวน (clone) ให้ได้ปริมาณตามที่ต้องการ เพื่อประโยชน์ในการนำมาใช้ในการส่งถ่ายเข้าสู่พืชที่ปราศจากยีน ซึ่งเป็นวิธีในการปรับปรุงพันธุ์อีกวิธีหนึ่ง

RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNAs) หมายถึง การตรวจสอบความแตกต่างหรือความหลากหลายของชิ้นดีเอ็นเอซึ่งถูกทำให้เพิ่มปริมาณโดยปฏิกริยาลูกโซ่จำลองตัว (Polymerase Chain Reaction; PCR) แบบสุ่ม เราสามารถทำให้สารพันธุกรรมจำลองตัวเองได้ในหลอดทดลอง (in vitro) โดยมีองค์ประกอบสำคัญคือ เอ็นไซม์จำลองตัวชนิดทนความร้อน (Taq DNA polymerase), สารพันธุกรรมต้นแบบ (DNA template), ชิ้นดีเอ็นเอรหัสเริ่มต้นจำลองตัว (primer), และองค์ประกอบย่อยของดีเอ็นเอ (deoxynucleotide; dNTPs) เนื่องจากชิ้นดีเอ็นเอที่ใช้เป็นรหัสเริ่มต้นมีขนาดที่สั้น (ประมาณ 10 เบส) จึงสามารถเข้าคู่กับสารพันธุกรรมต้นแบบได้หลายตำแหน่งโดยสุ่ม หากการเข้าคู่นั้นเกิดขึ้นในทิศทางที่เหมาะสมก็จะทำให้เกิดการจำลองตัวของชิ้นดีเอ็นเอ ซึ่งความแตกต่างของสารพันธุกรรมนี้ได้ก่อให้เกิดความแตกต่างในความสามารถของการเกิดการจำลองตัวและขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกจำลองตัว

เทคนิค RAPD ได้ถูกพัฒนาโดยนักวิทยาศาสตร์ 2 กลุ่ม คือ Welsh and McClelland (1990) และ Williams *et al.* (1990) หลักการของเทคนิคนี้คือ การใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบมาโดยสุ่มซึ่งจะ สามารถที่จะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในจีโนม ให้ได้ผลผลิตของ PCR ได้หลายๆ ชิ้น ที่แสดงความหลากหลายในหลายระดับตั้งแต่ตัวอย่างภายในประชากร ระหว่างประชากร และระหว่างชนิด (Hadrys *et al*., 1992) แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏนั้นจะได้มาจากหลายส่วนในจีโนม ทั้งส่วนที่อนุรักษ์ (Conserved region) ส่วนที่แสดงความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง ส่วนที่เป็นส่วนของยีนและที่ไม่ใช่ยีน ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิค RAPD สามารถนำไปพัฒนาเป็นโมเลกุลเครื่องหมาย ที่ใช้ประยุกต์ใช้ในงานส่วนอื่นๆ

ไพรเมอร์ที่ใช้มีขนาด 8-12 คู่เบส โดยมีหลักการง่ายๆ ว่าไพรเมอร์ควรมีเองประกอบของเบส G+C มากกว่า 50% และมีลำดับเบสแบบสุ่ม ซึ่งการทำ PCR นั้นจะใช้อุณหภูมิ annealing ต่ำๆ ไพรเมอร์แบบสุ่มนี้จะสามารถจับดีเอ็นเอต้นแบบได้หลายตำแหน่ง และความหลากหลายจะแสดงในลักษณะมีและไม่มีของแถบดีเอ็นเอแต่ละแถบ โดยแต่ละแถบถือให้เป็น 1 ตำแหน่ง (Locus)

เทคนิค ISSR มีหลักการคล้ายคลึงกับเทคนิค RAPD แต่ไพรเมอร์ที่ใช้จะเป็น ลำดับเบสซ้ำอย่างง่ายๆ (Simple repeat ) เช่น $(AG)_8G$ $(GA)_8$ YC $(ATG)_8$ เป็นต้น เทคนิคนี้ในทางทฤษฎีมีเปอร์เซ็นต์การทำซ้ำ ของแถบดีเอ็นที่ได้ดีกว่า RAPD เนื่องจากไพรเมอร์ที่ใช้มีความยาวมากกว่า จึงสามารถทำปฏิกิริยา PCR ที่อุณหภูมิสูงกว่า RAPD นอกจากนี้ไพรเมอร์ ISSR ยังจับกับส่วนไมโครแซทเทลไลท์ โดยตรงทำให้ได้เครื่องหมายที่มีระดับความหลากหลายสูงกว่า RAPD ยังเป็น

มหาวิทยาลัยมหาสารคาม
MAHASARAKHAM UNIVERSITY

การรวมข้อดีของเทคนิค RAPD, AFLP และไมโครแซทเทลไลท์ ไว้ด้วยกัน และให้ผลการตรวจสอบใช้เวลาสั้นกว่า AFLP และไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลของลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมายก่อน และค่าใช้จ่ายในการศึกษาที่ไม่สูงมาก

การทำเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ดได้แนวคิดมาจากการทำบาร์โค้ดในสินค้าต่าง ๆ เพื่อประยุกต์ใช้ในการระบุชนิดและจำแนกสิ่งมีชีวิต ให้มีความถูกต้อง รวดเร็วและง่ายต่อการนำมาใช้ โดยอาศัยหลักการที่ว่าสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดมีสารพันธุกรรมที่แสดงลักษณะเฉพาะของสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่ง ซึ่งแตกต่างจากสิ่งมีชีวิตอื่น ตามหลักการวิวัฒนาการของ ชาร์ล ดาร์วิน นักอนุกรมวิธานจึงได้เลือกลำดับ นิวคลีโอไทด์สั้น ๆ ของดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างระหว่างชนิดสูง แต่มีความต่างระหว่างชนิดเดียวกันต่ำมาใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ด ในปี ค.ศ. 2003 ได้มีการจัดตั้ง Consortium for the Barcode of Life (CBOL) ขึ้นเพื่อรวบรวมและจัดทำฐานข้อมูลกลาง ทำเป็นมาตรฐานและคู่มือในการทำเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ด การนำข้อมูลลำดับ นิวคลีโอไทด์มาใช้เพื่อทำเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ดมีหลักการสำคัญคือ จีนที่ศึกษาต้องมีอัตราวิวัฒนาการเหมาะสมกับกลุ่มสิ่งมีชีวิตที่ศึกษา

การทำ DNA barcode มีวัตถุประสงค์เพื่อ ใช้เป็นเครื่องมือช่วยในการระบุสิ่งมีชีวิต และมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องมีนักอนุกรมวิธานในการสร้างระบบอ้างอิงที่ถูกต้อง เพราะฐานข้อมูลจะต้องเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ ที่ได้จากตัวอย่างที่มีการระบุชนิดอย่างถูกต้องโดยนักอนุกรมวิธานเท่านั้น DNA barcode จึงเป็นเครื่องมือวิเคราะห์อย่างง่ายที่มีพื้นฐานอยู่บนความรู้ของนักอนุกรมวิธานในการระบุชนิดของสิ่งมีชีวิต ข้อมูล ณ เดือนมีนาคม ปี ค.ศ. 2008 มีลำดับนิวคลีโอไทด์หรือข้อมูล DNA barcode อยู่ในฐานข้อมูลของ The International Barcode of Life project (iBOL) ทั้งหมด 363,584 ลำดับ (จากสิ่งมีชีวิต 50,039 ชนิด) และมี 136,338 ลำดับ (จากสิ่งมีชีวิต 13,761 ชนิด) เป็นข้อมูลเข้าเกณฑ์ของการใช้เป็น DNA barcode ได้ (Frezal and Leblois, 2008)

สำหรับบริเวณที่ใช้เป็น DNA barcode นั้นต้องมีคุณสมบัติ 3 ประการ ได้แก่

1. ลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีนนั้นมีความแตกต่างมากพอที่จะทำให้แยกสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกันออกจากกันได้ แต่ต้องมีความแตกต่างภายในชนิดเดียวกันต่ำมากหรือไม่มีเลย

2. เป็นดีเอ็นเอที่มีบริเวณอนุรักษ์ที่สามารถให้ไพรเมอร์ที่เป็น universal primer เข้ามาจับเพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณนั้นด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้

3. มีขนาดที่เหมาะสมประมาณ 500-800 คู่เบส (base pair; bp)

สถาบันวิทยบริการ มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ซึ่งการเลือกบริเวณที่จะนำมาใช้เป็น DNA barcode มีความสำคัญมาก หากเลือกบริเวณที่นำมาใช้เป็น DNA barcode ได้เหมาะสมกับชนิดของสิ่งมีชีวิตที่ศึกษาจะทำให้เทคนิค DNA barcode เป็นเทคนิคที่สามารถนำไปใช้ได้ง่าย สะดวก และรวดเร็ว

การศึกษา DNA barcode ในสัตว์นั้น เริ่มโดย Hebert *et al*. (2003) ได้ใช้บริเวณดีเอ็นเอของจีน Cytochrome c oxidase I (COI) ที่มีขนาดประมาณ 650 bp ในตำแหน่งเบสที่ 58–705 ทางด้าน 5′ ของจีน COI อ้างอิงตามจีโนมในไมโทคอนเดรียของหนู (Frezal and Leblois, 2008) ซึ่งค่อนข้างประสบความสำเร็จอย่างมากในกลุ่มสัตว์ เนื่องจากจีน COI มีข้อดีกว่าจีนในไมโทคอนเดรียบริเวณอื่นๆ คือ มีขนาดสั้นประมาณ 650 bp สามารถเพิ่มปริมาณด้วย universal pirmer ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ครอบคลุมขอบเขตของความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการในกลุ่มสัตว์ได้อย่างดี นอกจากนี้ลำดับดีเอ็นเอของจีน COI ยังให้ความแตกต่างในสัตว์ที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมากได้อีกด้วย

## 2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

วิวรรธน์ แสงภักดี (2556) ศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ของปลาปักเป้ากล่องเขาวัว (*Lactoria cornuta* Linnaeus, 1758) พบว่า มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ (2*n*) เท่ากับ 48 แท่ง มีจำนวนโครโมโซมพื้นฐาน (NF) เท่ากับ 54 ทั้งเพศผู้และเพศเมีย แคริโอไทป์ประกอบด้วยโครโมโซม ชนิดเมทาเซนทริก (metacentric) ขนาดใหญ่ 2 แท่ง อะโครเซนทริก (acrocentric) ขนาดใหญ่ 4 แท่ง เทโลเซนทริก (telocentric) ขนาดใหญ่ 12 แท่ง เทโลเซนทริกขนาดกลาง 28 แท่ง และเทโลเซนทริกขนาดเล็ก 2 แท่ง เป็นรายงานแรกที่พบตำแหน่งนอร์ (NORs) บนแขนข้างสั้นของโครโมโซมคู่ที่ 2 เป็นโครโมโซมชนิดอะโครเซนทริกขนาดใหญ่ มีสูตร แคริโอไทป์ ดังนี้ (2*n*, 48) = 2m+4a+42t (NF=54)

Alves และคณะ (2008) ศึกษาเกี่ยวกับโครโมโซมที่เกินในปลาปักเป้า *Sphoeroides spengleri* จากการวิเคราะห์โครโมโซมพบว่า *S. spengleri* มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ (2*n*) เท่ากับ 46 แท่ง และมีโครโมโซมเป็น 20m/sm + 26st/a โดยไม่พบความแตกต่างของโครโมโซมเพศ และไม่พบตำแหน่งของนอร์ (NOR)

Brum และคณะ (1995) รายงานการศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ของปลาปักเป้า 2 ชนิด คือ *S. greeleyi* และ *S. spengleri* จากรีโอเดจาเนโร ประเทศบราซิล จากการศึกษาพบว่าทั้ง 2 ชนิด มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ (2*n*) เท่ากับ 46 แท่ง จากการศึกษาไม่มีการตรวจสอบตำแหน่งของนอร์ (NOR)

มหาวิทยาลัยมหาสารคาม MAHASARAKHAM UNIVERSITY

Brum และคณะ (2000) ศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ในวงศ์ปลาปักเป้า (tetraodontiforms) คือ *S. tyleri* (Tetraodontidae) และ *Chilomycteras spinasus* (Diodontidae) จากรีโอเดจาเนโร ประเทศบราซิล ผลจากการศึกษาปลาปักเป้าชนิด *S. tyleri* มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ 2*n* เทากับ 46 โครโมโซมพื้นฐาน (NF) เท่ากับ 60 แต่อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาไม่พบตำแหน่งของนอร์ (NOR)

Martine และคณะ (2010) ศึกษาโครโมโซมปลาปักเป้า *Canthigaster figueiredoi* จัดอยู่ในอันดับ Tetraodontiformes โดยย้อมสี Ag-NORs และ C-band มีโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 36 แท่ง จำนวนโครโมโซมพื้นฐานเท่ากับ 52 มีสูตรแคริโอไทป์ ดังนี้ 10m+6sm+20a (NF=52) พบนอร์อยู่ บนคู่โครโมโซมที่ 3, 4, 8 และ 11

Gustavo และ Molina (2005) ดำเนินการศึกษาความหลากหลายของแคริโอไทป์ในปลา Balistidae, Diodontidae และ Tetraodontidae ในอันดับ Tetraodontiformes ในงานวิจัยนี้ได้ทำ การวิเคราะห์ด้วยวิธีย้อมแถบสีแบบนอร์ (Ag-NOR band) ในพันธุ์ *S. testudineus* จากวงศ์ Tetraodontidae พบว่ามีค่า 2*n*=46 และ แคริโอไทป์ประกอบด้วยโครโมโซมขนาดเล็ก สูตรแคริโอไทป์เท่ากับ 18m+4sm+6st+18a จำนวนโครโมโซมพื้นฐานเท่ากับ 74 ในสายพันธุ์นี้พบ (telomeric NORs) ถูกระบุในคู่ที่หนึ่ง นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ของปลาในวงศ์ปลาปักเป้าอื่น ๆ ดังตารางที่ 2.1

**ตารางที่ 2.2** รายงานการศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ของปลาในวงศ์ปลาปักเป้า (family Tetraodontidae)

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

| ชนิด | 2*n* | NF | แคริโอไทป์ | NORs | ภูมิภาค | อ้างอิง |
|---|---|---|---|---|---|---|
| *Arothron hispidus* | 42 | - | - | - | India | Gregory (2008) |
| *A. immaculatus* | 42 | 68 | 12m+14sm+16st/a | - | India | Choudhury *et al.* (1982) |
| *A. manilensis* | 42 | 72 | 14m+16sm+12st | - | Japan | Hirata and Urushido (2000) |
| *A. meleagris* | 38 | - | - | - | Japan | Ojima and Yamamoto (1990) |
| *A. reticularis* | 42 | 68 | 12m+14sm+16st/a | - | India | Choudhury *et al.* (1982 |
| *Canthigaster coronate* | 28 | 36 | 6m+2sm+20st/a | - | Japan | Arai (1983) |
| *C. figueiredoi* | 36 | 52 | 10m+6sm+20a | - | - | Martine *et al*. (2010) |
| *C. rivulate* | 34 | 44 | 4m+6sm+10st+14a | - | Japan | Mabuchi *et al.* (2002) |
| *C. patoca* | 40 | 70 | 14m+16sm+10st/a | - | Japan | Arai and Nagaiwa (1976) |
| *Dichotomyctere fluviatilis* | 42 | 64 | 2m+4sm+2st+34a | - | India | Hinegardner and Rosen (1972) |
| *D. fluviatilis* | 42 | 48 | 2m+4sm+2st+34a | - | S. Asia | Ojima and Yamamoto (1990) |
| *D. nigroviridis* | 42 | 62 | 20m/sm+22st | - | S. Asia | Hardie and Hebert (2003) |

**ตารางที่ 2.1** รายงานการศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ของปลาในวงศ์ปลาปักเป้า (family Tetraodontidae) (ต่อ)

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| *Lactoria cornuta* | 48 | 54 | 2m+4a+42t | - | Thailand | Wiwat sangpakdee (2014) |
| *Legocenphalus inermis* | 44 | 46 | 2m+42a | - | India | Lakra and Rishi (1991) |
| *L. laevigatus* | 46 | - | - | - | Brazil | Sá-Gabriel and Molina (2005) |
| *L. lunaris* | 44 | 68 | 10m+14sm+20st/a | - | India | Hardie and Hebert (2003) |
| *Pao palemnangensis* | 42 | - | - | - | S. Asia | Hinegardner and Rosen (1972) |
| *Sphoeroides greeleyi* | 46 | 70 | 24m/sm+22st/a | 2 | Brazil | Brum *et al.* (1995) |
| *S. spengleri* | 46 | 64 | 18m/sm+28st/a | - | Brazil | Brum *et al.* (1995) |
| *S. spengleri* | 46 | 66 | 20m/sm+26st/a | - | Brazil | Alves *et al.* (2008) |
| *S. testudineus* | 46 | 68 | 18m+4sm+6st+18a | 2 | Brazil | Sá-Gabriel and Molina (2005) |
| *S. tyleri* | 46 | 60 | 14m/sm+32st/a | - | Brazil | Brum (2000) |
| *Takifugu chrysops* | 44 | 64 | 6m+14sm+24st/a | - | Japan | Arai and Nagaiwa (1976) |
| *T. niphobles* | 44 | 64 | 24m/sm+24st/a | - | Japan | Ojima and Yamamoto (1990) |
| *T. niphobles* | 44 | 64 | 4m+16sm+24st/a | - | Japan | Miyaki *et al.* (1995) |
| *T. pardalis* | 44 | - | - | - | Japan | Arai (1983) |
| *T. pardalis* | 44 | 66 | 6m+16sm+22st/a | - | Japan | Miyaki *et al.* (1995) |
| *T. poecilonotus* | 44 | 66 | 12m+10sm+22st/a | - | Japan | Miyaki *et al.* (1995) |
| *T. poecilonotus* | 44 | 66 | - | - | Japan | Arai (1983) |
| *T. poecilonotus* | 44 | 66 | 12m+8sm+24a | - | China | Zhao (1994) |
| *T. rubripes* | 44 | 66 | 10m+12sm+22st/a | - | Japan | Miyaki *et al.* (1995) |
| *T. rubripes* | 44 | 64 | 20m/sm+24st/a | - | China | Gregory (2008) |
| *T. rubripes* | 44 | 62 | 12m+6sm+26a | - | China | Wang and Zhao (1993) |
| *T. vermicularis* | 44 | 66 | 8m+14sm+22st/a | - | Japan | Miyaki *et al.* (1995) |
| *T. xanthopterus* | 44 | 66 | 8m+14sm+22st/a | - | Japan | Miyaki *et al.* (1995) |
| *Tetraodon cutcutia* | 42 | 66 | 8m+14sm+22st/a | - | India | Vinogradov (1998) |

หมายเหตุ: 2*n* = จำนวนโครโมโซมดิพลอยด์, NF = โครโมโซมพื้นฐาน (จำนวนแขนโครโมโซม), m = เมทาเซนทริก, sm = ซับเมทาเซนทริก, st = ซับเทโลเซนทริก, a = อะโครเซนทริก, และ NORs = nucleolar organizer regions

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

Grutzner, F. *et al.* (1999) ศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ของปลาปักเป้าน้ำจืด *Tetraodon nigroviridis* พบว่ามีจำนวนโครโมโซมเท่ากับ 42 แท่ง ซึ่งมีจำนวนโครโมโซมที่แตกต่างกันกับปลาปักเป้าน้ำจืด *Fugu rubripes* ที่พบในประเทศญี่ปุ่นที่มีรายงานจำนวนโครโมโซมเท่ากับ 44 แท่ง ทดสอบ RBA banding สามารถใช้จำแนกโครโมโซมคู่เหมือนได้ในปลาปักเป้าน้ำจืดทั้ง 2 ชนิด เช่น โครโมโซมแท่งที่ 1 ของ *Tetraodon nigroviridis* ตอบสนองให้เห็นว่ามีชิ้นส่วนคล้ายคลึงกับ *Fugu rubripes* เป็นส่วนของโครโมโซมขนาดเล็ก 2 แท่ง และโครโมโซมแท่งที่ 1 ของ *Tetraodon nigroviridis* เป็นโครโมโซมคู่เหมือนของโครโมโซมแท่งที่ 2 ของ *Fugu rubripes*

ธีระรักษ์ ศรีนวลกราย และ ศานิต ปิยพัฒนากร (2552) การตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมและโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรของปลาทูโดยการใช้ เครื่องหมาย Inter-simple sequence repeat (ISSR) จากไพรเมอร์ 49 ไพรเมอร์ มี 5 ไพรเมอร์ที่ให้ผลคงที่และมีโพลิมอร์ ฟิซึม โดยสำรวจความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาทู 276 ตัวจาก 8 สถานี ได้แก่ สงขลา สุราษฎร์ธานี ประจวบคีรีขันธ์ สมุทรสงคราม ระยอง จันทบุรี สตูล และกระบี่ พบว่าแถบดีเอ็นเอให้โพลิมอร์ฟิซึม 80.77 เปอร์เซ็นต์ พบ ความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาทูมีค่าค่อนข้างสูง การวิเคราะห์โครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างตัวอย่างปลาทูในแต่ละประชากร ($P$<0.001) เมื่อแบ่งประชากรทั้งหมดออกเป็น 2 พื้นที่ (อ่าวไทยและทะเลอันดามัน) แสดงความแตกต่างทางพันธุกรรมอย่างมีนัยสำคัญระหว่างพื้นที่ ($P$=0.0342) แผนภูมิ ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมแสดงการแบ่งกลุ่มประชากรปลาทูออกเป็น 3 กลุ่มคือ อ่าวไทยตอนบน อ่าวไทยตอนล่างและ ทะเลอันดามัน และพบความสัมพันธ์ระหว่างความห่างทางพันธุกรรมกับระยะห่างทางภูมิศาสตร์ของแต่ละประชากร ($P$<0.0003)

ประดิษฐ์ แสงทอง และเลิศลักษณ์ เงินศิริ (2010) ได้พัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลเพื่อจัดจำแนกปลาปักเป้าในประเทศไทย โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล 7 ชนิดซึ่งตั้งชื่อว่า KU_sRUFR1, Mul_ILS, pfSR_FLI66, PfSR_FLL678, pfSR_FLS108, MulCB_TT และ TFV_BciVI ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อระบุชนิดของปลาปักเป้าที่พบในประเทศไทย พบว่าเครื่องหมาย KU_sRUFR1 เป็นคู่ไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายและหาลำดับนิวคลีโอไทด์ได้จากดีเอ็นเอต้นแบบจากปลาหลายชนิด (universal primer) ผลการใช้เครื่องหมาย KU_sRUFR1 กับปลาปักเป้าตัวอย่างที่รวบรวมได้ พบว่าสามารถหาลำดับนิวคลีโอไทด์ปลาปักเป้าได้ 11 ชนิด คือ *Diodon hystrix*, *D. liturosus*, *Chilomycterus orbicularis*, *Arothron reticularis, Lagocephalus spadiceus, L. lunaris, L. inermis, Tetraodon fangi, T. nigroviridis, T. fluviatilis* และ *Takifugu oblongus* ใช้เทคนิค multiplex PCR ประกอบด้วยไพรเมอร์ 3 คู่

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

สามารถใช้ระบุชนิดปลาปักเป้าสกุล *Lagocephalus* 3 ชนิด คือ *L. spadiceus L. lunaris* และ *L. inermis* เครื่องหมาย pfSR_FLI66 pfSR_FLL678 และ pfSR_FLS108 เป็นคู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อปลาปักเป้าชนิด *L. spadiceus L. lunaris* และ*L. inermis* ตามลำดับ เครื่องหมาย MulCB_TT เป็นเครื่องหมายที่ใช้เทคนิค multiplex PCR มีความจำเพาะต่อปลาปักเป้าสกุล *Tetraodon* และสามารถใช้แยกชนิด *T. nigroviridis* ออกจากกลุ่มของชนิด *T. fluviatilis – T. fangi* ได้ เครื่องหมาย TFV_BciVI เป็นเครื่องหมายที่ใช้เทคนิค PCR-RFLP ใช้ระบุชนิดปลาปักเป้า *T. fluviatilis* และ *T. fangi* เครื่องหมายทุกชนิดผ่านการทดสอบความแม่นยำในการระบุชนิดโดยใช้ตัวอย่างที่ทดสอบเป็นปลาปักเป้าชนิดต่างๆ และปลาที่ไม่ใช่ปลาปักเป้า ผลจากการทดสอบแสดงให้เห็นว่าเครื่องหมายที่ได้มีความแม่นยำสูงมาก นอกจากนี้เครื่องหมายที่พัฒนาขึ้นยังถูกทดสอบกับดีเอ็นเอต้นแบบที่สกัดจากเนื้อปลาสดและเนื้อปลาแปรรูป พบว่าสามารถระบุชนิดได้เช่นเดียวกัน

อารี ทัตติยพงศ์ และคณะ (2555) ศึกษาการประเมินประสิทธิภาพเครื่องมือตรวจสอบปลาปักเป้าโดยพัฒนาเครื่องมือ 3 ชนิด เพื่อตรวจสอบพิษ และชนิดของปลาปักเป้า ได้แก่ ชุดทดสอบ Tetrodotoxin-Immunochromatography สำหรับตรวจกรองสารพิษเตโตรโดท็อกซิน วิธี PCR สำหรับตรวจสารพันธุกรรมของปลาปักเป้า และการอ่านลักษณะมัดกล้ามเนื้อของปลาปักเป้า ทดสอบเก็บตัวอย่างปลาในจังหวัดสมุทรสาคร และจังหวัดสมุทรสงคราม พบปลาปักเป้า 2 ชนิด คือ *Lagocephalus spadiceus* และ *L. lunaris* โดยพบว่าเทคนิค PCR สามารถแยกชนิดของปลาปักเป้า 2 ชนิดได้อย่างแม่นยำ

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

Song, L. S. *et al*. (2001) ทำการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างปลาปักเป้าในสกุล *Takifugu* จำนวน 2 ชนิด คือ *T. rubripes* และ *T. pseudommus* โดยใช้เทคนิค RAPD พบว่าไพรเมอร์ 300 10-base สามารถแสดงผลการเกิดแถบแบนได้ 5-19 แถบ มีขนาดประมาณ 200-3,000 คู่เบส และนำไปวิเคราะห์ความสัมพันธุ์ทางพันธุกรรมโดยใช้วิธี polymorphism parsimony ในโปรแกรม PHYLIP ซึ่งผลการศึกษาพบว่าการใช้เทคนิค RAPD สามารถใช้วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของปลาปักเป้าทั้ง 2 ชนิดนี้ รวมกับปลาปักเป้าชนิดอื่น ๆ ได้อย่างชัดเจน

Song, L. S. *et al*. (2001) ทำการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างปลาปักเป้าในสกุล *Takifugu* โดยใช้โดยใช้เทคนิค RAPD พบว่าไพรเมอร์ 200 10-base และยีนในส่วน 16s ribosomal RNA gene ในปลาปักเป้า 5 ชนิด มีสกุล *Takifugu* จำนวน 2 ชนิด คือ *T. rubripes* และ *T. pseudommus* มีขนาดประมาณ 200-3,000 คู่เบส และจากการศึกษาขนาดของยีน 16s ribosomal RNA gene พบว่ามีขนาดผลผลิตดีเอ็นเอประมาณ 572 คู่เบส นำไปวิเคราะห์

ลำดับนิวคลีโอไทด์และวิเคราะห์โดยวิธี NJ โดยโปรแกรม PHYLIP พบว่าเทคนิคทั้ง 2 สามารถวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของปลาปักเป้าทั้ง 5 ชนิดนี้ รวมกับปลาปักเป้าชนิดอื่น ๆ ได้อย่างชัดเจน

Ward, R. D. *et. al.* (2005) ศึกษาเครื่องหมายดีเอ็นเอบาร์โค้ดของปลาทะเลในประเทศออสเตรเลีย จากตัวอย่างปลาทั้งหมด 207 ชนิด ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทป์จากยีนในไมโตคอนเดรีย บริเวณ cytochrome oxidase subunit I (*coxI*) หลายตัวอย่างที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้มีลำดับนิวคลีโอไทป์ขนาด 754 คู่เบส พบว่าสามารถแยกความแตกต่างของปลาได้เป็น 4 กลุ่ม คือ teleosts, sharks, rays และ chimaerids โดยพบความหลากหลายจากความหนาแน่นของเบส GC ในกลุ่ม teleosts ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ การใช้ลำดับเบสที่เพิ่มปริมาณได้จากบริเวณ cytochrome oxidase subunit I (*coxI*) สามารถใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอในการจำแนกและการระบุชนิดของปลาได้เป็นอย่างดี ซึ่งถือเป็นระบบในการตรวจสอบชนิดพันธุ์ปลาในออสเตรเลียได้นอกจากที่จะศึกษาเฉพาะลักษณะภายนอก เป็นเครื่องมือที่เหมาะต่อการนำปสนับสนุนข่อมูลในการจำแนกสิ่งมีชีวิตต่อไป

Ward, R. D. *et. al.* (2005) ศึกษาเครื่องหมายดีเอ็นเอบาร์โค้ดของปลาทะเลในประเทศออสเตรเลีย จากตัวอย่างปลาทั้งหมด 207 ชนิด ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทป์จากยีนในไมโตคอนเดรีย บริเวณ cytochrome oxidase subunit I (*coxI*) หลายตัวอย่างที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้มีลำดับนิวคลีโอไทป์ขนาด 754 คู่เบส พบว่าสามารถแยกความแตกต่างของปลาได้เป็น 4 กลุ่ม คือ teleosts, sharks, rays และ chimaerids โดยพบความหลากหลายจากความหนาแน่นของเบส GC ในกลุ่ม teleosts ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ การใช้ลำดับเบสที่เพิ่มปริมาณได้จากบริเวณ cytochrome oxidase subunit I (*coxI*) สามารถใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอในการจำแนกและการระบุชนิดของปลาได้เป็นอย่างดี ซึ่งถือเป็นระบบในการตรวจสอบชนิดพันธุ์ปลาในออสเตรเลียได้นอกจากที่จะศึกษาเฉพาะลักษณะภายนอก เป็นเครื่องมือที่เหมาะต่อการนำปสนับสนุนข่อมูลในการจำแนกสิ่งมีชีวิตต่อไป

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

Wong, L. L. *et al.* (2011) ได้ใช้เทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ดจากบริเวณยีน cytochrome oxidase I (COI) เพื่อการระบุชนิดของสัตว์น้ำ โดยเครื่องหมายโมเลกุลชนิดนี้มีศักยภาพสำหรับการระบุชนิดได้อย่างรวดเร็ว และมีความถูกต้องแม่นยำมาก โดยการพัฒนาเทคนิคที่ใช้ตรวจสอบนี้เพื่อระบุสายพันธุ์ของปลากลุ่ม catfish ที่เลี้ยงในประเทศ และกลุ่มที่นำเข้า ซึ่งการศึกษาครั้งนี้ใช้ตัวอย่างปลาทั้งหมด 9 ชนิด รวมทั้งพันธุ์ลูกผสมด้วย จากการเพิ่มปริมาณยีน COI โดยใช้ primer cocktails ชนิด C FishF1t1 และ C_FishR1t1 ได้ลำดับดีเอ็นเอขนาด 651 คู่เบส เมื่อนำไปวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ พบว่าความสัมพันธ์ภายในกลุ่มชนิดเดียวกันมีค่าสูงถึง 98%

โดยประมาณ นับว่าการใช้เทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ดสามารถใช้ในการระบุชนิดของปลาได้ดี เหมาะกับการใช้เพื่อการติดฉลากผลิตภัณฑ์ ในประเทศสหรัฐอเมริกา และควรมีการพัฒนาในปลาทุก ๆ ชนิด โดยเฉพาะปลาเศรษฐกิจ และการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ อื่น ๆ เพื่อให้เกิดความถูกต้อง และแม่นยำในการค้าระหว่างประเทศ

Maloyjo, J. *et. al*. (2012) ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกลุ่มปลาดุก ซึ่งเป็นกลุ่มปลาหนังที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของอินเดีย และในช่วงที่ผ่านมาอินเดียเริ่มมีความตื่นตัวในการอนุรักษ์ปลากลุ่มนี้จึงจำเป็นต้องทราบข้อมูลของปลาแต่ละชนิด การจัดจำแนกแบบดั้งเดิมยังมีข้อมูลที่คลาดเคลื่อน จึงใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาร่วมกับการศึกษาทางพันธุศาสตร์โมเลกุลด้วยการใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดในการจัดจำแนกเพื่อความถูกต้องมากขึ้น โดยศึกษาตัวอย่างปลาทั้งหมด 75 ตัวอย่าง เมื่อจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบความหลากชนิด 25 ชนิด จาก 17 สกุล 9 วงศ์ ใช้ยีนในส่วนของ cytochrome oxidase subunit-I (*COI*) สามารถจำแนกชนิดได้ 21 ชนิด ซึ่งจากผลการศึกษานี้พบว่าการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ดนั้นให้ผลดีถึง 84% ในการจัดจำแนกปลาดุกทั้ง 21 ชนิด แต่ยังมีปลาบางชนิดที่มีความสัมพันธ์กันใกล้ชิดมากในระดับโมเลกุล ซึ่งถือเป็นข้อมูลที่น่าสนในสำหรับปลาในเขตภาคตะวันออกฉียงเหนือของอินเดีย

Malakar, A. K. *et al*. (2012) ศึกษาพันธุกรรมของปลา *Ompok bimaculatus* ซึ่งเป็นปลาที่ความสำคัญเชิงพานิชย์ในประเทศอินเดีย และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้โดยใช้ cytochrome b (*cyt b)* เพื่อศึกษาความแตกต่างของประชากรปลา *Ompok bimaculatus* ที่อยู่ต่างแม่น้ำกัน ความยาวของลำดับดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ *cyt b* มีความยาว 1118 bp และพบว่าปลา *Ompok bimaculatus* มีความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ค่อนข้างสูง มีความแปรปรวนในนิวคลีโอไทป์ของ haplotype ประมาณ 0.063 และ 0.005 ตามลำดับ ซึ่งผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนระดับโมเลกุลพบว่าในระหว่างกลุ่มประชากรเป็นมีความแตกต่างทางพันธุกรรม 73.53 % และในกลุ่มประชากรเดียวกันมีความผันแปรทางพันธุกรรม 26.47 % ซึ่งการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมในประชากรมีบทบาท สำคัญในการอนุรักษ์และการจัดการที่สำคัญของกลุ่มปลาที่ใกล้จะสูญพันธุ์

มหาวิทยาลัยมหาสารคาม
MAHASARAKHAM UNIVERSITY

# บทที่ 3
# วิธีดำเนินการวิจัย

การดำเนินงานวิจัยในครั้งนี้ เป็นการสำรวจชนิดของปลา โดยการเก็บตัวอย่างปลาจากสถานที่ธรรมชาติ ตลาดสดตามแหล่งชุมชน

## 3.1 ข้อมูลและแหล่งที่มาของข้อมูล

รวบรวมข้อมูลการศึกษาทางด้านความหลากหลายทางชีวภาพของปลา จากเอกสารและงานวิจัยที่เผยแพร่ในฐานข้อมูลงานวิจัย และจากการสอบถามชาวบ้าน และชาวประมงในพื้นที่

## 3.2 ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

ปลาเนื้ออ่อนที่อยู่ในแหล่งน้ำธรรมชาติ คือลำน้ำพอง และลำน้ำชี จากการนำมาขายในตลาดสดของชาวบ้าน และที่ได้จากการสอบถามชาวบ้าน และชาวประมงในพื้นที่

## 3.3 เครื่องมือในการวิจัย

การสำรวจในภาคสนาม (field survey) หรือการลงมือปฏิบัติมีความสำคัญต่อการวิจัยเชิงคุณภาพทำให้ได้ข้อมูลที่ถูกต้อง และแม่นยำ

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

## 3.4 ขั้นตอนในการดำเนินงานวิจัย

แบ่งขั้นตอนการดำเนินงานเป็น 4 ขั้นตอน

**ขั้นตอนที่ 1 การสำรวจพันธุ์ปลาปักเป้า**

ทำการสำรวจพันธุ์ปลาปักเป้า ที่พบในแม่น้ำสายหลักในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 3 สาย คือ แม่น้ำโขง แม่น้ำชี แม่น้ำมูล เพื่อศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกของปลาที่จับได้ โดยเฉพาะขนาดและลักษณะสีภายนอก

การรักษาตัวอย่างปลา การเก็บรักษาตัวอย่างปลานั้นจะใช้วิธีดองในน้ำยาฟอร์มาลินเข้มข้น 10% โดยอัตราส่วนน้ำยา 1 ส่วนต่อน้ำ 3 ส่วน แล้วจึงนำมาดองในน้ำยาแอลกอฮอล์เข้มข้น 70% ในกรณีที่ตัวอย่างปลามีขนาดใหญ่จะทำการผ่าท้องเสียก่อน เพื่อให้น้ำยาซึมเข้าไปภายในช่องท้อง หรืออาจใช้วิธีฉีดน้ำยาเข้าไปในช่องท้องก็ได้ การจำแนกชนิดปลาที่จับได้จะกระทำในห้องปฏิบัติการ

**ขั้นตอนที่ 2 การศึกษาด้านพันธุศาสตร์เซลล์ของปลาปักเป้า**

ทำการเตรียมโครโมโซมโดยตรง (direct chromosome preparation) เป็นวิธีที่เลือกเอาเซลล์ในร่างกายที่กำลังมีการแบ่งตัวมาศึกษาโครโมโซม เป็นเซลล์ที่ยังอ่อนและยังมีการแบ่งตัวอยู่ตลอดเวลา โดยการฉีดโคลซิซินความเข้มข้น 0.01% เพื่อยับยั้งการทำงานของ spindle fiber ฉีดเข้าที่บริเวณช่องท้องของปลา ทิ้งไว้ 1.30 ชั่วโมง จากนั้นผ่านำไต และเหงือกสับให้ละเอียดร่วมกับ 0.075 M KCl ซึ่งทำให้เซลล์พองตัว (hypotonic solution) เพื่อที่โครโมโซมจะมีการกระจายตัวดี โดยการเติมสารละลาย จำนวน 6-8 มล. ลงในตะกอนเซลล์ บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ทำการผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าผสม (vortex mixture) เมื่อครบกำหนดทำการแยกเอา KCl ออก โดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1,200 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วทำการดูดส่วนใสทิ้ง ทำการตรึงเซลล์ (fixation) โดยการเติมน้ำยาตรึงเซลล์ที่แช่เย็นและเตรียมใหม่เสมอ (fresh cold fixative) ที่มีอัตราส่วนของ methanol : glacial acetic acid เป็น 3 : 1 ใช้หลอดหยด โดยหยดน้ำยาตรึงเซลล์ทีละหยด พร้อมกับผสมเซลล์ให้เข้ากับสารละลาย เติมจนได้ปริมาตรประมาณ 8 มล. แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1,200 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทำการดูดส่วนน้ำยาตรึงเซลล์ด้านบนทิ้งไป ทำซ้ำจนได้สารละลายที่ใสและมีตะกอนขาวของเซลล์ที่ก้นหลอด ดูดสารละลายตะกอนเซลล์ หยดลงสไลด์ที่สะอาดและเย็น โดยให้หยดสูงจาก สไลด์ 2–3 ฟุต เพื่อให้เซลล์แตก และโครโมโซมแผ่กระจายดี ทำการผึ่งสไลด์ให้แห้ง เพื่อนำไปย้อมด้วยสีจิมซ่า 20% แช่สไลด์นาน 20–45 นาที ล้างสีออกด้วยน้ำประปาปล่อยไว้ให้แห้ง แล้วนำไปศึกษาโครโมโซมต่อไป

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

**การย้อมสีโครโมโซมแถบสีแบบซี**

1. ในกรณีที่ตะกอนเซลล์เก็บอยู่ในน้ำยาตรึงเซลล์ (methanol: glacial acetic acid เป็น 3: 1) ที่อุณหภูมิ 4°ซ ต้องทำการเปลี่ยนน้ำยาตรึงเซลล์ใหม่ โดยนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 1,200 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ทำการดูดส่วนน้ำยาตรึงเซลล์ด้านบนทิ้ง แล้วเติมน้ำยาตรึงเซลล์ลงไปใหม่ประมาณ 2-5 มล. ขึ้นอยู่กับปริมาณของตะกอนเซลล์

2. ใช้ micropipette ดูดสารละลายตะกอนเซลล์ หยดลงบนสไลด์ที่สะอาดและเย็นจัด (แช่ในน้ำแข็งให้เย็นจัด) ประมาณ 3 หยด โดยไม่ซ้ำตำแหน่งเดิม หยดให้สูงจากสไลด์ประมาณ 2 ฟุต เพื่อให้เซลล์แตกกระจาย และโครโมโซมมีการแผ่กระจายตัวดี ทิ้งสไลด์ให้แห้ง จึงนำมาตรวจโครโมโซมด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 400 เท่า (X400) โดยปรับแสงให้น้อยที่สุด เลือกสไลด์ที่โครโมโซมระยะเมทาเฟส และมีการกระจายตัวของโครโมโซมดีไว้ย้อมแถบสีแบบนอร์ ทิ้งไว้ให้แห้งในอุณหภูมิห้อง

3. หยดสารละลาย 50% silver nitrate ลงบนสไลด์โครโมโซม 2 หยด ตามด้วยหยด 50% สารละลาย gelatin 2 หยด ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์

4. นำสไลด์ไปบ่มในตู้บ่มอุณหภูมิ 65°ซ นาน 3 ชั่วโมง

5. นำสไลด์ออกมาจุ่มในน้ำกลั่นเพื่อให้กระจกปิดหลุดออก แล้วนำสไลด์มาล้างด้วยน้ำกลั่นอีกครั้ง

6. ย้อมด้วยสีจิมซ่า 10% นานประมาณ 1 นาที ล้างสไลด์ด้วยน้ำประปา ปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

**การตรวจสอบโครโมโซม**

ดัดแปลงจากวิธีการของ กันยารัตน์ ไชยสุต (2532) โดยทำการคัดเลือกเซลล์ที่มีการแบ่งเซลล์ระยะเมทาเฟส ที่มีโครโมโซมไม่สั้นหรือยาวเกินไป และมีการกระจายตัวของโครโมโซมไม่ซ้อนทับกัน มีจำนวนโครโมโซมครบ ถ่ายภาพโครโมโซมของปลาวงศ์ปลากดทุกชนิดอย่างละ 20 เซลล์ ด้วยเลนส์วัตถุ (objective lens) กำลังขยาย 100X

**การจัดทำคาริโอไทป์**

คาริโอไทป์ คือ การศึกษารายละเอียดของโครโมโซมทั้งหมดของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด โดยศึกษาทั้งจำนวนโครโมโซม และรูปร่างโครโมโซม การจัดทำคาริโอไทป์ใช้โครโมโซมจากระยะเมทาเฟสเพียง 1 เซลล์ มาเป็นตัวแทนของสิ่งมีชีวิตชนิดนั้น ในการจัดทำคาริโอไทป์ เลือกเซลล์ในระยะเมทาเฟส ที่มีขนาดของโครโมโซมไม่ยาวหรือสั้นเกินไป มีการกระจายดีไม่ทับซ้อนกันมาก และสามารถนับจำนวนโครโมโซมได้ชัดเจน ถ่ายภาพเซลล์โดยใช้เลนส์วัตถุกำลังขยาย 100X แล้วนำภาพเซลล์ที่ได้มาทำการจับคู่โครโมโซมที่เหมือนกัน (homologous chromosome) ซึ่งโครโมโซมคู่เหมือนนี้จะมีความคล้ายคลึงกันมากทั้งขนาดและรูปร่าง จับคู่เหมือนของโครโมโซมโดยให้ตำแหน่งเซนโทรเมียร์ของโครโมโซมแต่ละแท่งตรงกัน จากนั้นวัดค่าความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาว ค่าความยาวของแขนโครโมโซมข้างสั้น นำค่าที่ได้มาคำนวณหาชนิดและขนาดของโครโมโซมแต่ละแท่ง โดยมีการคำนวณค่าต่างๆ ดังนี้

การคำนวณหาค่า relative length (RL) นี้สามารถช่วยในการจับคู่โครโมโซมได้แน่นอนกว่าการใช้ค่าความยาวของโครโมโซม เพราะค่า RL ของโครโมโซมแต่ละแท่งจะคงที่ในทุก ๆ เซลล์ ส่วนค่าความยาวของโครโมโซมจะแตกต่างกันไปในเซลล์แต่ละเซลล์

สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

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

การคำนวณหาค่า centromeric index (CI) นี้สามารถช่วยในการจัดชนิดของโครโมโซมได้โดยค่า CI ที่ได้นำมาใช้จัดชนิดของโครโมโซม ดังนี้

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

โครโมโซมที่มี CI อยู่ระหว่าง 0.500–0.599 จัดเป็นโครโมโซมชนิดเมทาเซนทริก

โครโมโซมที่มี CI อยู่ระหว่าง 0.600–0.699 จัดเป็นโครโมโซมชนิดซับเมทาเซนทริก

โครโมโซมที่มี CI อยู่ระหว่าง 0.700–0.899 จัดเป็นโครโมโซมชนิดอะโครเซนทริก

โครโมโซมที่มี CI อยู่ระหว่าง 0.900–1.000 จัดเป็นโครโมโซมชนิดเทโลเซนทริก

การจัดขนาดของโครโมโซม โดยกำหนดให้โครโมโซมคู่ที่ยาวที่สุดเป็นโครโมโซมคู่ที่ 1 และโครโมโซมคู่ที่สั้นที่สุดเป็นโครโมโซมคู่สุดท้าย แบ่งออกเป็น 3 ขนาด ดังนี้ โครโมโซมขนาดใหญ่ (large=L) คือ โครโมโซมคู่ที่มีขนาดความยาวมากกว่าครึ่งหนึ่งของผลบวกความยาวเฉลี่ยของโครโมโซมใหญ่สุด รวมกับโครโมโซมคู่เล็กที่สุด โครโมโซมขนาดกลาง (medium=M) คือ โครโมโซมที่มีค่าความยาวน้อยกว่าครึ่งหนึ่งของความยาวเฉลี่ยของโครโมโซมใหญ่สุด รวมกับโครโมโซมคู่เล็กที่สุด โครโมโซมขนาดเล็ก (small=S) คือ โครโมโซมที่มีความยาวน้อยกว่าครึ่งหนึ่งของความยาวเฉลี่ยของโครโมโซมคู่ใหญ่สุด

**ขั้นตอนที่ 3 การสร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ดของปลาปักเป้า**

**การสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อ**

สกัดดีเอ็นเอจากครีบ เนื้อเยื่อ ด้วยชุดสารสกัด Genomic DNA extraction kit (RBC Bioscience) ตามขั้นตอนการสกัดที่ระบุไว้ในคู่มือของชุดสารสกัด ซึ่งมีขั้นตอนการสกัดดังนี้

**ขั้นตอนการการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างปลาโดยชุดสารสกัด Genomic DNA extraction kit**

1. ชั่งตัวอย่างเนื้อเยื่อปลาให้ได้ 20 มิลลิกรัม ลงในหลอดไมโครทิวป์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม GT buffer ปริมาณ 200 ไมโครลิตร บดให้ละเอียด

2. เติม proteinase k ความเข้มข้น 10 mg/ml ปริมาณ 20 ไมโครลิตร ลงในหลอดผสมให้เข้ากันนำไปบ่มที่ 60 องศาเซลเซียล เป็นเวลา 30 นาที ระหว่างที่บ่มให้กลับหลอดไปมาทุก 5 นาที

มหาวิทยาลัยมหาสารคาม MAHASARAKHAM UNIVERSITY

3. เติม GB buffer ปริมาณ 200 ไมโครลิตร และผสมให้เข้ากันประมาณ 5 วินาที เพื่อให้ตัวอย่างผสมกัน นำไปบ่มที่ 70 องศาเซลเซียล เป็นเวลา 20 นาที และกลับหลอดทุก 5 นาที

4. ในขั้นตอนนี้นำ Elution buffer (200 ไมโครลิตร ต่อตัวอย่าง) อุ่นในอ่างน้ำร้อน 70 องศาเซลเซียล

5. เมื่อครบเวลาแล้วนำสารละลายในหลอดไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 13000 rpm เป็นเวลา 2 นาที แล้วแยกสารละลายส่วนใสใส่หลอดใหม่

6. หลังจากบ่มที่ 70 องศาแล้วเติม RNaseA ความเข้มข้น 10 mg/ml ปริมาณ 5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที

7. เติม Ethanol 200 ไมโครลิตร ลงในหลอด vortex ประมาณ 10 วินาที จะปรากฏเส้นสายขึ้น

8. ย้ายสารละลายใสในหลอด GD column (วาง GD column ลงในหลอด collection tube) ปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที ทิ้งสารละลายที่ได้

9. เติม W1 buffer 400 ไมโครลิตร ลงใน GD column และปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 30 วินาทีทิ้งสารละลายในหลอด collection tube

10. เติม Wash buffer (ที่เติม ethanol แล้ว) ปริมาณ 600 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 13,000 rpm 30 วินาที

11. เทสารละลายทิ้ง และย้ายหลอดไปที่ collection tube ปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 13,000 rpm 3 นาที (ปกติจะเติม 100 ไมโครลิตร ถ้าต้องการความเข้มข้นของ DNA มาก เติม 15-50 ไมโครลิตร)

12. เปลี่ยนหลอด GD column วางในหลอดไมโครทิวป์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตรเติม Elution buffer ที่อุ่นไว้แล้ว ปริมาณ 100 ไมโครลิตร ปล่อยทิ้งไว้ 2 นาที

13. ปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 13,000 rpm 30 วินาที เพื่อให้ได้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์

14. เก็บหลอดไมโครทิวป์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตรในข้อ 13 ที่มีสารละลายดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction: PCR) และตรวจคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอที่ได้

มหาวิทยาลัยราชภัฏจันทรเกษม
RAJABHAT JANUGADAMRONG UNIVERSITY

**ตรวจสอบคุณภาพและวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซีส (agarose gel electrophoresis)**

การสกัดดีเอ็นเอจากชิ้นส่วนของปลา แต่ละชนิด ไปสกัดดีเอ็นเอโดยชุดสกัดดีเอ็นเอ และตรวจคุณภาพดีเอ็นเอโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตร และ 280 นาโนเมตร และ หาอัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตรกับ 280 นาโนเมตร เพื่อคำนวณปริมาณดีเอ็นเอและตรวจคุณภาพ และทำอิเล็กโตรโฟเรซิสเพื่อศึกษาด้านคุณภาพ ได้แก่ ขนาดโมเลกุลของดีเอ็นเอโดยเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน และปริมาณ ตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอที่สกัดได้ โดยใช้เจลอะกาโรส ความเข้มข้น 0.8 % ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ แล้วนำไปถ่ายภาพภายใต้แสงอุลตราไวโอเล็ต เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานซึ่งสามารถบอกปริมาณดีเอ็นเอโดยประมาณได้

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากบริเวณจีนที่ต้องการ บริเวณที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้มี 1 บริเวณ คือ บริเวณจีน COI โดยไพรเมอร์ที่ใช้มีลำดับดีเอ็นเอ ดังนี้

Fish F1 -5’ TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC 3’-

Fish R1 -5’ TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA 3’-

ตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอที่สกัดได้ โดยใช้เจลอะกาโรส ความเข้มข้น 1.2 % ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ แล้วนำไปถ่ายภาพภายใต้แสงอุลตราไวโอเล็ต เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานซึ่งสามารถบอกปริมาณดีเอ็นเอโดยประมาณได้

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

**ตารางที่ 3.1** ส่วนประกอบของสารละลายที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เพื่อสร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ด

| ส่วนประกอบของสารละลาย | ความเข้มข้นสุดท้ายในปฏิกิริยา | ปริมาตร (µl) |
|---|---|---|
| 1. DNA template | 100 ng | 1 |
| 2. Primer (20 µM) | 2.0 µM | 2 |
| 3. Master mix (2x) | 1.0 x | 20 |
| 4. น้ำบริสุทธิ์ปราศจากไอออน (Deionized water) | - | 7 |
| ปริมาตรรวม | - | 30 |

**ขั้นตอนปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ในการทำเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ด**

ใช้เครื่อง Thermal cycle รุ่น G-Strom ซึ่งการทำงานประกอบด้วย 3 ขั้นตอนดังนี้

**ขั้นตอนที่ 1** Hit lid ที่ 110 °C

**ขั้นตอนที่ 2** เพิ่มรอบ 35 รอบ ประกอบด้วย

Denaturation ที่อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 30 วินาที

Annealing ที่อุณภูมิ 53 °C เป็นเวลา 40 วินาที

Elongation ที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 40 วินาที

ทำซ้ำขั้นตอนที่ 2 จำนวน 35 รอบ

**ขั้นตอนที่ 3** store ที่ 10 °C เป็นเวลา 15 นาที หรือจนกว่าจะนำผลิตภัตณ์พีซีอาร์ออกจากเครื่อง

**การวิเคราะห์ผล**

ส่งผลผลิต PCR ที่ได้ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัทแปซิฟิค ไซเอ็นซ์ จำกัด และเมื่อได้ลำดับดีเอ็นเอมาแล้วนำมาวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม MEGA เวอร์ชั่น 6 (Tamura *et al*., 2012) เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของปลาหมู และส่งลำดับนิวคลีโอไทด์ของปลาหมูที่ได้ทั้งหมดไปเก็บไว้ในระบบฐานข้อมูลของ GenBank เพื่อขอรับรหัสของแต่ละลำดับนิวคลีโอไทด์ (GenBank accession number)

**ขั้นตอนที่ 4 การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอเพื่อตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมของปลาปักเป้าที่พบในแม่น้ำสายหลักในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 3 สาย คือ แม่น้ำโขง แม่น้ำชี และ แม่น้ำมูล**

ใช้ไพรเมอร์ที่เป็น Universal primer ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยไพรเมอร์ขนาด 10 นิวคลีโอไทป์ ซึ่งจะเข้าไปจับกับดีเอ้นเอเป้าหมายในบริเวณที่เป็นเบสคู่สม จำนวน 20 ชนิด ดังตาราง 3.1 ให้ได้ผลผลิตของ PCR ได้หลายๆ ชิ้น ที่แสดงความหลากหลายในหลายระดับตั้งแต่ตัวอย่างภายในประชากร ระหว่างประชากร และระหว่างชนิด ไพรเมอร์ที่ใช้จะเป็น ลำดับเบสซ้ำอย่างง่ายๆ (Simple repeat ) โดยใช้ส่วนประกอบของสารละลายในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่เหมาะสม เพื่อเพิ่มปริมาณแถบดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ตามขั้นตอนที่กำหนดดังตารางที่ 3.2 หลังจากเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอแล้ว แยกชิ้นดีเอ็นเอโดยใช้เจลอะกาโรส ความเข้มข้น 1.2 % บันทึกภาพภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลต นำแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากทุกไพรเมอร์มาวิเคราะห์ผลเพื่อใช้ในการตรวจสอบความเหมือนหรือความแตกต่างทางพันธุกรรมของปลาจากลำน้ำต่าง ๆ โดยการสร้างเดนโดรแกรมด้วยโปรแกรม NTSYS เวอร์ชัน 2.1

**ตารางที่ 3.2** ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ 10 ชนิด ที่ใช้การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของปลาด้วยเทคนิค RAPD

| ไพรเมอร์ | ลำดับนิวคลีโอไทด์ |
|---|---|
| S61 | TTCGAGCCAG |
| S62 | GTGAGGCGTC |
| S63 | GGGGGTCTTT |
| S64 | CCGCATCTAC |
| S65 | GATGACCGCC |
| S66 | GAACGGACTC |
| S67 | GTCCCGACGA |
| S68 | TGGACCGGTG |
| S69 | CTCACCGTCC |
| S70 | TGTCTGGGTG |

**ตารางที่ 3.3** ส่วนประกอบของสารละลายที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ด้วยวิธีการ RAPD

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

| ส่วนประกอบของสารละลาย | ความเข้มข้นสุดท้ายในปฏิกิริยา | ปริมาตร (µl) |
|---|---|---|
| 1. DNA template | 100 ng | 1 |
| 2. Primer (20 µM) | 2.0 µM | 2 |
| 3. Master mix (2x) | 1.0 x | 10 |
| 4. น้ำบริสุทธิ์ปราศจากไอออน (Deionized water) | - | 7 |
| ปริมาตรรวม | - | 20 |

**ขั้นตอนปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ในวิธีการการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ**

ใช้เครื่อง Thermal cycle ซึ่งการทำงานประกอบด้วย 3 ขั้นตอนดังนี้

**ขั้นตอนที่ 1** Initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 3 นาที จำนวน 1 รอบ

**ขั้นตอนที่ 2** Denaturation ที่อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 1 นาที

Annealing ที่อุณหภูมิ 37-58 °C เป็นเวลา 1 นาที

Extension ที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 2 นาที

ทำซ้ำขั้นตอนที่ 2 จำนวน 30 รอบ

**ขั้นตอนที่ 3** Final extension ที่ 72 °C เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

# บทที่ 4
# ผลการศึกษา

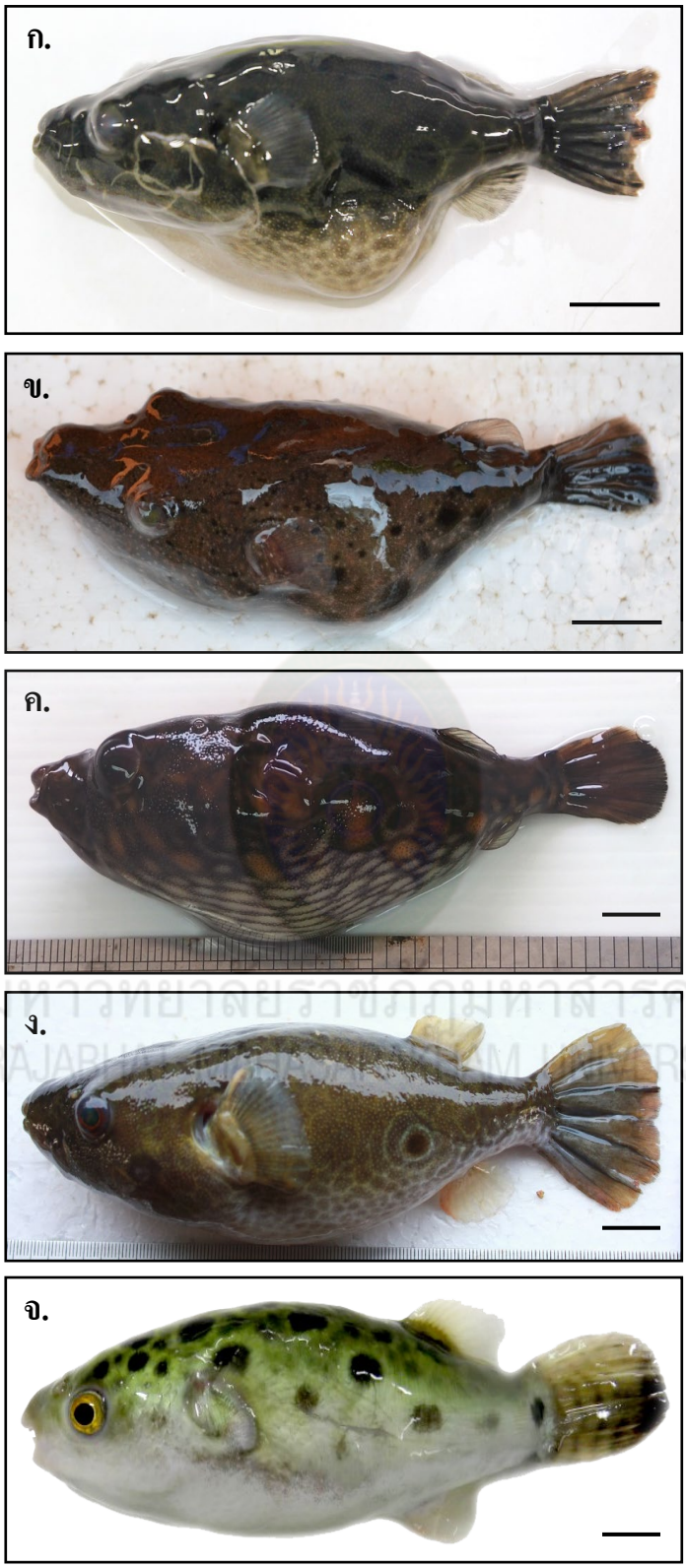
## 4.1 ความหลากชนิดของปลาปักเป้า และการศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์

จากการเก็บตัวอย่างปลาปักเป้าในพื้นที่ธรรมชาติในแม่น้ำสายหลักในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ แม่น้ำชี แม่น้ำมูล และแม่น้ำโขง พบปลาปักเป้า 3 ชนิดคือ ปลาปักเป้าดำ (*Tetraodon cochinchinensis*) ปลาปักเป้าควาย (*T. suvattii*) และปลาปักเป้าเขียว (*T. fluviatilis*) และได้ตัวอย่างปลาปักเป้าท้องตาข่าย (*T. palembangensis*) และปลาปักเป้าเขียวจุด (*Dichotomyctere nigroviridis*) คิดเป็นร้อยละ 50 ของชนิดปลาปักเป้าที่มีรายงานการพบในแหล่งน้ำภาคตะวันออกเฉียงเหนือของไทย และได้ตัวอย่างปลาปักเป้าจากป่าพรุโต๊ะแดง จังหวัดนราธิวาสของประเทศไทย

ตารางที่ 4.1 ความหลากชนิดของปลาปักเป้าที่ศึกษา

| ลำดับ | ชนิด | สกุล | แม่น้ำชี | แม่น้ำมูล | แม่น้ำโขง |
|---|---|---|---|---|---|
| 1. | ปลาปักเป้าดำ (*Tetraodon cochinchinensis*) | *Tetraodon* | ✓ | ✓ | ✓ |
| 2. | ปลาปักเป้าควาย (*T. suvattii*) | *Tetraodon* | ✓ | ✓ | ✓ |
| 3. | ปลาปักเป้าเขียว (*T. palembangensis*) | *Tetraodon* | ✓ | ✓ | ✓ |
| 4. | ปลาปักเป้าเขียวจุด (*T. fluviatilis*) | *Tetraodon* | ป่าพรุโต๊ะแดง | | |
| 5. | ปลาปักเป้าท้องตาข่าย (*Dichotomyctere nigroviridis*) | *Dichotomycter* | ป่าพรุโต๊ะแดง | | |

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
MAHASARAKHAM UNIVERSITY




**ภาพที่ 4.1** ปลาปักเป้าที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ ได้แก่ ปลาปักเป้าดำ (ก.) ปลาปักเป้าควาย (ข.) ปลาปักเป้าท้องตาข่าย (ค.) ปลาปักเป้าเขียว (ง.) และปลาปักเป้าเขียวจุด (จ.)

การศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ของปลาวงศ์ปลาปักเป้าในประเทศไทย ได้แก่ ปลาปักเป้าดำ (*Tetraodon cochinchinensis*) ปลาปักเป้าควาย (*T. suvattii*) ปลาปักเป้าท้องตาข่าย (*T. palembangensis*) ปลาปักเป้าเขียว (*T. fluviatilis*) และปลาปักเป้าเขียวจุด (*Dichotomyctere nigroviridis*) ในครั้งนี้ ได้ใช้ตัวอย่างปลาปักเป้าดำ จำนวน 8 ตัว (เพศผู้และเพศเมียอย่างละ 4 ตัว) ปลาปักเป้าควาย จำนวน 10 ตัว (เพศผู้และเพศเมียอย่างละ 5 ตัว) ปลาปักเป้าท้องตาข่าย 4 ตัว (เพศผู้และเพศเมียอย่างละ 2 ตัว) ปลาปักเป้าเขียว จำนวน 10 ตัว (เพศผู้และเพศเมียอย่างละ 5 ตัว) และปลาปักเป้าเขียวจุดจำนวน 4 ตัว (เพศผู้และเพศเมียอย่างละ 2 ตัว) จากประชากรแม่น้ำชี จังหวัดร้อยเอ็ด แม่น้ำสงคราม จังหวัดนครพนม แม่น้ำเจ้าพระยา จังหวัดสิงห์บุรี และป่าพรุโต๊ะแดง จังหวัดนราธิวาสของประเทศไทย (ภาพที่ 4.1) โดยเตรียมโครโมโซมจากปลาทั้งแบบทางตรงและทางอ้อม ย้อมสีโครโมโซมแบบธรรมดา และแถบสีแบบนอร์ ได้ผลการศึกษา ดังนี้

**1. จำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ และจำนวนโครโมโซมพื้นฐาน**

จำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ (diploid, 2*n*) ของปลาปักเป้าดำ ปลาปักเป้าควาย ปลาปักเป้าท้องตาข่าย ปลาปักเป้าเขียว และปลาปักเป้าเขียวจุด เท่ากับ 40, 40, 36, 40 และ 42 แท่ง ตามลำดับ และจำนวนโครโมโซมพื้นฐาน (fundamental number, NF) เท่ากับ 74, 78, 72, 76 และ 80 ตามลำดับ ทั้งเพศผู้และเพศเมีย และไม่พบความแตกต่างของลักษณะโครโมโซมเพศ (sex-chromosome) ระหว่างเพศผู้และเพศเมียในปลาปักเป้าทุกชนิดที่ศึกษา

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
MAHASARAKHAM RAJABHAT UNIVERSITY

**2. ชนิดของโครโมโซม** (ตารางที่ 4.2)

ปลาปักเป้าดำมีโครโมโซม 4 ชนิด ได้แก่ ชนิดเมทาเซนทริก (metacentric) จำนวน 12 แท่ง ซับเมทาเซนทริก (submetacentric) จำนวน 10 แท่ง อะโครเซนทริก (acrocentric) จำนวน 12 แท่ง และเทโลเซนทริก (telocentric) จำนวน 6 แท่ง (ภาพที่ 4.2 และ 4.3) ปลาปักเป้าดำมีสูตรแคริโอไทป์ ดังนี้

$2n$ (40) = $m_{12} + sm_{10} + a_{12} + t_6$

ปลาปักเป้าควายมีโครโมโซม 3 ชนิด ได้แก่ ชนิดเมทาเซนทริก จำนวน 16 แท่ง ซับเมทาเซนทริก จำนวน 22 แท่ง และเทโลเซนทริก จำนวน 2 แท่ง (ภาพที่ 4.6 และ 4.7) ปลาปักเป้าควายมีสูตรแคริโอไทป์ ดังนี้

$2n$ (40) = $m_{16} + sm_{22} + t_2$

ปลาปักเป้าท้องตาข่ายมีโครโมโซม 2 ชนิด ได้แก่ ชนิดเมทาเซนทริก จำนวน 20 แท่ง และซับเมทาเซนทริก จำนวน 16 แท่ง (ภาพที่ 4.10 และ 4.11) ปลาปักเป้าท้องตาข่ายมีสูตรแคริโอไทป์ ดังนี้

$2n$ (40) = $m_{20} + sm_{16}$

ปลาปักเป้าเขียวมีโครโมโซม 4 ชนิด ได้แก่ ชนิดเมทาเซนทริก จำนวน 16 แท่ง ซับเมทาเซนทริก จำนวน 12 แท่ง อะโครเซนทริก จำนวน 8 แท่ง และเทโลเซนทริก จำนวน 4 แท่ง (ภาพที่ 4.14 และ 4.15) ปลาปักเป้าเขียวมีสูตรแคริโอไทป์ ดังนี้

$2n$ (40) = $m_{16} + sm_{12} + a_8 + t_4$

ปลาปักเป้าเขียวจุดมีโครโมโซม 4 ชนิด ได้แก่ ชนิดเมทาเซนทริก จำนวน 18 แท่ง ซับเมทาเซนทริก จำนวน 8 แท่ง อะโครเซนทริก จำนวน 12 แท่ง และเทโลเซนทริก จำนวน 4 แท่ง (ภาพที่ 4.17) ปลาปักเป้าเขียวจุดมีสูตรแคริโอไทป์ ดังนี้

$2n$ (40) = $m_{18} + sm_8 + a_{12} + t_4$

**ตารางที่ 4.2** พันธุศาสตร์เซลล์ของปลาวงศ์ปลาปักเป้า 5 ชนิด ในประเทศไทย (NF = fundamental number; $2n$ = diploid number; m = metacentric chromosome; sm = submetacentric chromosome; a = acrocentric chromosome และ t = telocentric chromosome)

| ชนิดของปลา | $2n$ | NF | ชนิดของโครโมโซม | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | m | sm | a | t |
| ปลาปักเป้าดำ (*Tetraodon cochinchinensis*) | 40 | 74 | 12 | 10 | 12 | 6 |
| ปลาปักเป้าควาย (*Tetraodon suvattii*) | 40 | 78 | 16 | 22 | 0 | 2 |
| ปลาปักเป้าท้องตาข่าย (*Tetraodon palembangensis*) | 36 | 72 | 20 | 16 | 0 | 0 |
| ปลาปักเป้าเขียว (*Tetraodon fluviatilis*) | 40 | 76 | 16 | 12 | 8 | 4 |
| ปลาปักเป้าเขียวจุด (*Dichotomyctere nigroviridis*) | 42 | 80 | 18 | 8 | 12 | 4 |

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

**3. โครโมโซมเครื่องหมาย**

โครโมโซมเครื่องหมาย (marker chromosome) คือ โครโมโซมที่มีลักษณะเฉพาะ สามารถจำแนกได้ง่าย และตรวจพบได้ในสกุลหรือชนิดของสิ่งมีชีวิตนั้น ๆ รวมทั้งโครโมโซมที่มีลักษณะพิเศษ เช่น มีรอยคอดที่สอง (secondary constriction) มี satellite หรือ knob การศึกษาครั้งนี้ได้ตรวจพบโครโมโซมเครื่องหมายของของปลาปักเป้าดำ ปลาปักเป้าควาย ปลาปักเป้าท้องตาข่าย ปลาปักเป้าเขียว และปลาปักเป้าเขียวจุด ดังนี้

จากการย้อมสีโครโมโซมแบบธรรมดา พบว่าปลาปักเป้าดำมีโครโมโซมคู่ใหญ่สุดเป็นชนิดเมทา เซนทริก และโครโมโซมขนาดเล็กเป็นชนิดเทโลเซนทริก จากการย้อมแถบสีแบบนอร์ พบตำแหน่งนอร์ 2 ตำแหน่ง อยู่บนโครโมโซมเมทาเซนทริกคู่ที่ 4 มีตำแหน่งอยู่ใกล้เซนโทรเมียร์ (subcentromeric NOR) บนแขนข้างสั้น (short arm, p) ของโครโมโซมคู่ที่ 4 ทั้งเพศผู้และเพศเมีย (ภาพที่ 4.4 และ 4.5)

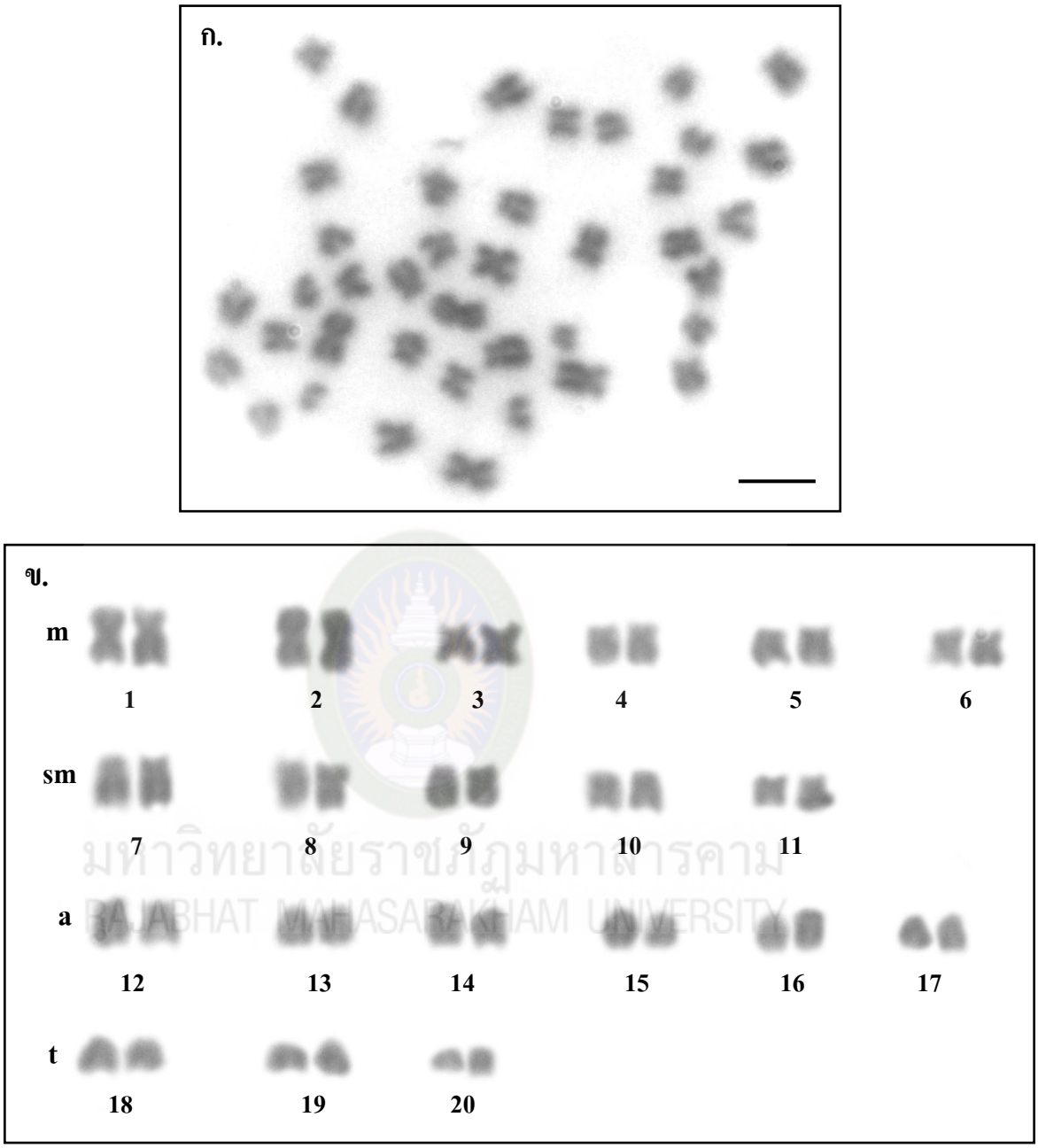
จากการย้อมสีโครโมโซมแบบธรรมดา พบว่าปลาปักเป้าควายมีโครโมโซมคู่ใหญ่สุดเป็นชนิดเมทา เซนทริก และโครโมโซมขนาดเล็กเป็นชนิดเทโลเซนทริก จากการย้อมแถบสีแบบนอร์ พบตำแหน่งนอร์ 2 ตำแหน่ง อยู่บนโครโมโซมเมทาเซนทริกคู่ที่ 5 มีตำแหน่งอยู่ใกล้เซนโทรเมียร์บนแขนข้างสั้นของโครโมโซมคู่ที่ 5 ทั้งเพศผู้และเพศเมีย (ภาพที่ 4.8 และ 4.9)

จากการย้อมสีโครโมโซมแบบธรรมดา พบว่าปลาปักเป้าท้องตาข่ายมีโครโมโซมคู่ใหญ่สุดเป็นชนิด เมทาเซนทริก และโครโมโซมขนาดเล็กเป็นชนิดซับเมทาเซนทริก จากการย้อมแถบสีแบบนอร์พบตำแหน่งนอร์ 2 ตำแหน่ง อยู่บนโครโมโซมเมทาเซนทริกคู่ที่ 6 มีตำแหน่งอยู่ใกล้เซนโทรเมียร์บนแขนข้างสั้นของโครโมโซมคู่ที่ 5 ทั้งเพศผู้และเพศเมีย (ภาพที่ 4.12 และ 4.13)

จากการย้อมสีโครโมโซมแบบธรรมดา พบว่าปลาปักเป้าเขียวมีโครโมโซมคู่ใหญ่สุดเป็นชนิดเมทา เซนทริก และโครโมโซมขนาดเล็กเป็นชนิดเทโลเซนทริก จากการย้อมแถบสีแบบนอร์ พบตำแหน่งนอร์เพียง 1 ตำแหน่ง อยู่บนโครโมโซม แสดงให้เห็นถึงการมีภาวะพหุสัณฐาน (polymorphism) ของตำแหน่งนอร์ โดยมีตำแหน่งนอร์อยู่ใกล้เซนโทรเมียร์ทั้งเพศผู้และเพศเมีย (ภาพที่ 4.16)

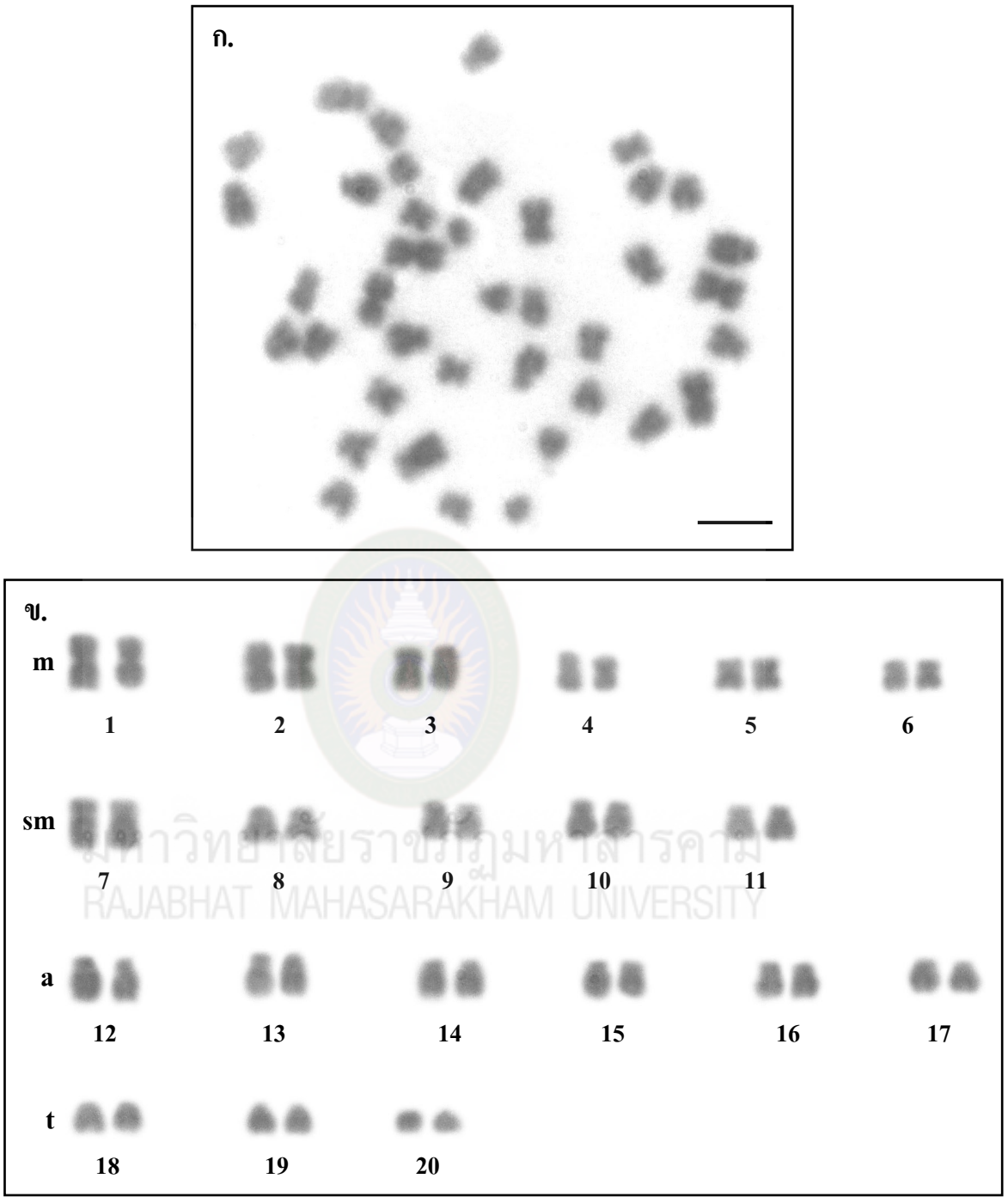
จากการย้อมสีโครโมโซมแบบธรรมดา พบว่าปลาปักเป้าเขียวจุดมีโครโมโซมคู่ใหญ่สุดเป็นชนิดเมทาเซนทริก และโครโมโซมขนาดเล็กเป็นชนิดเทโลเซนทริก จากการย้อมแถบสีแบบนอร์ พบตำแหน่งนอร์ 2 ตำแหน่ง อยู่บนโครโมโซมเมทาเซนทริกคู่ที่ 12 มีตำแหน่งใกล้เทโลเมียร์ (telomeric NOR) บนแขนข้างสั้นของโครโมโซมคู่ที่ 12 ทั้งเพศผู้และเพศเมีย (ภาพที่ 4.17)

มหาวิทยาลัยมหาสารคาม MAHASARAKHAM UNIVERSITY



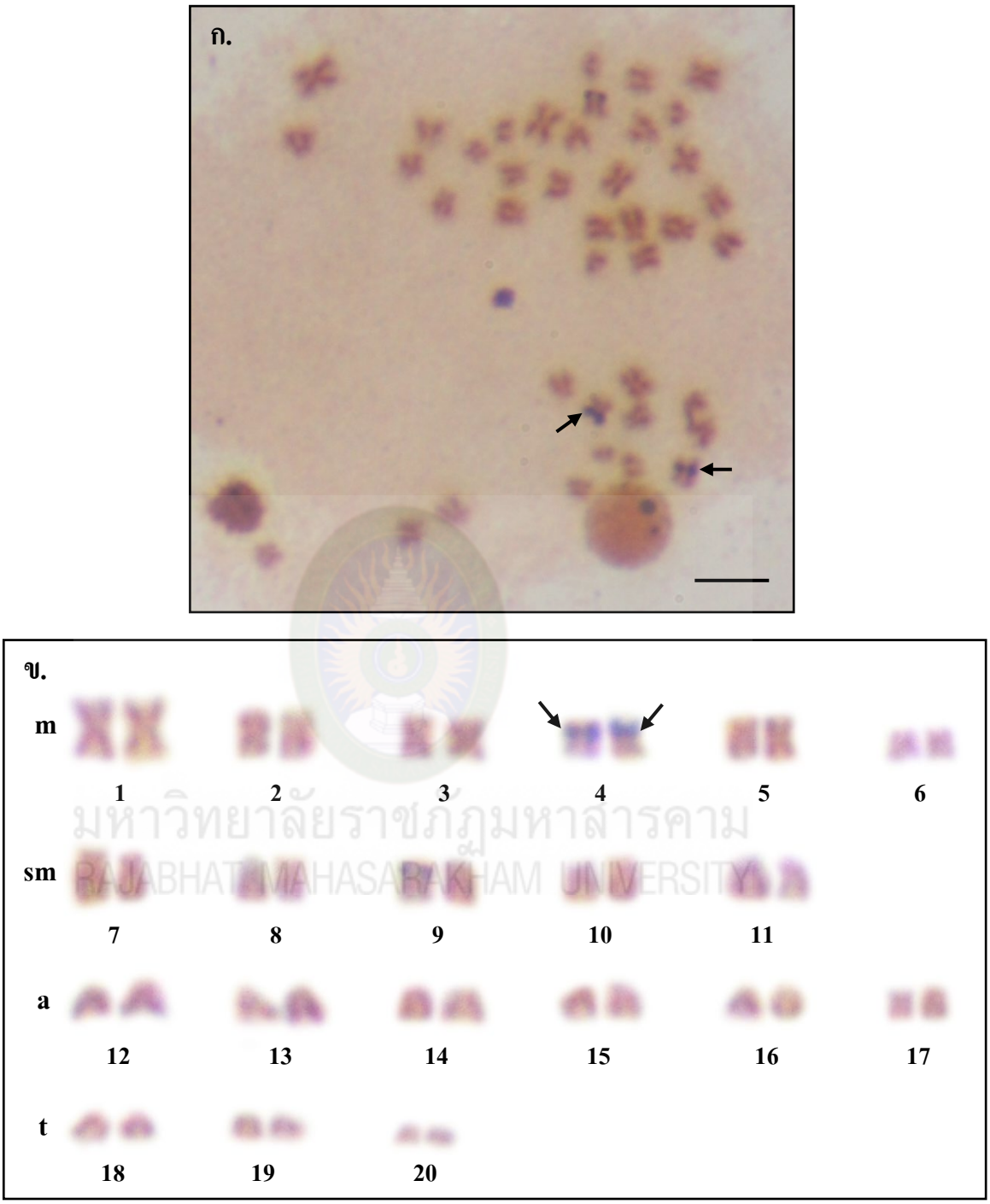

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

**ภาพที่ 4.2** เมทาเฟสโครโมโซม (ก.) และแคริโอไทป์ (ข.) ของปลาปักเป้าดำ (*Tetraodon cochinchinensis*) เพศผู้ มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ (2*n*) 40 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา (สเกลบาร์เท่ากับ 5 ไมโครเมตร)



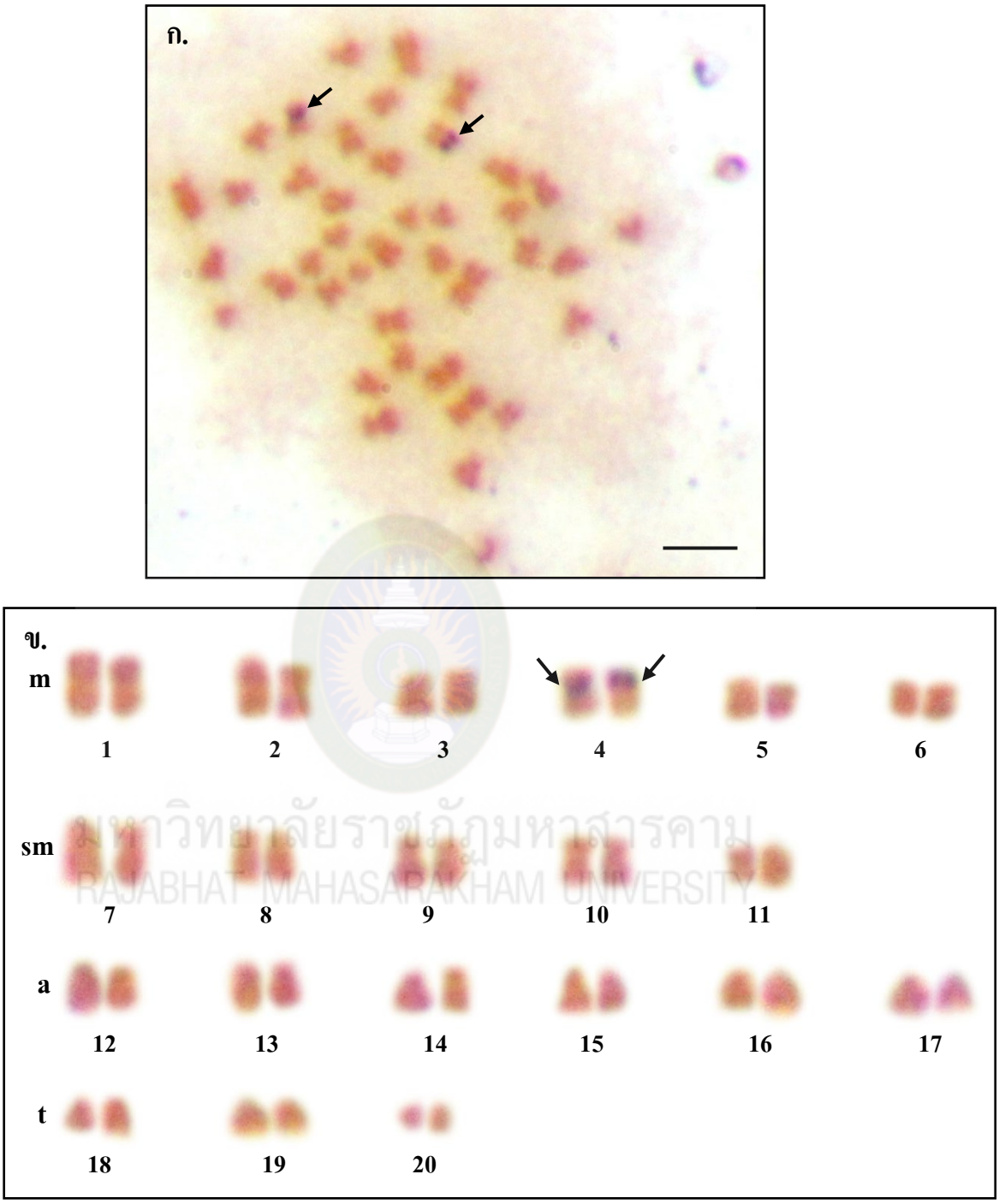

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

**ภาพที่ 4.3** เมทาเฟสโครโมโซม (ก.) และแคริโอไทป์ (ข.) ของปลาปักเป้าดำ (*Tetraodon cochinchinensis*) เพศเมีย มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ (2*n*) 40 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา (สเกลบาร์เท่ากับ 5 ไมโครเมตร)



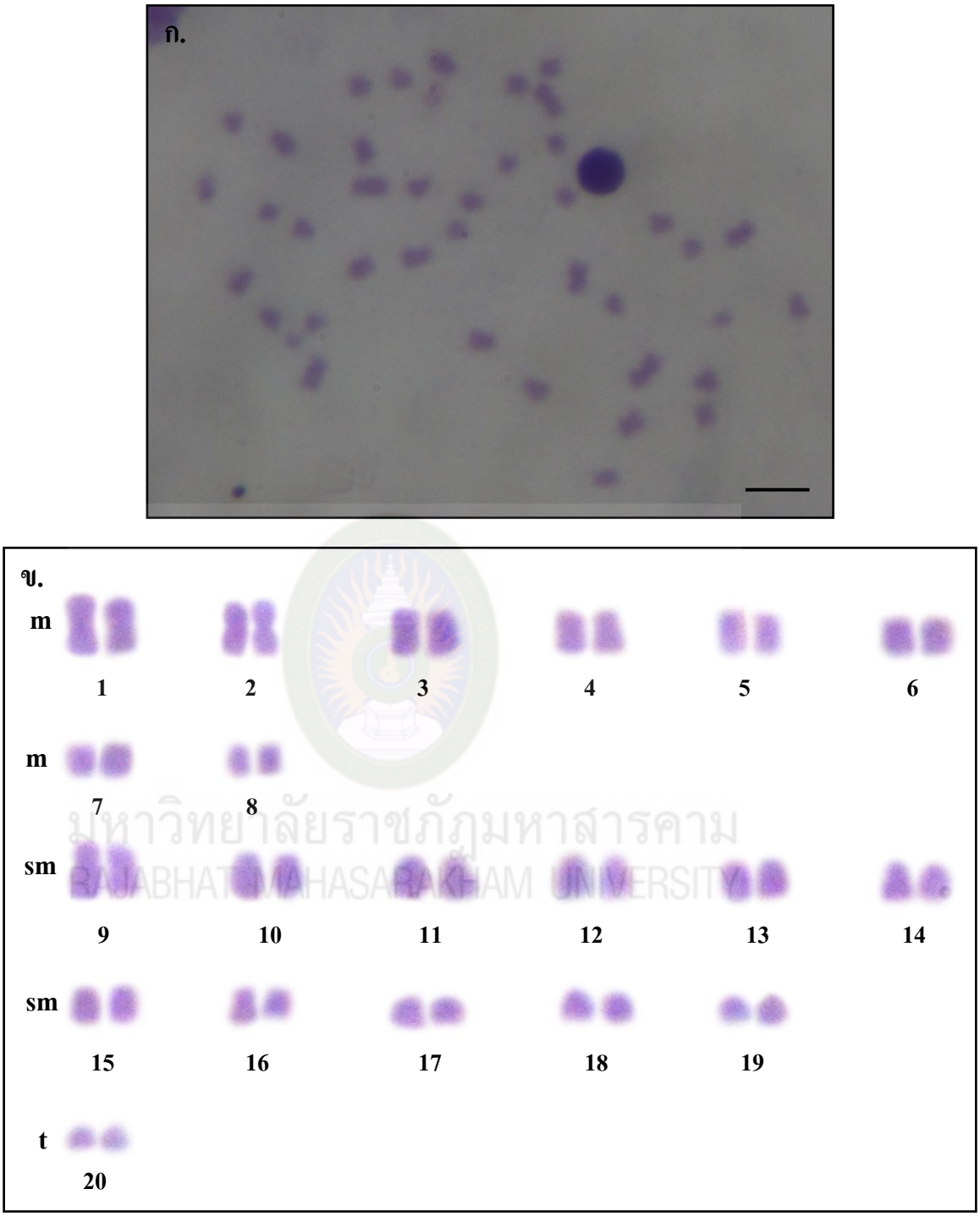

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

**ภาพที่ 4.4** เมทาเฟสโครโมโซม (ก.) และแคริโอไทป์ (ข.) ของปลาปักเป้าดำ (*Tetraodon cochinchinensis*) เพศผู้ มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ (2*n*) 40 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมแถบสีแบบนอร์ ลูกศรชี้แสดงตำแหน่งนอร์ (สเกลบาร์เท่ากับ 5 ไมโครเมตร)



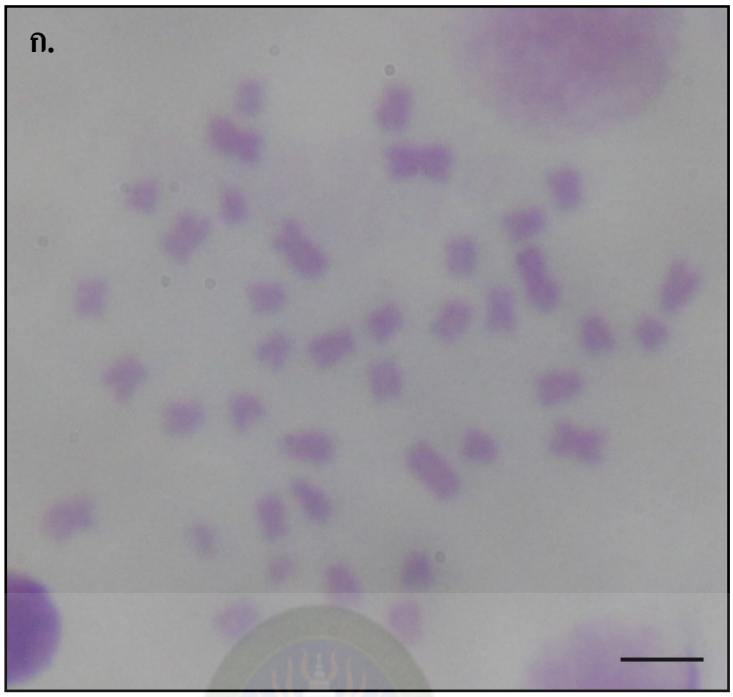

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

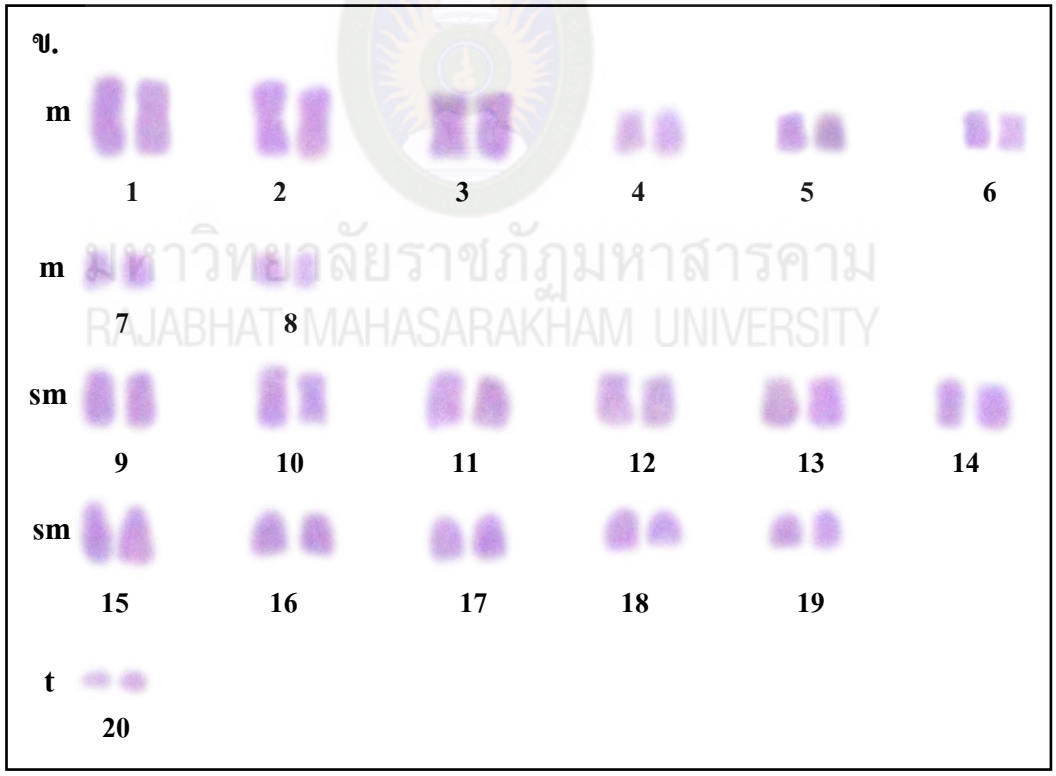
**ภาพที่ 4.5** เมทาเฟสโครโมโซม (ก.) และแคริโอไทป์ (ข.) ของปลาปักเป้าดำ (*Tetraodon cochinchinensis*) เพศเมีย มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ (2*n*) 40 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมแถบสีแบบนอร์ ลูกศรชี้แสดงตำแหน่งนอร์ (สเกลบาร์เท่ากับ 5 ไมโครเมตร)




มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

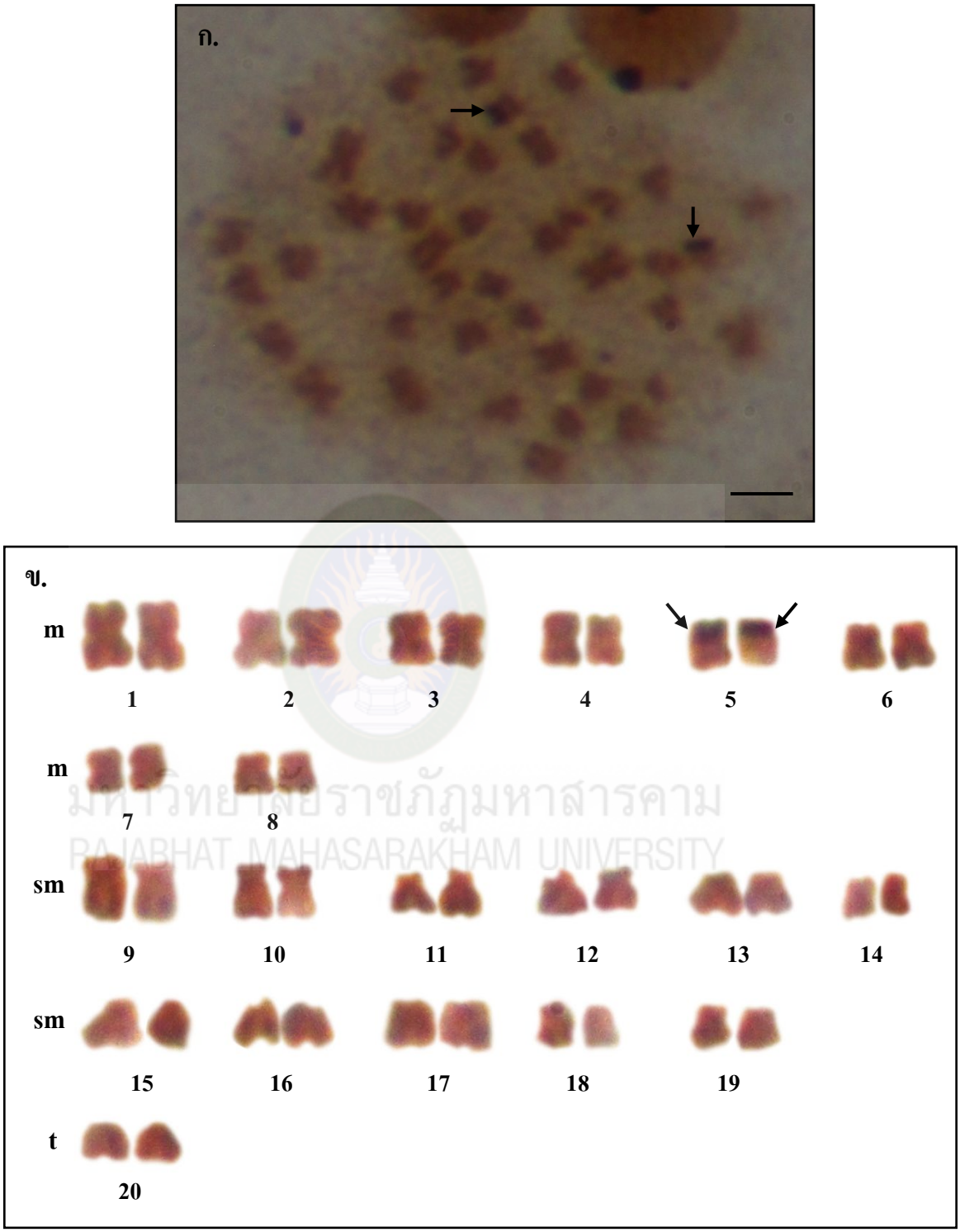
**ภาพที่ 4.6** เมทาเฟสโครโมโซม (ก.) และแคริโอไทป์ (ข.) ของปลาปักเป้าควาย (*Tetraodon suvattii*) เพศผู้มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ (2*n*) 40 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา (สเกลบาร์เท่ากับ 5 ไมโครเมตร)



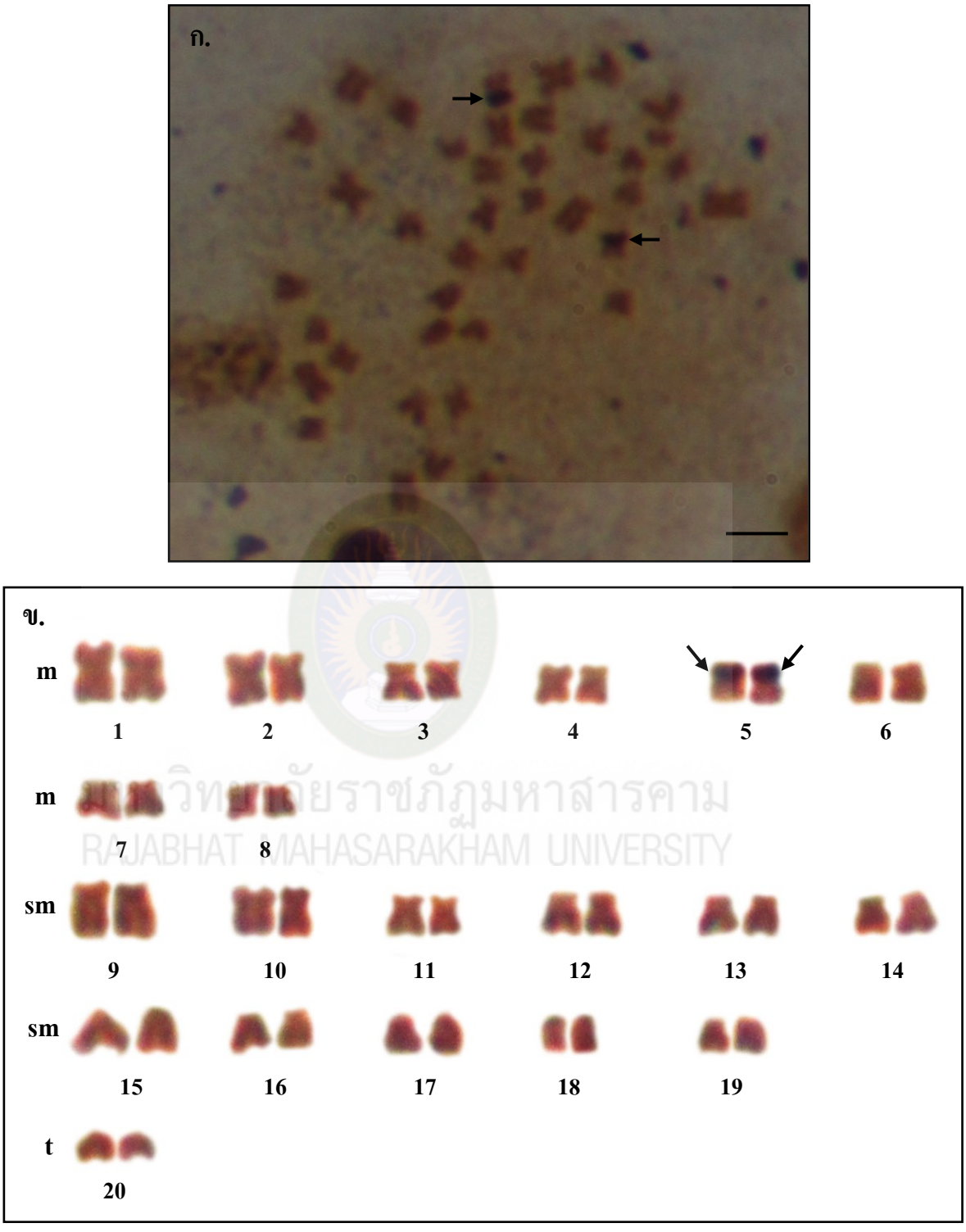

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

**ภาพที่ 4.7** เมทาเฟสโครโมโซม (ก.) และแคริโอไทป์ (ข.) ของปลาปักเป้าควาย (*Tetraodon suvattii*) เพศเมียมีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ (2*n*) 40 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา (สเกลบาร์เท่ากับ 5 ไมโครเมตร)



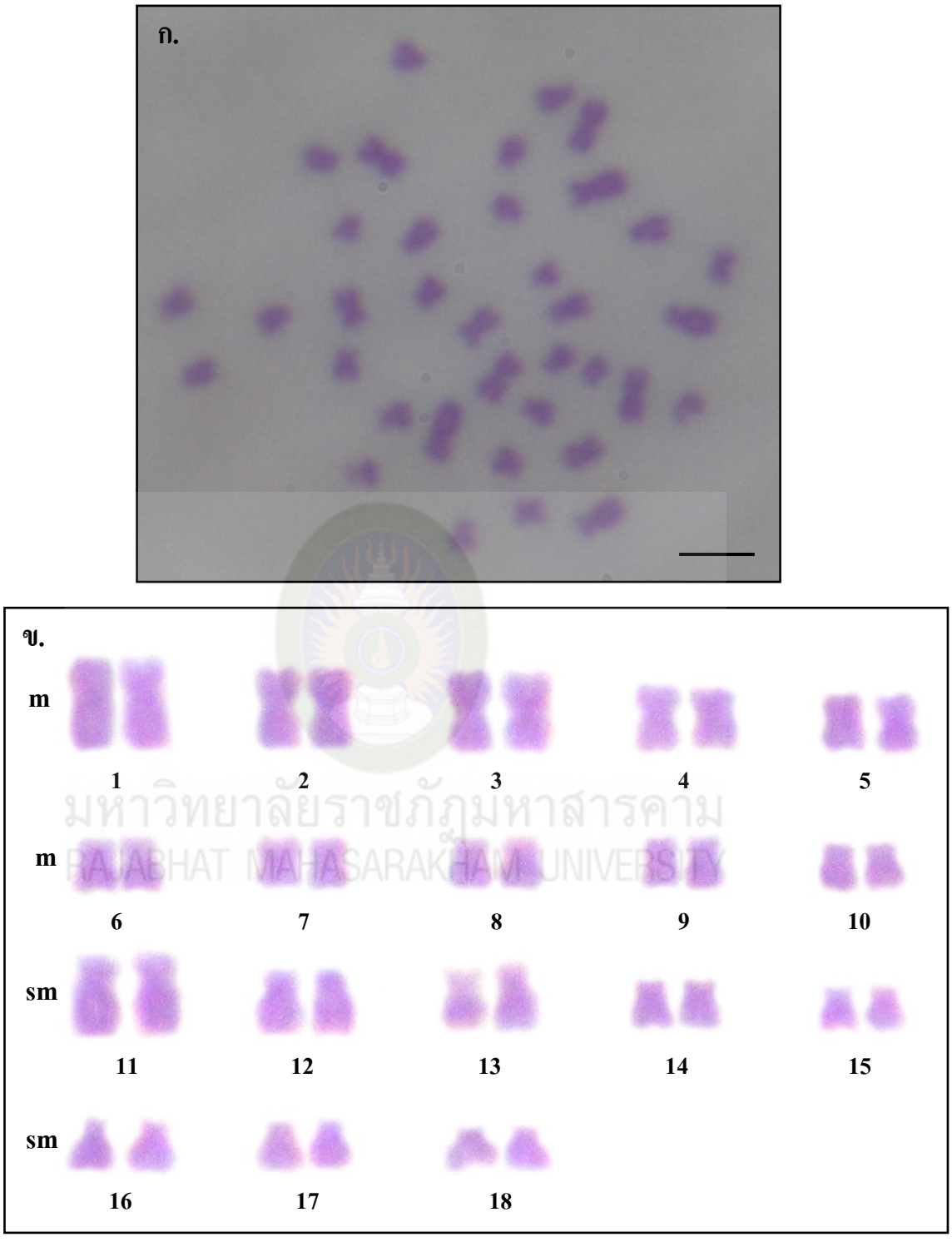

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

**ภาพที่ 4.8** เมทาเฟสโครโมโซม (ก.) และแคริโอไทป์ (ข.) ของปลาปักเป้าควาย (*Tetraodon suvattii*) เพศผู้มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ (2*n*) 40 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมแถบสีแบบนอร์ ลูกศรชี้แสดงตำแหน่งนอร์ (สเกลบาร์เท่ากับ 5 ไมโครเมตร)



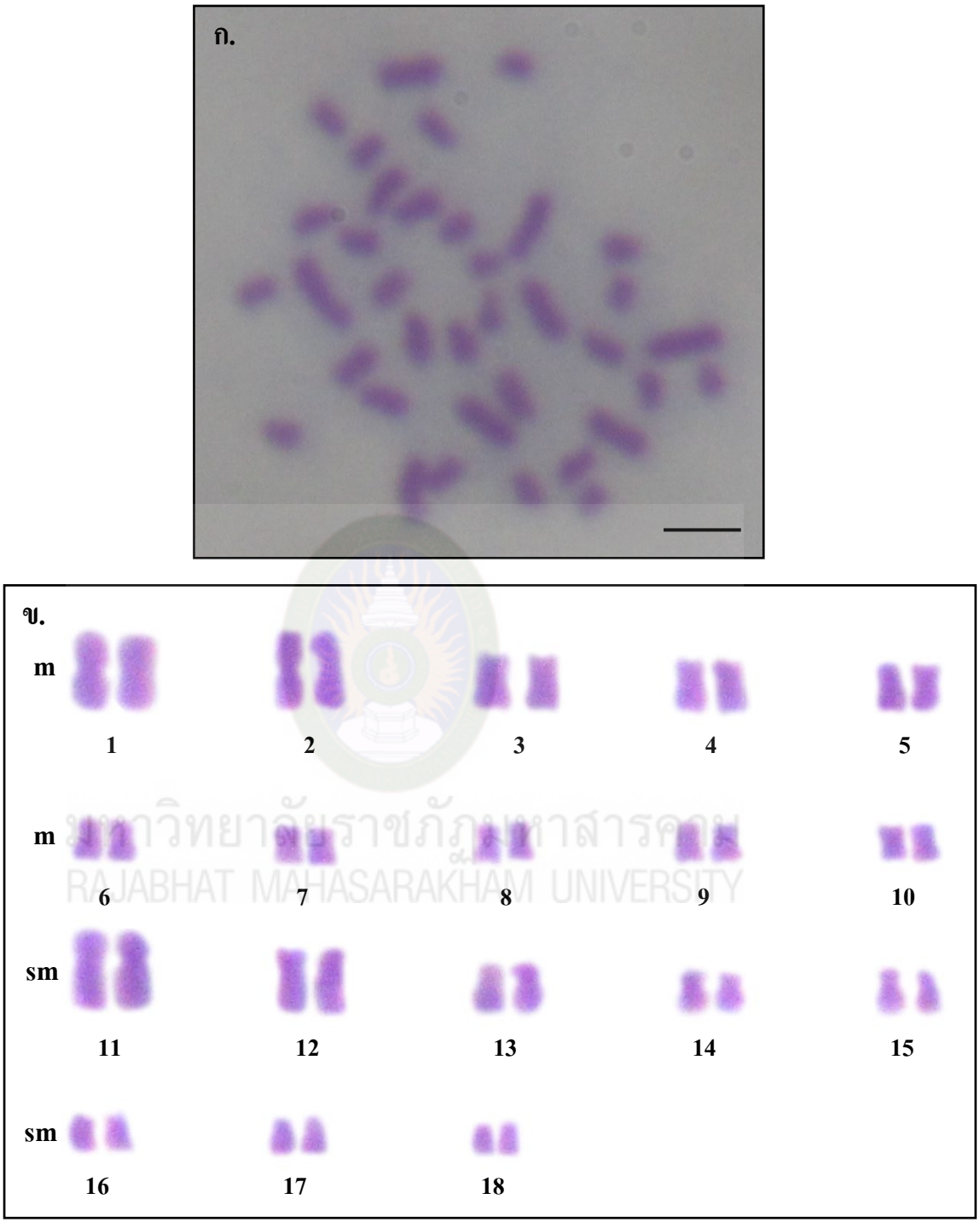

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

**ภาพที่ 4.9** เมทาเฟสโครโมโซม (ก.) และแคริโอไทป์ (ข.) ของปลาปักเป้าควาย (*Tetraodon suvattii*) เพศเมียมีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ (2*n*) 40 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมแถบสีแบบนอร์ ลูกศรชี้แสดงตำแหน่งนอร์ (สเกลบาร์เท่ากับ 5 ไมโครเมตร)



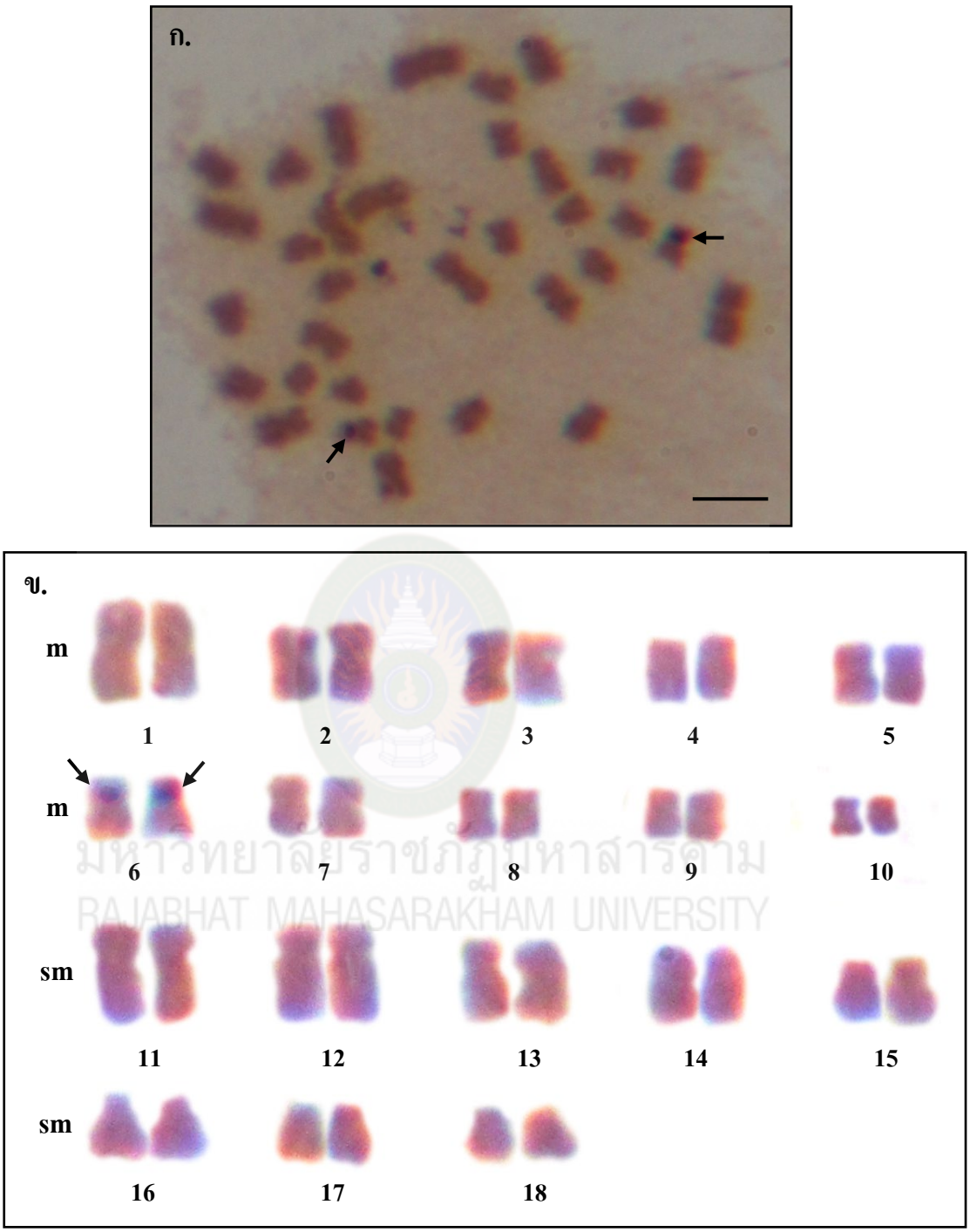

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

**ภาพที่ 4.10** เมทาเฟสโครโมโซม (ก.) และแคริโอไทป์ (ข.) ของปลาปักเป้าท้องตาข่าย (*Tetraodon palembangensis*) เพศผู้ มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ (2*n*) 36 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา (สเกลบาร์เท่ากับ 5 ไมโครเมตร)



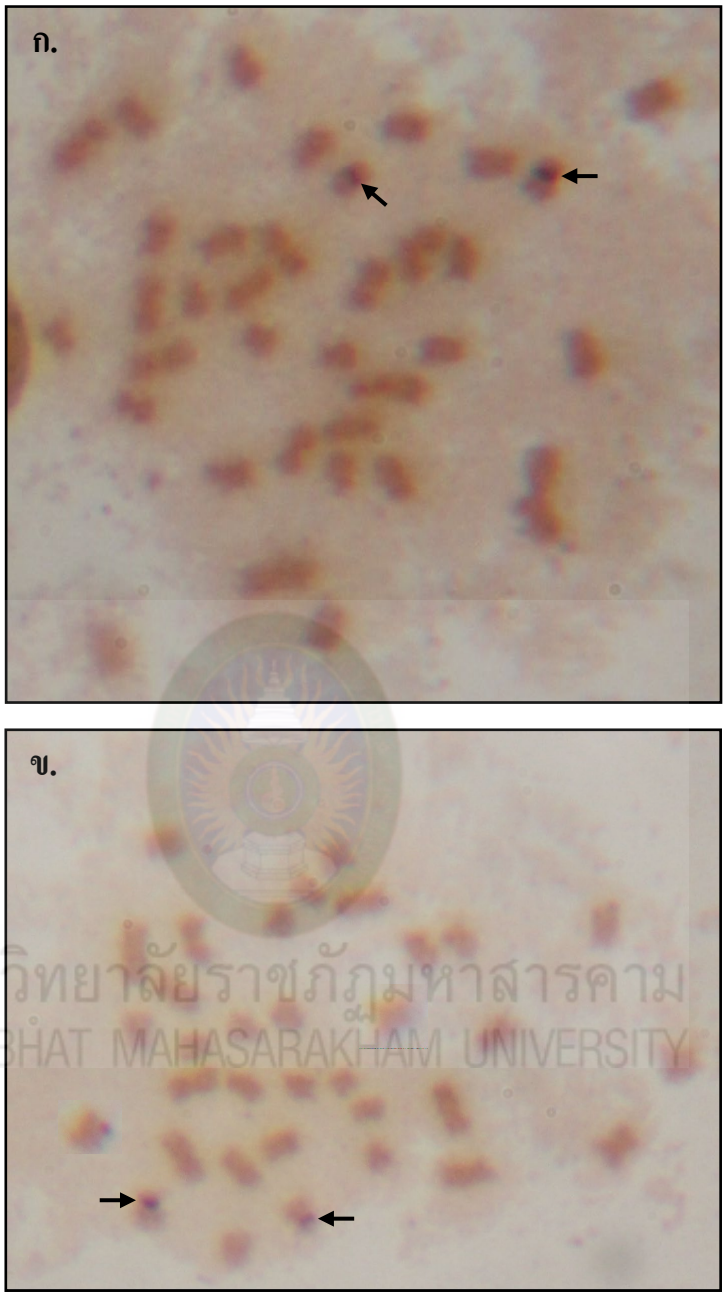

**ภาพที่ 4.11** เมทาเฟสโครโมโซม (ก.) และแคริโอไทป์ (ข.) ของปลาปักเป้าท้องตาข่าย (*Tetraodon palembangensis*) เพศเมีย มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ (2*n*) 36 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา (สเกลบาร์เท่ากับ 5 ไมโครเมตร)

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY



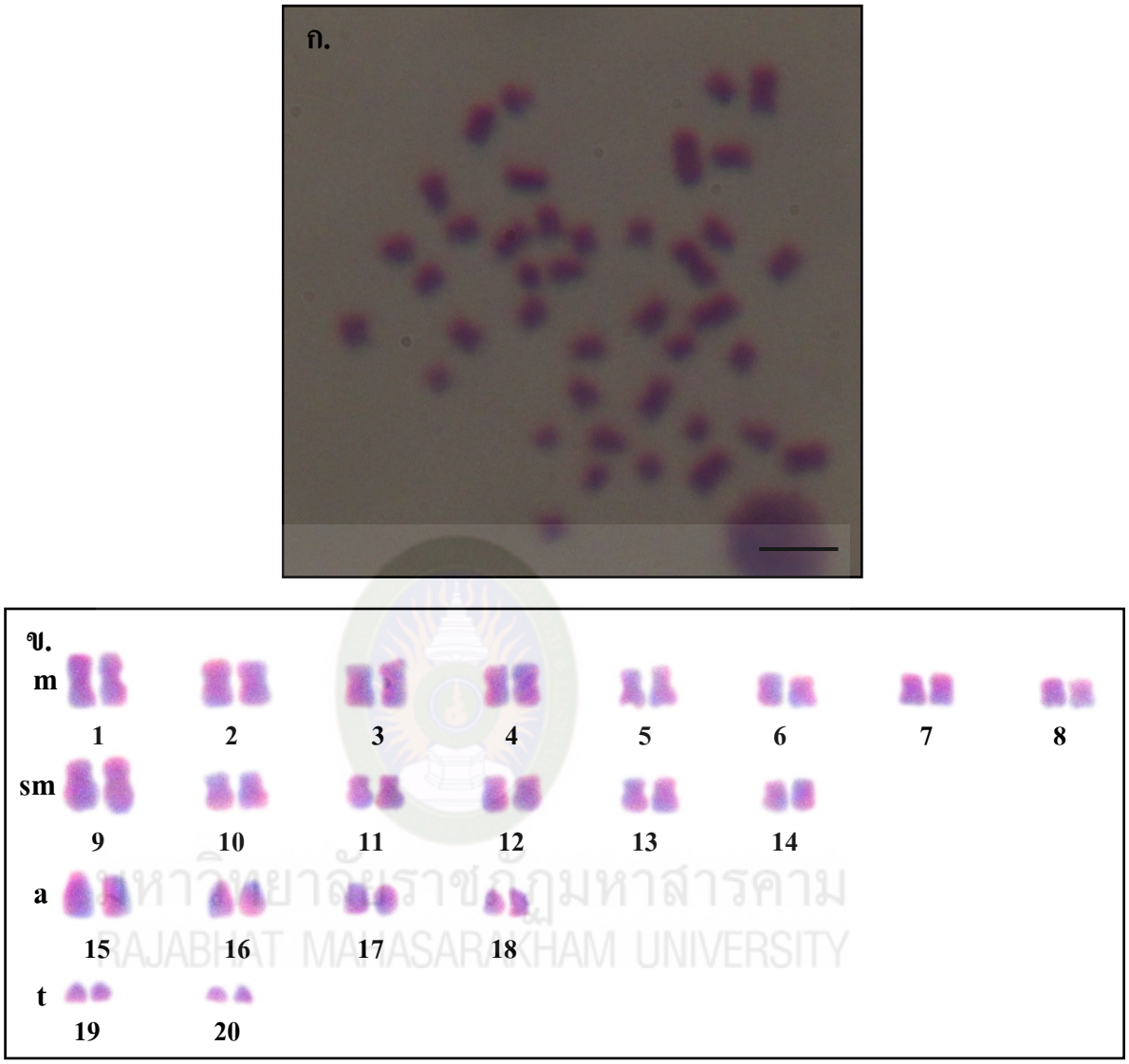

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

**ภาพที่ 12** เมทาเฟสโครโมโซม (ก.) และแคริโอไทป์ (ข.) ของปลาปักเป้าท้องตาข่าย (*Tetraodon palembangensis*) เพศผู้ มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ (2*n*) 36 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมแถบสีแบบนอร์ ลูกศรชี้แสดงตำแหน่งนอร์ (สเกลบาร์เท่ากับ 5 ไมโครเมตร)



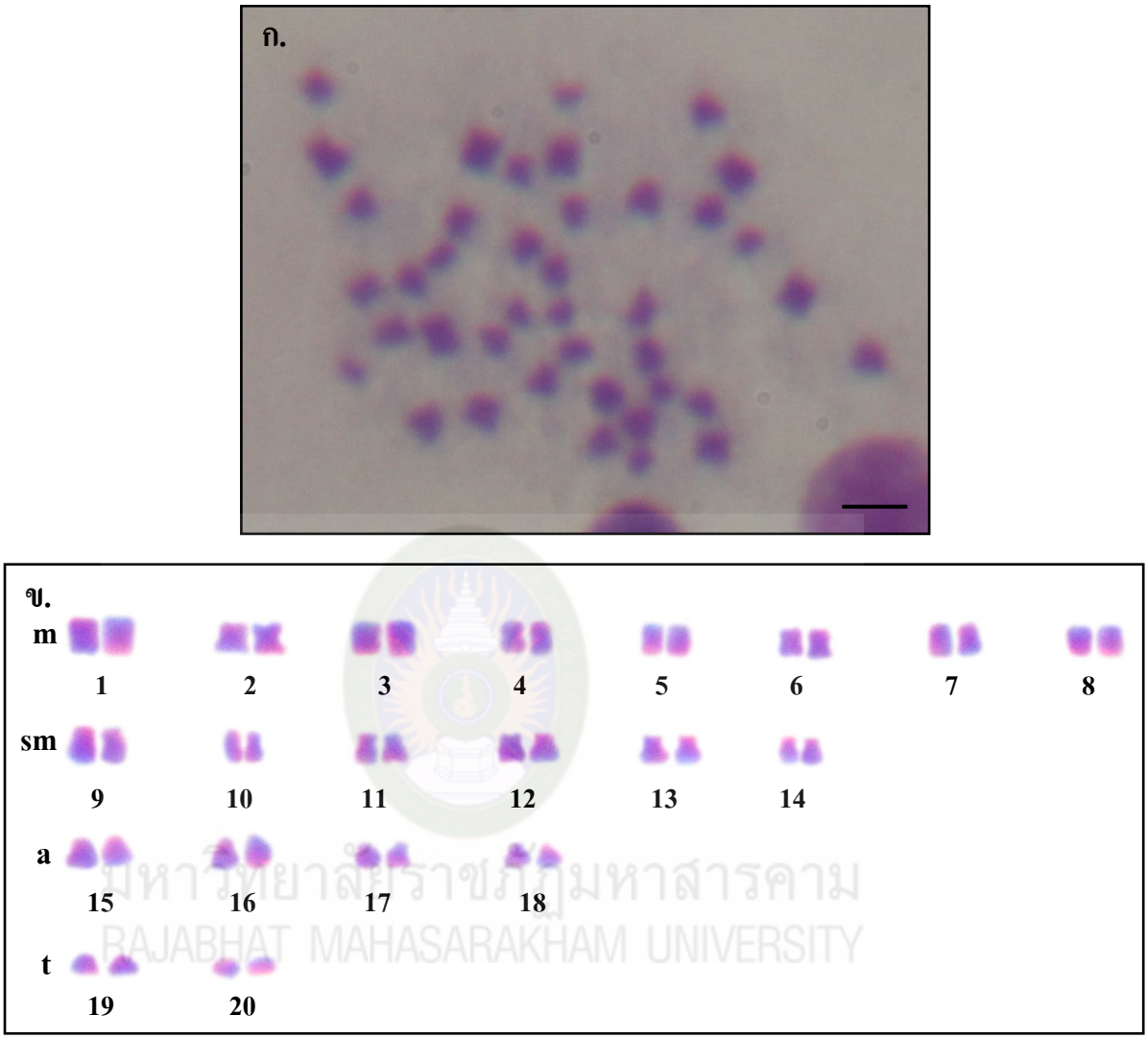

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

**ภาพที่ 4.13** เมทาเฟสโครโมโซม (ก. และ ข.) ของปลาปักเป้าท้องตาข่าย (*Tetraodon palembangensis*) เพศเมีย มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ (2*n*) 36 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมแถบสีแบบนอร์ ลูกศรชี้แสดงตำแหน่งนอร์ (สเกลบาร์เท่ากับ 5 ไมโครเมตร)



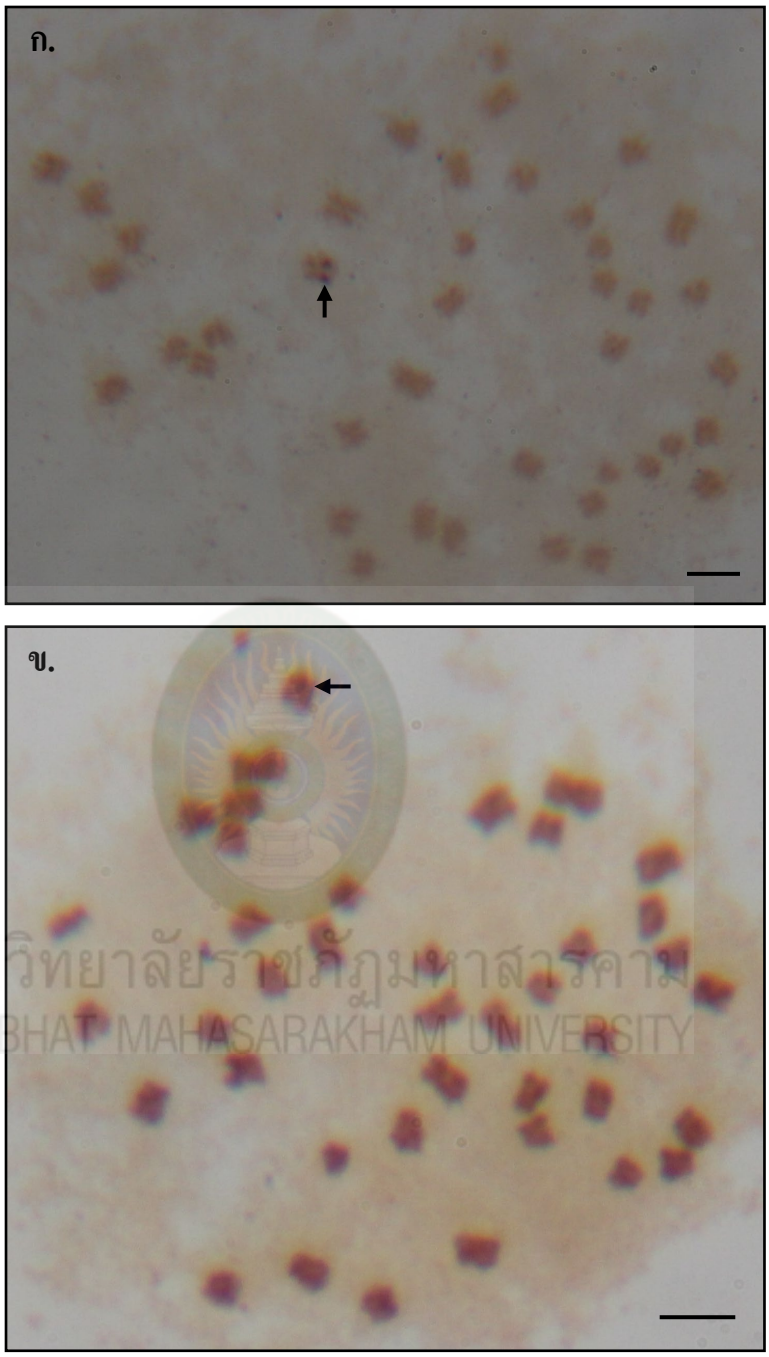

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

**ภาพที่ 4.14** เมทาเฟสโครโมโซม (ก.) และแคริโอไทป์ (ข.) ของปลาปักเป้าเขียว (*Tetraodon fluviatilis*) เพศผู้ มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ (2*n*) 40 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา (สเกลบาร์เท่ากับ 5 ไมโครเมตร)



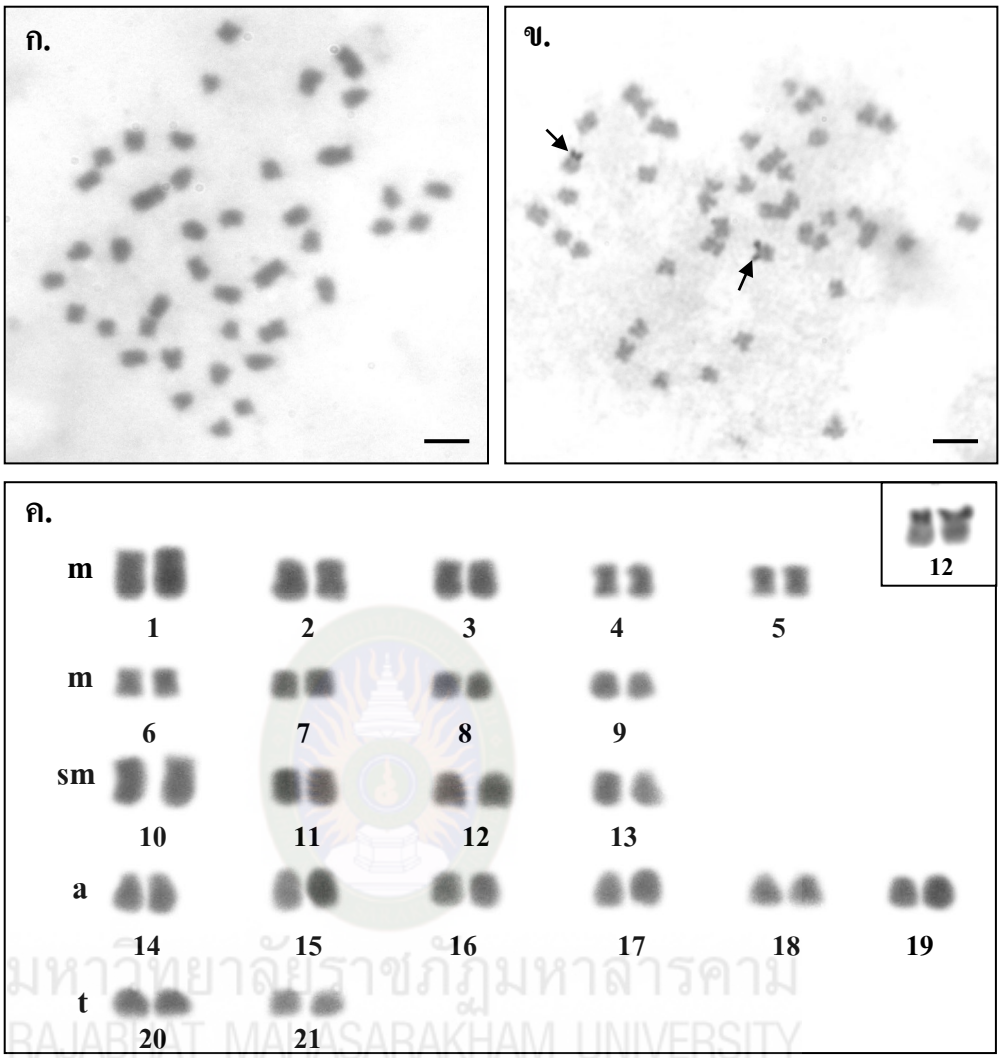

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

**ภาพที่ 4.15** เมทาเฟสโครโมโซม (ก.) และแคริโอไทป์ (ข.) ของปลาปักเป้าเขียว (*Tetraodon fluviatilis*) เพศเมีย มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ (2*n*) 40 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา (สเกลบาร์เท่ากับ 5 ไมโครเมตร)




มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

**ภาพที่ 4.16** เมทาเฟสโครโมโซมของปลาปักเป้าเขียว (*Tetraodon fluviatilis*) เพศผู้ (ก.) และเพศเมีย (ข.) มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ (2*n*) 40 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมแถบสีแบบนอร์ ลูกศรชี้แสดงตำแหน่งนอร์ (สเกลบาร์เท่ากับ 5 ไมโครเมตร)




มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

**ภาพที่ 4.17** เมทาเฟสโครโมโซมและแคริโอไทป์ของปลาปักเป้าเขียวจุด (*Dichotomyctere nigroviridis*) มีจำนวนโครโมโซม ดิพลอยด์เท่ากับ (2*n*) 42 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา (ก. และ ค.) และการย้อมแถบสีแบบนอร์ (ข.) กรอบสี่เหลี่ยมเล็กแสดงตำแหน่งนอร์ (สเกลบาร์เท่ากับ 5 ไมโครเมตร)

**4.2 ผลการสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อปลาปักเป้า**

ทำการสกัดดีเอ็นเอจากชิ้นส่วนของปลาปักเป้าแต่ละชนิด โดยชุดสกัดดีเอ็นเอ วัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้ โดยใช้เครื่อง Nanodrop spectrophotometer วัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (DNA concentration) ความบริสุทธิ์ (DNA purity) และคุณภาพของดีเอ็นเอ (DNA quality) ดูผลจากการนำ DNA ไปวัด OD และหาอัตราส่วน (ratio) ของ OD 260/280 แบ่งดีเอ็นเอที่วัดได้เป็น 2 ระดับ

Grade 1 the highest quality = มี DNA ratio 1.8-2.0

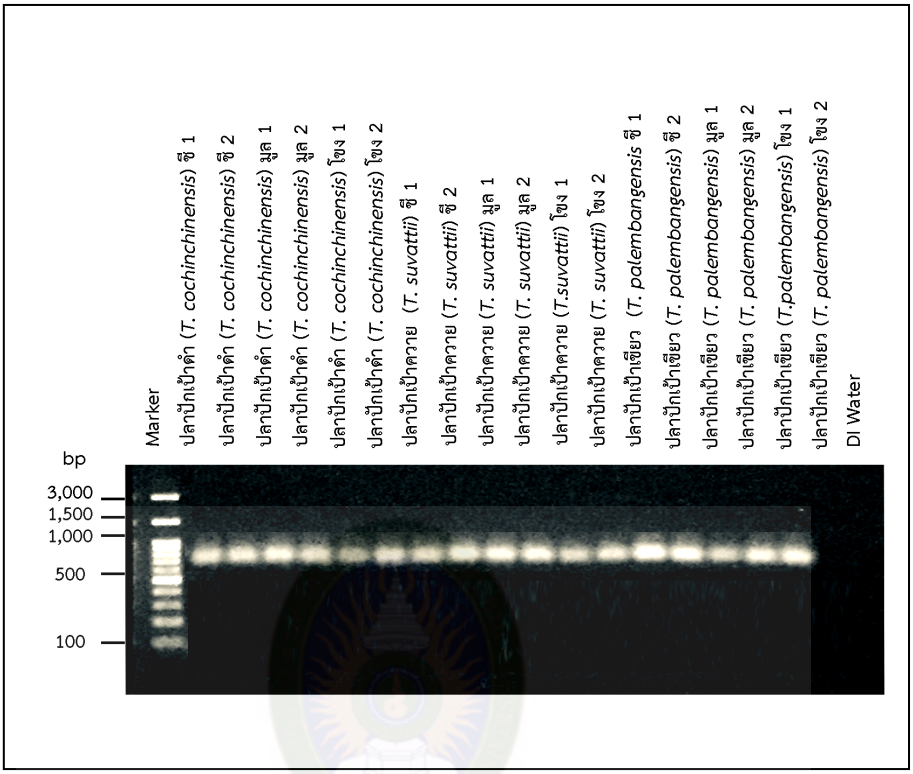
Grade 2 the high quality = มี DNA ratio < 1.8 หรือ > 2.0 (ตารางที่ 4.2)

**ตารางที่ 4.3** ค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตร และ 280 นาโนเมตร ของดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อปลาปักเป้า

| ลำดับ | ชนิด | A260 | A280 | 260/280 |
|---|---|---|---|---|
| 1. | ปลาปักเป้าดำ ชี (*Tetraodon cochinchinensis*) | 1.815 | 1.021 | **1.778** |
| 2. | ปลาปักเป้าดำ มูล (*Tetraodon cochinchinensis*) | 0.976 | 0.527 | **1.852** |
| 3. | ปลาปักเป้าดำ โขง (*Tetraodon cochinchinensis*) | 0.976 | 0.565 | **1.727** |
| 4. | ปลาปักเป้าควาย ชี (*T. suvattii*) | 1.244 | 0.825 | **1.508** |
| 5. | ปลาปักเป้าควาย มูล (*T. suvattii*) | 1.746 | 1.060 | **1.647** |
| 6. | ปลาปักเป้าควาย โขง (*T. suvattii*) | 1.656 | 1.045 | **1.585** |
| 7. | ปลาปักเป้าเขียว ชี *(T. palembangensis*) | 1.628 | 0.874 | **1.863** |
| 8. | ปลาปักเป้าเขียว มูล *(T. palembangensis*) | 1.530 | 0.877 | **1.745** |
| 9. | ปลาปักเป้าเขียว โขง *(T. palembangensis*) | 1.287 | 0.778 | **1.654** |
| 10. | ปลาปักเป้าเขียวจุด (*T. fluviatilis*) | 1.656 | 0.764 | **2.168** |
| 11. | ปลาปักเป้าท้องตาข่าย (*Dichotomyctere nigroviridis*) | 2.277 | 1.118 | **2.037** |

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

**4.3 การสร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ดของปลาปักเป้า**




**ภาพที่ 4.18** แถบเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ได้จากบริเวณยีน *COI* ของปลาปักเป้าทั้ง 3 ชนิด

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน *COI* ของปลาปักเป้าทั้ง 3 ชนิด ทั้ง 3 แหล่งน้ำ จำนวน ชนิด 18 ตัวอย่าง พบว่าผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มีขนาดประมาณ 600-800 คู่เบส

การใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดหรือลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Cytochrome c oxidase I (*COI*) ในการจำแนกชนิดปลา 5 ชนิด พบว่าขนาดดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้มีขนาด 600-800 คู่เบส ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ไม่ได้ส่งชิ้นส่วนดีเอ็นเอไปวิเคราะห์ลำดับพันธุกรรม ทำให้ไม่สามารถนำไปวิเคราะห์ความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของปลาปักเป้าได้

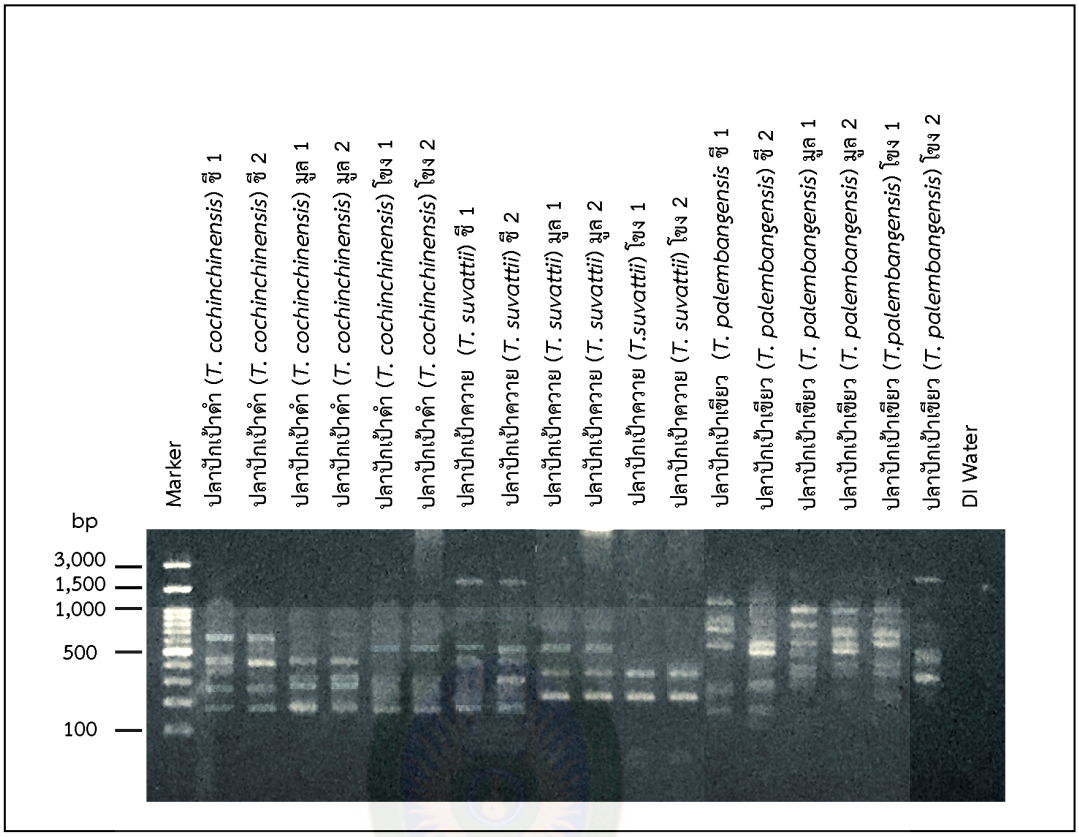
**4.4 การสร้างการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอเพื่อตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมของปลาปักเป้าที่พบในแม่น้ำสายหลักในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 3 สาย คือ แม่น้ำโขง แม่น้ำชี และแม่น้ำมูล**

จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของปลาปักเป้าทั้ง 3 ชนิด โดยใช้เทคนิค RAPD-PCR ด้วยไพรเมอร์จำนวน 10 ชนิด พบว่ามีจำนวน 3 ไพรเมอร์ ที่สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้จำนวน 27 แถบ โดยไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้มากที่สุดคือไพรเมอร์ S61 สามารถสร้างชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้ 13 แถบ ดังตารางที่ 4.3

**ตารางที่ 4.4** แสดงจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สามารถเพิ่มปริมาณได้ จากไพรเมอร์ RAPD ทั้ง 10 ชนิด

| ไพรเมอร์ | จำนวนแถบดีเอ็นเอ |
|---|---|
| S61 | **13** |
| S62 | **0** |
| S63 | **0** |
| S64 | **5** |
| S65 | **0** |
| S66 | **0** |
| S67 | **0** |
| S68 | **0** |
| S69 | **0** |
| S70 | **9** |

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

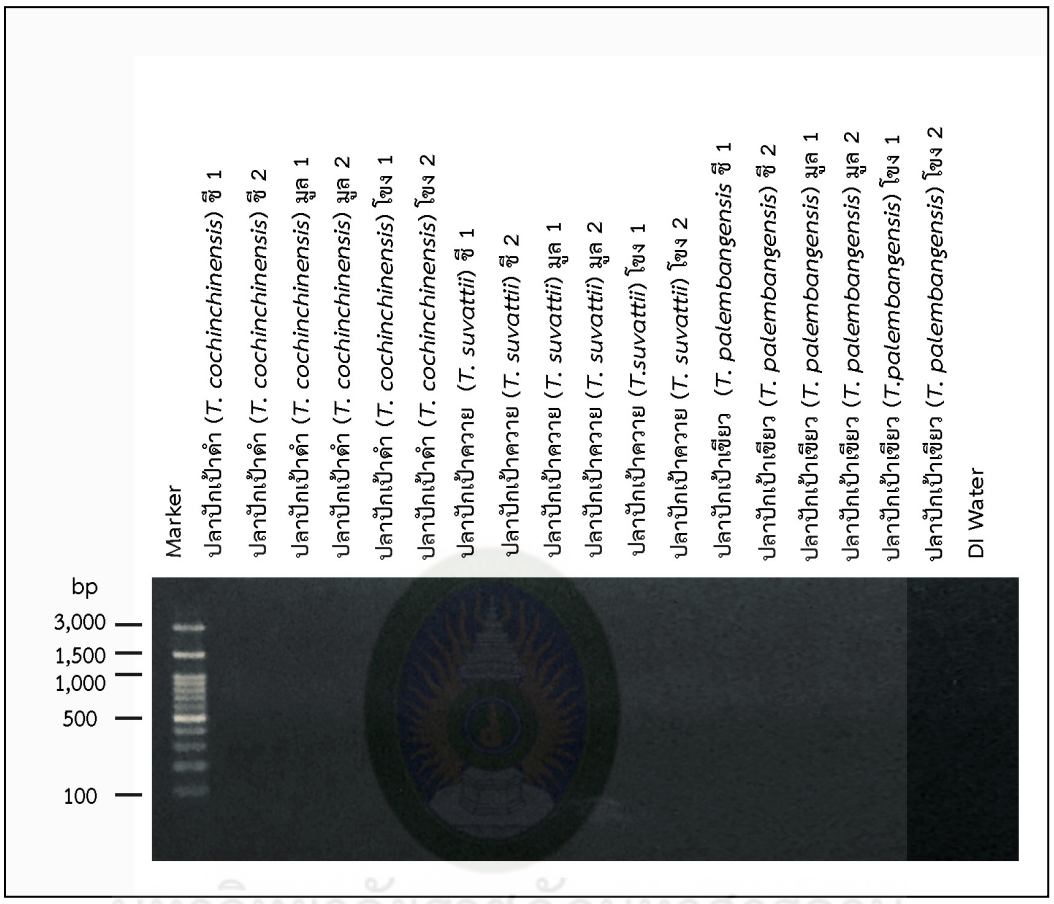



**ภาพที่ 4.19** รูปแบบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของกลุ่มปลาปักเป้าทั้ง 3 ชนิดที่เพิ่มปริมาณโดยใช้เทคนิค RAPD-PCR ด้วยไพรเมอร์ S61

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของกลุ่มปลาปักเป้าทั้ง 3 ชนิดด้วยไพรเมอร์ S61 พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้ทั้งหมด 13 แถบ มีขนาดเท่ากับ 200, 250, 400,500, 600, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1,400 และ 2,500 คู่เบส ดังภาพที่ 4.19

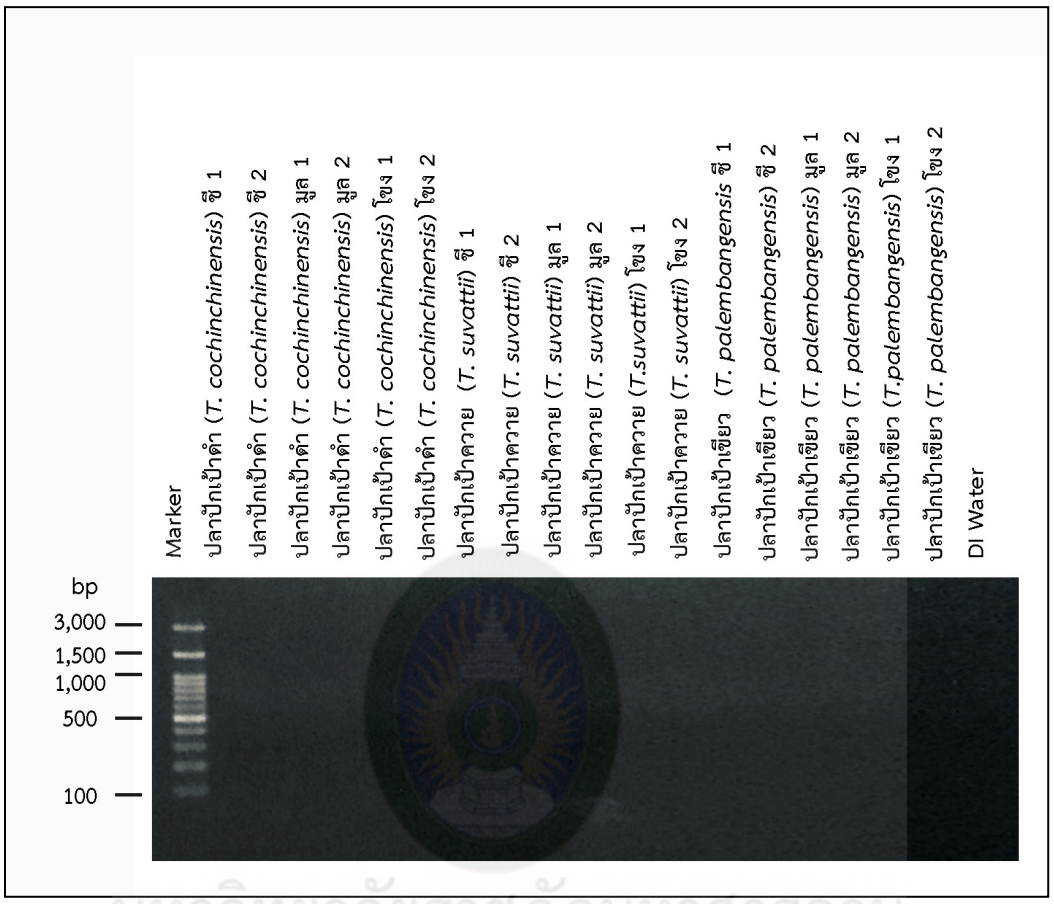
แถบดีเอ็นเอขนาด 200 คู่เบส เป็นแถบที่จำเพาะต่อปลาปักเป้าดำที่พบในแม่น้ำชี แม่น้ำมูล และแม่น้ำโขง เป็นต้น




มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

**ภาพที่ 4.20** รูปแบบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของกลุ่มปลาปักเป้าทั้ง 3 ชนิดที่เพิ่มปริมาณโดยใช้เทคนิค RAPD-PCR ด้วยไพรเมอร์ S62

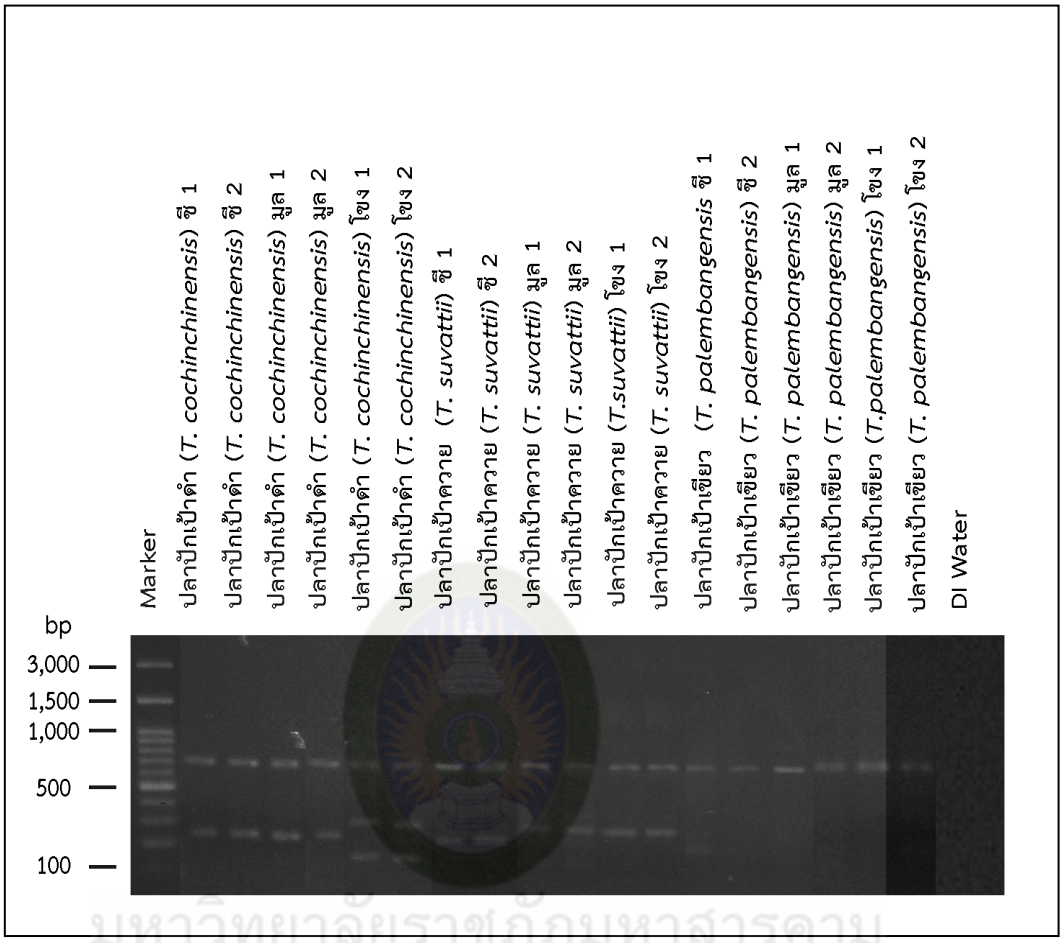
จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของกลุ่มปลาปักเป้าทั้ง 3 ชนิดด้วยไพรเมอร์ S62 พบว่าไม่สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้ ดังภาพที่ 4.20




มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

**ภาพที่ 4.21** รูปแบบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของกลุ่มปลาปักเป้าทั้ง 3 ชนิดที่เพิ่มปริมาณโดยใช้เทคนิค RAPD-PCR ด้วยไพรเมอร์ S63

จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของกลุ่มปลาปักเป้าทั้ง 3 ชนิดด้วยไพรเมอร์ S63 พบว่าไม่สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้ ดังภาพที่ 4.21

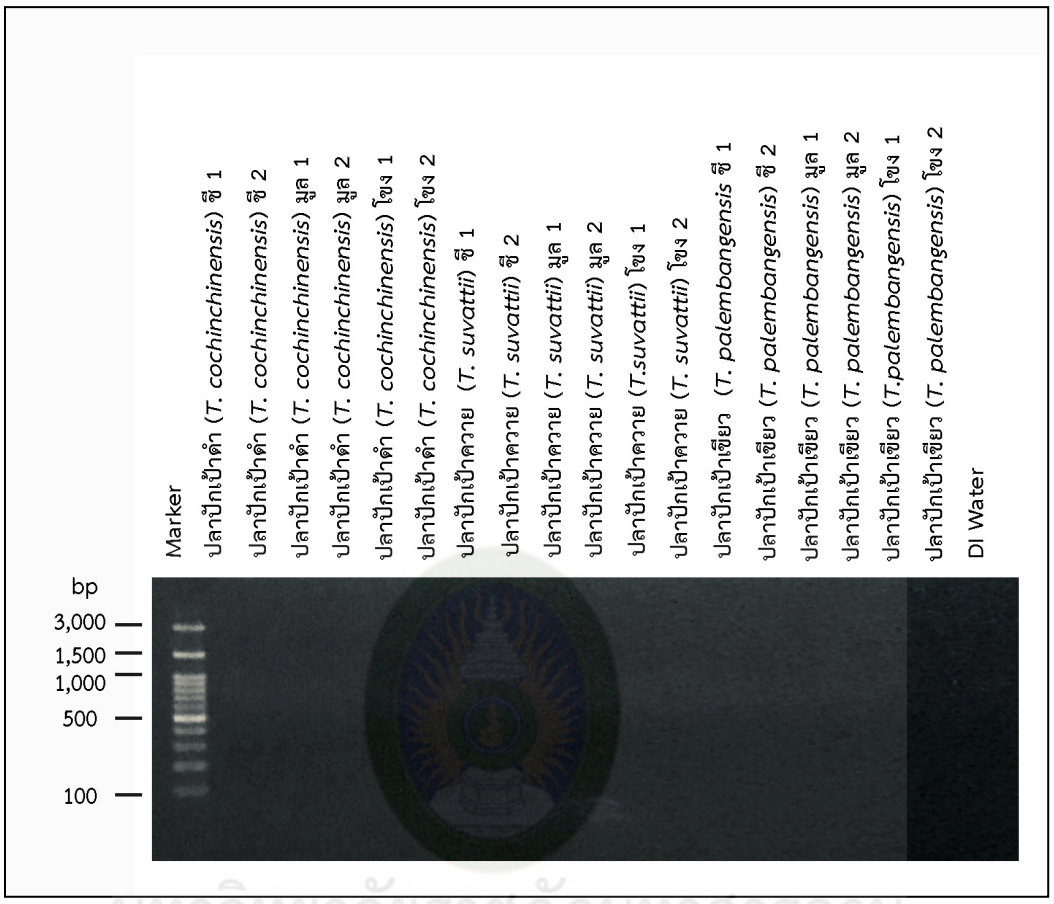



มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

**ภาพที่ 4.22** รูปแบบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของกลุ่มปลาปักเป้าทั้ง 3 ชนิดที่เพิ่มปริมาณโดยใช้เทคนิค RAPD-PCR ด้วยไพรเมอร์ S64

จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของกลุ่มปลาปักเป้าทั้ง 3 ชนิดด้วยไพรเมอร์ S64 พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้ทั้งหมด 5 แถบ มีขนาดเท่ากับ 100, 200, 250, 300 และ 700 คู่เบส ดังภาพที่ 4.22

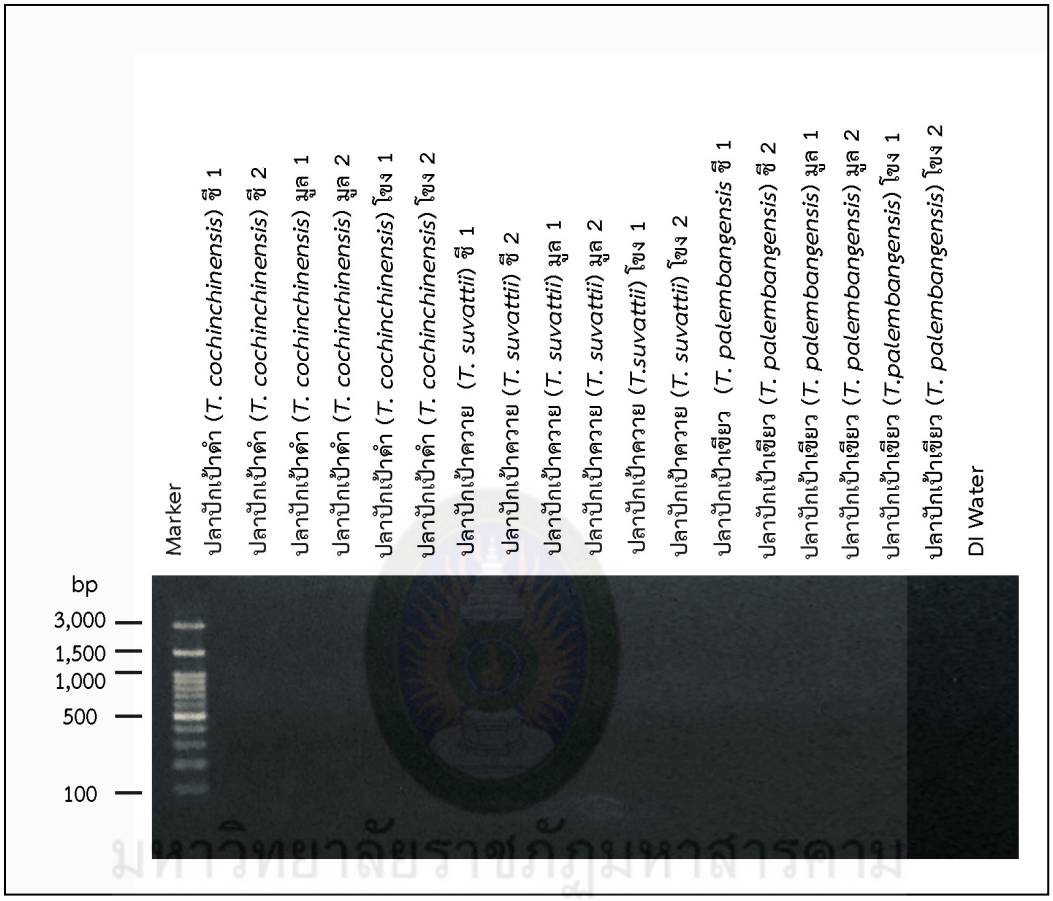
แถบดีเอ็นเอขนาด 700 คู่เบส เป็นแถบที่จำเพาะต่อปลาปักเป้าทุกชนิด แถบดีเอ็นเอขนาด 200 คู่เบส เป็นแถบที่จำเพาะต่อปลาปักเป้าดำที่พบในแม่น้ำชี และแม่น้ำมูล แถบดีเอ็นเอขนาด 100 คู่เบส เป็นแถบที่จำเพาะต่อปลาปักเป้าดำที่พบในแม่น้ำโขง




มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

**ภาพที่ 4.23** รูปแบบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของกลุ่มปลาปักเป้าทั้ง 3 ชนิดที่เพิ่มปริมาณโดยใช้เทคนิค RAPD-PCR ด้วยไพรเมอร์ S65

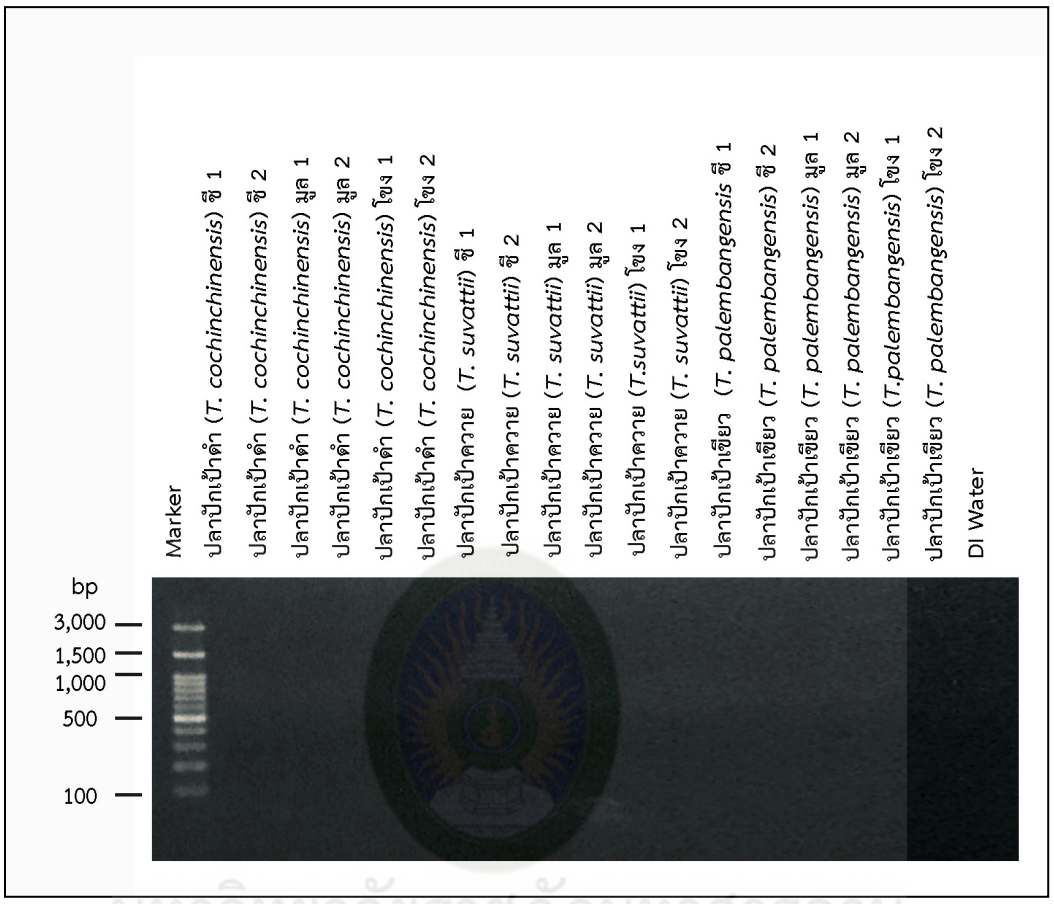
จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของกลุ่มปลาปักเป้าทั้ง 3 ชนิดด้วยไพรเมอร์ S65 พบว่าไม่สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้ ดังภาพที่ 4.23




มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

**ภาพที่ 4.24** รูปแบบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของกลุ่มปลาปักเป้าทั้ง 3 ชนิดที่เพิ่มปริมาณโดยใช้เทคนิค RAPD-PCR ด้วยไพรเมอร์ S66

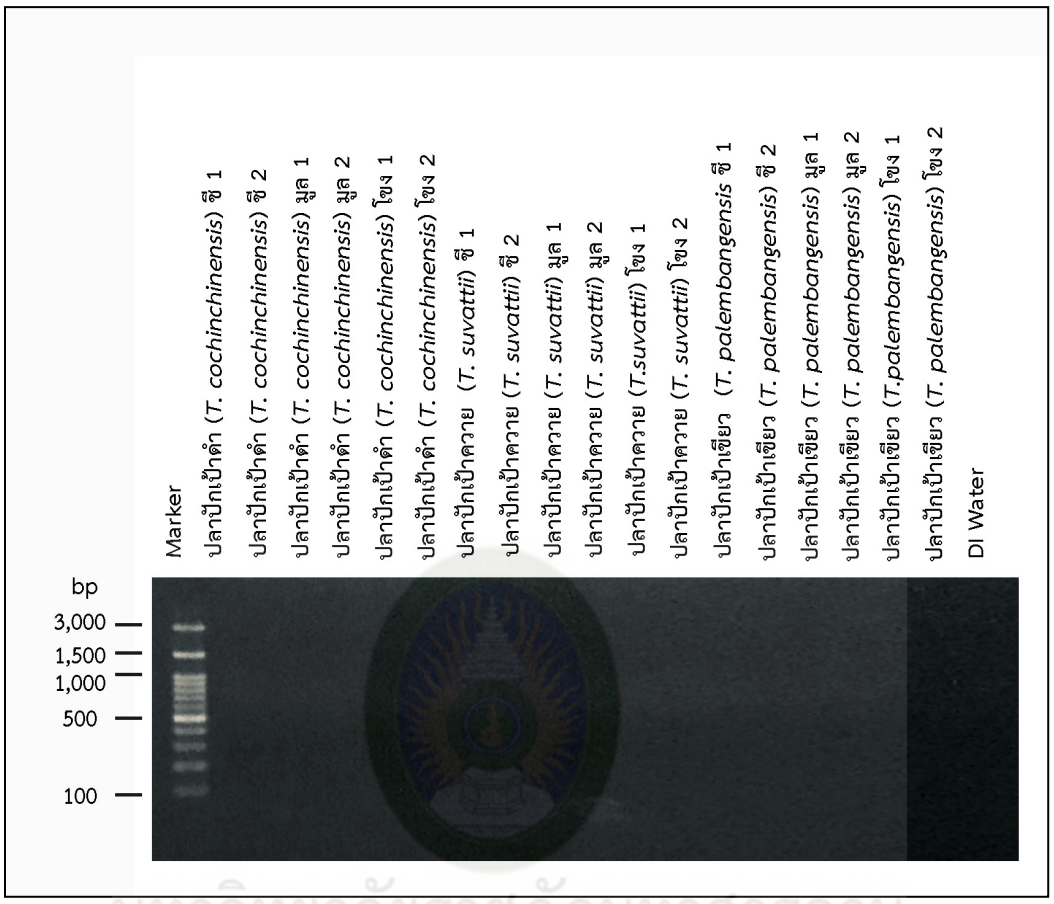
จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของกลุ่มปลาปักเป้าทั้ง 3 ชนิดด้วยไพรเมอร์ S66 พบว่าไม่สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้ ดังภาพที่ 4.24




มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

**ภาพที่ 4.25** รูปแบบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของกลุ่มปลาปักเป้าทั้ง 3 ชนิดที่เพิ่มปริมาณโดยใช้เทคนิค RAPD-PCR ด้วยไพรเมอร์ S67

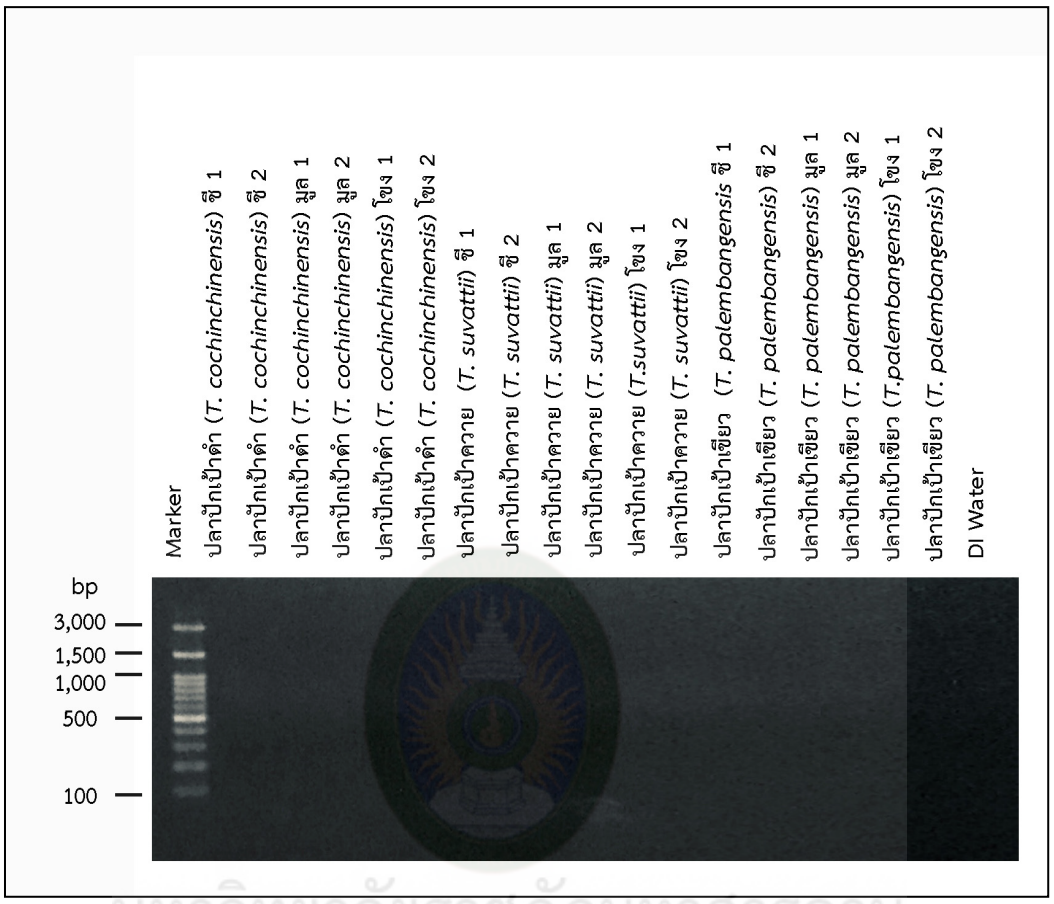
จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของกลุ่มปลาปักเป้าทั้ง 3 ชนิดด้วยไพรเมอร์ S67 พบว่าไม่สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้ ดังภาพที่ 4.25




มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

**ภาพที่ 4.26** รูปแบบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของกลุ่มปลาปักเป้าทั้ง 3 ชนิดที่เพิ่มปริมาณโดยใช้เทคนิค RAPD-PCR ด้วยไพรเมอร์ S68

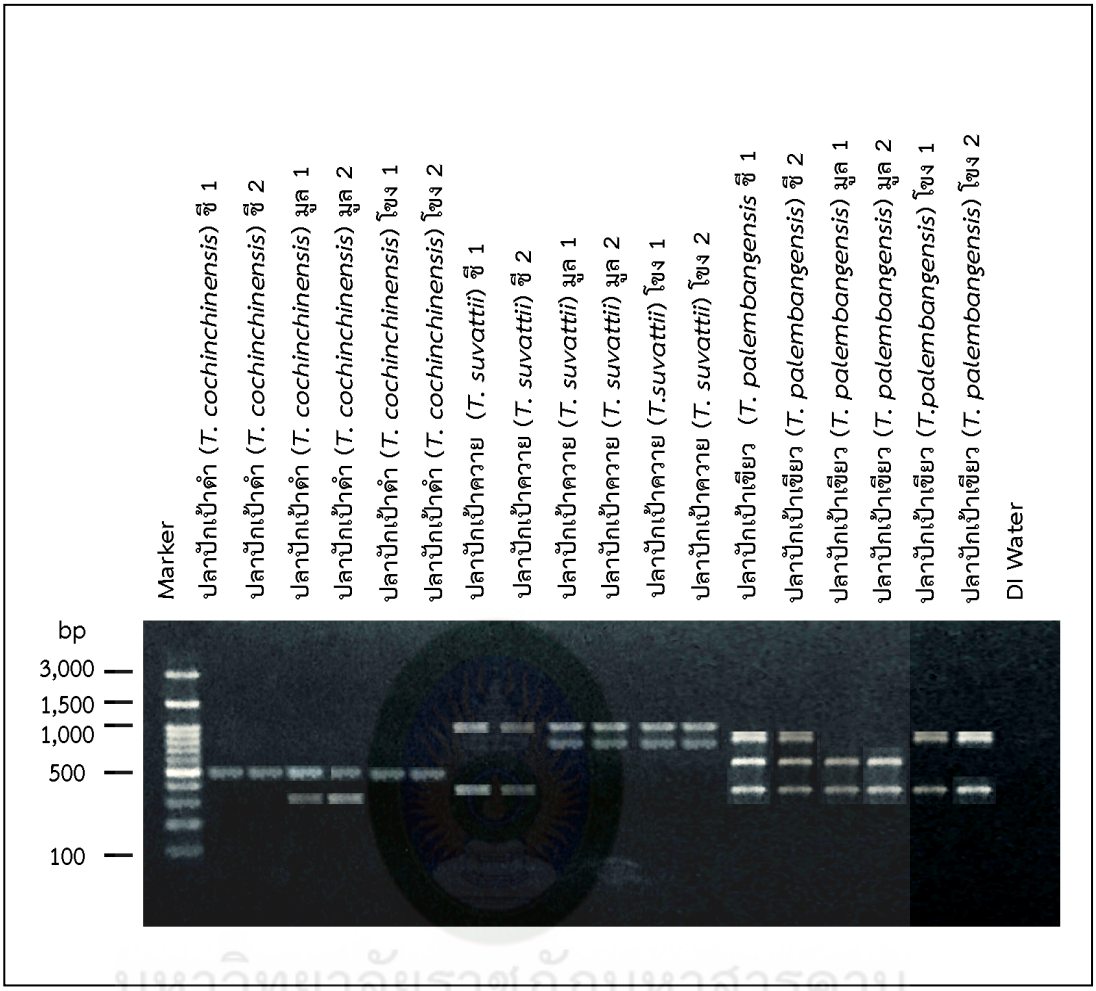
จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของกลุ่มปลาปักเป้าทั้ง 3 ชนิดด้วยไพรเมอร์ S68 พบว่าไม่สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้ ดังภาพที่ 4.26




มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

**ภาพที่ 4.27** รูปแบบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของกลุ่มปลาปักเป้าทั้ง 3 ชนิดที่เพิ่มปริมาณโดยใช้เทคนิค RAPD-PCR ด้วยไพรเมอร์ S69

จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของกลุ่มปลาปักเป้าทั้ง 3 ชนิดด้วยไพรเมอร์ S69 พบว่าไม่สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้ ดังภาพที่ 4.27




มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
MAHASARAKHAM RAJABHAT UNIVERSITY

**ภาพที่ 4.28** รูปแบบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของกลุ่มปลาปักเป้าทั้ง 3 ชนิดที่เพิ่มปริมาณโดยใช้เทคนิค RAPD-PCR ด้วยไพรเมอร์ S70

จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของกลุ่มปลาปักเป้าทั้ง 3 ชนิดด้วยไพรเมอร์ S70 พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้ทั้งหมด 9 แถบ มีขนาดเท่ากับ 300, 350, 400, 500, 600, 700, 800, 900 และ 1,000 คู่เบส ดังภาพที่ 4.28

แถบดีเอ็นเอขนาด 500 คู่เบส เป็นแถบที่จำเพาะต่อปลาปักเป้าดำทุกแหล่งน้ำ แถบดีเอ็นเอขนาด 1,000 คู่เบส เป็นแถบที่จำเพาะต่อปลาปักเป้าควายที่พบในแม่น้ำชี แม่น้ำมูล และแม่น้ำโขง แถบดีเอ็นเอขนาด 400 คู่เบส เป็นแถบที่จำเพาะต่อปลาปักเป้าเขียวที่พบในแม่น้ำชี แม่น้ำมูล และแม่น้ำโขง

# บทที่ 5
# สรุป และวิจารณ์ผลการวิจัย

## 5.1 สรุปผลการวิจัย

ปักเป้าในพื้นที่ธรรมชาติในแม่น้ำสายหลักในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ แม่น้ำชี แม่น้ำมูล และแม่น้ำโขง พบปลาปักเป้า 3 ชนิดคือ ปลาปักเป้าดำ (*Tetraodon cochinchinensis*) ปลาปักเป้าควาย (*T. suvattii*) และปลาปักเป้าเขียว (*T. fluviatilis*)

**ตารางที่ 5.1** ตัวอย่างปลาปักเป้าที่พบในแหล่งน้ำภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย

| ลำดับ | ชนิด | สกุล | แม่น้ำชี | แม่น้ำมูล | แม่น้ำโขง |
|---|---|---|---|---|---|
| 1. | ปลาปักเป้าดำ (*Tetraodon cochinchinensis*) | *Tetraodon* | ✓ | ✓ | ✓ |
| 2. | ปลาปักเป้าควาย (*T. suvattii*) | *Tetraodon* | ✓ | ✓ | ✓ |
| 3. | ปลาปักเป้าเขียว (*T. palembangensis*) | *Tetraodon* | ✓ | ✓ | ✓ |
| 4. | ปลาปักเป้าเขียวจุด (*T. fluviatilis*) | *Tetraodon* | ป่าพรุโต๊ะแดง | | |
| 5. | ปลาปักเป้าท้องตาข่าย (*Dichotomyctere nigroviridis*) | *Dichotomycter* | ป่าพรุโต๊ะแดง | | |

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

เมื่อทำการศึกษาจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ของปลาปักเป้าดำ ปลาปักเป้าควาย ปลาปักเป้าท้องตาข่าย ปลาปักเป้าเขียว และปลาปักเป้าเขียวจุด เท่ากับ 40, 40, 36, 40 และ 42 แท่ง ตามลำดับ และจำนวนโครโมโซมพื้นฐาน เท่ากับ 74, 78, 72, 76 และ 80 ตามลำดับ ทั้งเพศผู้และเพศเมีย ตรวจไม่พบความแตกต่างของลักษณะโครโมโซมเพศ

สูตรแคริโอไทป์ของปลาทั้ง 5 ชนิด ประกอบด้วยโครโมโซมชนิดเมทาเซนทริก-ซับเมทาเซนทริก-อะโครเซนทริก และเทโลเซนทริก เท่ากับ 12-10-12-6, 16-22-0-2, 20-16-0-0, 16-12-8-4 และ 18-8-12-4 แท่ง ตามลำดับ

จากการย้อมสีโครโมโซมแบบธรรมดา พบว่า ปลาปักเป้าดำ มีโครโมโซมคู่ใหญ่สุดเป็นชนิดเมทาเซนทริก และโครโมโซมขนาดเล็กเป็นชนิดเทโลเซนทริก จากการย้อมแถบสีแบบนอร์พบตำแหน่งนอร์ 2 ตำแหน่ง อยู่บนโครโมโซมเมทาเซนทริกคู่ที่ 4 มีตำแหน่งอยู่ใกล้เซนโทรเมียร์ของโครโมโซมคู่ที่ 4 ปลาปักเป้าควาย มีโครโมโซมคู่ใหญ่สุดเป็นชนิดเมทา เซนทริก และโครโมโซมขนาดเล็กเป็นชนิดเทโลเซนทริก พบตำแหน่งนอร์ 2 ตำแหน่ง อยู่บนโครโมโซมเมทาเซนทริกคู่ที่ 5 มีตำแหน่งอยู่ใกล้ เซนโทรเมียร์ของโครโมโซมคู่ที่ 5 ปลาปักเป้าท้องตาข่าย มีโครโมโซมคู่ใหญ่สุดเป็นชนิดเมทาเซนทริก และโครโมโซมขนาดเล็กเป็นชนิดซับเมทาเซนทริก พบตำแหน่งนอร์ 2 ตำแหน่ง อยู่บนโครโมโซมเมทาเซนทริกคู่ที่ 6 มีตำแหน่งอยู่ใกล้เซนโทรเมียร์ของโครโมโซมคู่ที่ 5 ปลาปักเป้าเขียว มีโครโมโซมคู่ใหญ่สุดเป็นชนิดเมทา เซนทริก และโครโมโซมขนาดเล็กเป็นชนิดเทโลเซนทริก พบตำแหน่งนอร์เพียง 1 ตำแหน่ง อยู่บนโครโมโซม แสดงให้เห็นถึงการมีภาวะพหุสัณฐาน มีตำแหน่งนอร์อยู่ใกล้เซนโทรเมียร์ และ ปลาปักเป้า เขียวจุด มีโครโมโซมคู่ใหญ่สุดเป็นชนิดเมทาเซนทริก และโครโมโซมขนาดเล็กเป็นชนิดเทโลเซนทริก พบตำแหน่งนอร์ 2 ตำแหน่ง อยู่บนโครโมโซมเมทาเซนทริกคู่ที่ 12 มีตำแหน่งใกล้เทโลเมียร์ ของโครโมโซม คู่ที่ 12

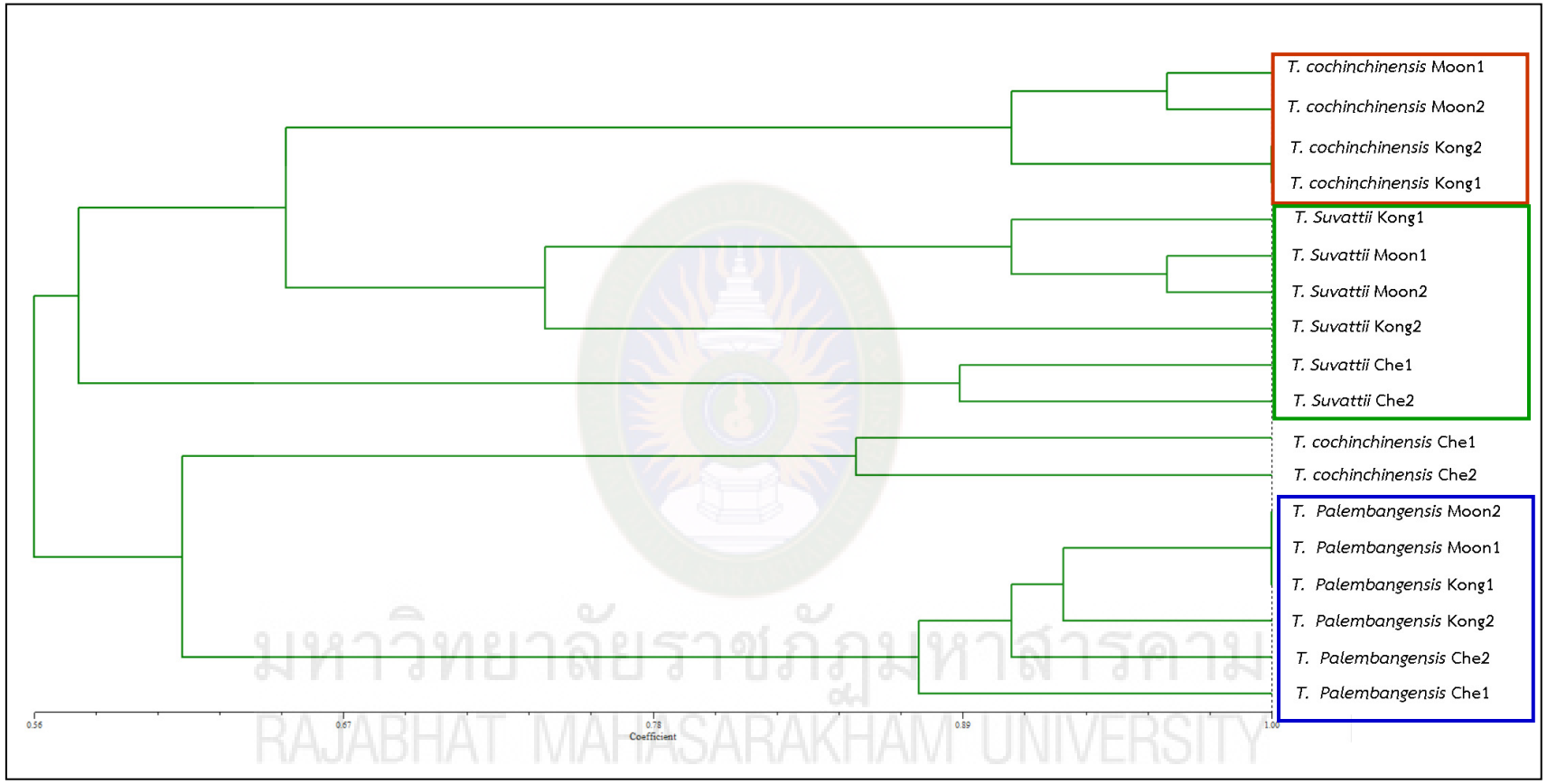
เมื่อทำการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค RAPD-PCR ด้วยไพรเมอร์จำนวน 10 ชนิด พบว่ามีจำนวน 3 ไพรเมอร์ คือ S61, S64 และ S70 ที่สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้ จำนวน 27 แถบ โดยไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้มากที่สุดคือไพรเมอร์ S61 สามารถสร้างชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้ 13 แถบ

ไพรเมอร์ S61 พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้ทั้งหมด 13 แถบ มีขนาดเท่ากับ 200, 250, 400,500, 600, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1,400 และ 2,500 คู่เบส

ไพรเมอร์ S64 พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้ทั้งหมด 5 แถบ มีขนาดเท่ากับ 100, 200, 250, 300 และ 700 คู่เบส แถบดีเอ็นเอขนาด 700 คู่เบส เป็นแถบที่จำเพาะต่อปลาปักเป้าทุกชนิด แถบดีเอ็นเอขนาด 200 คู่เบส เป็นแถบที่จำเพาะต่อปลาปักเป้าดำที่พบในแม่น้ำชีและแม่น้ำมูล แถบดีเอ็นเอขนาด 100 คู่เบส เป็นแถบที่จำเพาะต่อปลาปักเป้าดำที่พบในแม่น้ำโขง

ไพรเมอร์ S70 พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้ทั้งหมด 9 แถบ มีขนาดเท่ากับ 300, 350, 400, 500, 600, 700, 800, 900 และ 1,000 คู่เบส แถบดีเอ็นเอขนาด 500 คู่เบส เป็นแถบที่จำเพาะต่อปลาปักเป้าดำทุกแหล่งน้ำ แถบดีเอ็นเอขนาด 1,000 คู่เบส เป็นแถบที่จำเพาะต่อปลาปักเป้าควายที่พบในแม่น้ำชี แม่น้ำมูล และแม่น้ำโขง แถบดีเอ็นเอขนาด 400 คู่เบส เป็นแถบที่จำเพาะต่อปลาปักเป้าเขียวที่พบในแม่น้ำชี แม่น้ำมูล และแม่น้ำโขง

สถาบันวิทยบริการ มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY




มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

**ภาพที่ 5.1** UPGMA dendrogram from RAPD analysis of Puffer fish from three river basin in northeast of Thailand. Divide three-group population in Puffer fish.

**ตารางที่** 5.2 ระยะห่างระหว่างพันธุกรรมของปลาปักเป้าทั้ง 3 ชนิด ที่นำมาสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยวิธี RAPD-PCR

| Species | T. cochinchinens Che1 | *T. cochinchinens* Che2 | *T. cochinchinens* Moon1 | *T. cochinchinens* Moon2 | *T. cochinchinens* Kong1 | *T. cochinchinens* Kong2 | *T. suvattii* Che1 | *T. suvattii* Che2 | *T. suvattii* Moon1 | *T.suvattii* Moon2 | *T. suvattii* Kong1 | *T suvattii* Kong2 | *T. Palembangensi* Che1 | *T. Palembangensi* Che2 | *T. Palembangensi* Moon1 | *T. Palembangensi* Moon2 | *T. Palembangensi* Kong1 | *T. Palembangensi* Kong2 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *T. cochinchinens* Che1 | 1.00 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| *T. cochinchinens* Che2 | 0.96 | 1.00 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| *T. cochinchinens* Moon1 | 0.93 | 0.89 | 1.00 | | | | | | | | | | | | | | | |
| *T. cochinchinens* Moon2 | 0.93 | 0.89 | 1.00 | 1.00 | | | | | | | | | | | | | | |
| *T. cochinchinens* Kong1 | 0.52 | 0.56 | 0.52 | 0.52 | 1.00 | | | | | | | | | | | | | |
| *T. cochinchinens* Kong2 | 0.59 | 0.56 | 0.59 | 0.59 | 0.85 | 1.00 | | | | | | | | | | | | |
| *T. Suvattii* Che1 | 0.59 | 0.56 | 0.59 | 0.59 | 0.56 | 0.63 | 1.00 | | | | | | | | | | | |
| *T. Suvattii* Che2 | 0.56 | 0.52 | 0.56 | 0.56 | 0.52 | 0.67 | 0.89 | 1.00 | | | | | | | | | | |
| *T. Suvattii* Moon1 | 0.63 | 0.59 | 0.63 | 0.63 | 0.59 | 0.67 | 0.52 | 0.63 | 1.00 | | | | | | | | | |

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

| Species | *T.* cochinchinens Che1 | *T. cochinchinens* Che2 | *T. cochinchinens* Moon1 | *T. cochinchinens* Moon2 | *T. cochinchinens* Kong1 | *T. cochinchinens* Kong2 | *T. suvattii* Che1 | *T. suvattii* Che2 | *T. suvattii* Moon1 | *T.suvattii* Moon2 | *T. suvattii* Kong1 | *T suvattii* Kong2 | *T. Palembangensi* Che1 | *T. Palembangensi* Che2 | *T. Palembangensi* Moon1 | *T. Palembangensi* Moon2 | *T. Palembangensi* Kong1 | *T. Palembangensi* Kong2 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *T. Suvattii* Moon2 | 0.56 | 0.52 | 0.56 | 0.56 | 0.52 | 0.59 | 0.44 | 0.48 | 0.78 | 1.00 | | | | | | | | |
| *T. Suvattii* Kong1 | 0.70 | 0.67 | 0.70 | 0.70 | 0.59 | 0.67 | 0.59 | 0.70 | 0.93 | 0.70 | 1.00 | | | | | | | |
| *T. Suvattii* Kong2 | 0.74 | 0.70 | 0.74 | 0.74 | 0.63 | 0.70 | 0.63 | 0.67 | 0.89 | 0.74 | 0.96 | 1.00 | | | | | | |
| *T. Palembangensi* Che1 | 0.56 | 0.59 | 0.56 | 0.56 | 0.59 | 0.59 | 0.52 | 0.48 | 0.56 | 0.56 | 0.48 | 0.52 | 1.00 | | | | | |
| *T. Palembangensi* Che2 | 0.56 | 0.59 | 0.56 | 0.56 | 0.59 | 0.59 | 0.52 | 0.48 | 0.56 | 0.56 | 0.48 | 0.52 | 1.00 | 1.00 | | | | |
| *T. Palembangensi* Moon1 | 0.63 | 0.67 | 0.63 | 0.63 | 0.59 | 0.59 | 0.52 | 0.48 | 0.56 | 0.56 | 0.56 | 0.59 | 0.93 | 0.93 | 1.00 | | | |
| *T. Palembangensi* Moon2 | 0.56 | 0.59 | 0.56 | 0.56 | 0.59 | 0.59 | 0.59 | 0.56 | 0.56 | 0.56 | 0.48 | 0.52 | 0.93 | 0.93 | 0.85 | 1.00 | | |
| *T. Palembangensi* Kong1 | 0.56 | 0.59 | 0.56 | 0.56 | 0.59 | 0.59 | 0.52 | 0.48 | 0.56 | 0.56 | 0.48 | 0.52 | 1.00 | 1.00 | 0.93 | 0.93 | 1.00 | |
| *T. Palembangensi* Kong2 | 0.59 | 0.63 | 0.59 | 0.59 | 0.70 | 0.70 | 0.48 | 0.44 | 0.52 | 0.52 | 0.52 | 0.56 | 0.89 | 0.89 | 0.89 | 0.81 | 0.89 | 1.00 |

มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

## 5.2 อภิปรายผลการวิจัย

เป็นรายงานครั้งแรกของการศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ของปลาปักเป้า 4 ชนิด ได้แก่ ปลาปักเป้าดำ ปลาปักเป้าควาย ปลาปักเป้าท้องตาข่าย และปลาปักเป้าเขียว

**1. จำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ และจำนวนโครโมโซมพื้นฐาน**

จำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ของปลาปักเป้าดำ ปลาปักเป้าควาย และปลาปักเป้าเขียว เท่ากับ 40 แท่ง เมื่อทำการเปรียบเทียบในรายงานการศึกษาของวงศ์ปลาปักเป้าที่มีมาก่อนหน้านี้ พบว่าสอดคล้องกับรายงานศึกษาของ Arai and Nagaiwa (1976) ศึกษาในปลาปักเป้า *Dichotomyctere fluviatilis* จากประชากรในประเทศอินเดีย ปลาปักเป้าท้องตาข่ายมีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 36 แท่ง สอดคล้องกับรายงานการศึกษาในปลาปักเป้า *Canthigaster coronate* (Martine *et al*., 2010) สำหรับปลาปักเป้าเขียวจุดมีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 42 แท่ง สอดคล้องกับรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Hardie and Hebert (2003) และเมื่อทำการเปรียบเทียบกับปลาที่อยู่ในวงศ์ปลาปักเป้า พบว่าสอดคล้องกับรายงานการศึกษาในปลาปักเป้า *Arothron hispidus* (Gregory, 2008); *A. immaculatus* (Choudhury *et al*., 1982); *A. manilensis* (Hirata and Urushido, 2000); *D. fluviatilis* (Hinegardner and Rosen, 1972; Ojima and Yamamoto, 1900); *Pao palemangensis* (Hinegardner and Rosen, 1972) และ *T. cutcutia* (Vinogradov, 1998)

ปลาปักเป้าดำ ปลาปักเป้าควาย ปลาปักเป้าท้องตาข่าย ปลาปักเป้าเขียว และปลาปักเป้าเขียวจุด มีจำนวนโครโมโซมพื้นฐาน เท่ากับ 74, 78, 72, 76 และ 80 ตามลำดับ สอดคล้องกับรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้ในวงศ์ปลาปักเป้าที่พบว่ามีจำนวนโครโมโซมพื้นฐานที่มีความหลากหลายมาก โดยมีจำนวนน้อยที่สุดเท่ากับ 36 ในปลาปักเป้า *Canthigaster coronate* (Arai, 983) และมากที่สุดเท่ากับ 72 ในปลาปักเป้า *Arothron manilensis* (Hirata and Urushido, 2000)

จากสมมุติฐานที่ส่งผลทำให้ปลามีแคริโอไทป์ที่หลากหลาย เมื่อมีการพิจารณาลงไปในระดับชนิดของปลาแต่ละวงศ์ พบว่าจะมีความผันแปรของจำนวนโครโมโซมที่แตกต่างกัน จากการศึกษาพบว่ากลไกการจัดเรียงตัวใหม่ของโครโมโซม ที่ทำให้เกิดความผันแปรของโครโมโซมของปลาจะเกี่ยวข้องกับกระบวนการที่สำคัญ 3 กระบวนการ ได้แก่ 1) การหักและต่อสลับใหม่แบบมีเซนโทรเมียร์ร่วมด้วย หรือ pericentric inversion 2) การเชื่อมรวมกัน (fusion) ของโครโมโซม และ 3) การหัก (fission) ของชิ้นส่วนของโครโมโซม วงศ์ปลาที่มีวิวัฒนาการเปลี่ยนแปลงทางโครโมโซมนั้นอาจจะเกี่ยวข้องกับกระบวนการใดกระบวนการหนึ่ง หรือทุกกระบวนการก็เป็นไปได้ (King, 1993 และ Galetti *et al*. 2000)

**2. ชนิดของโครโมโซม**

ปลาปักเป้าดำ ปลาปักเป้าควาย ปลาปักเป้าท้องตาข่าย ปลาปักเป้าเขียว และปลาปักเป้าเขียวประกอบด้วยโครโมโซมชนิดเมทาเซนทริก ซับเมทาเซนทริก อะโครเซนทริก และเทโลเซนทริก เท่ากับ 12-10-12-6, 16-22-0-2, 20-16-0-0, 16-12-8-4 และ 18-8-12-4 แท่ง ตามลำดับ สอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ที่พบว่าปลาปักเป้าในสกุล *Dichotomyctere* (Hardie and Hebert, 2003) และ *Tetraodon* (Vinogradov, 1998) โครโมโซมประกอบด้วยชนิดเมทาเซนทริก ซับเมทาเซนทริก อะโครเซนทริก และเทโลเซนทริก

**3. โครโมโซมเครื่องหมาย**

ปลาปักเป้าดำ ปลาปักเป้าควาย ปลาปักเป้าท้องตาข่าย และปลาปักเป้าเขียวจุดมีตำแหน่งนอร์ 2 ตำแหน่ง ที่สอดคล้องกับรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้ในปลาปักเป้า *Sphoeroides greeleyi* (Brum et al., 1995) และ *S. testudineus* (Sá-Gabriel and Molona, 2005) ที่พบว่ามีตำแหน่งนอร์ 2 ตำแหน่งเช่นเดียวกันเทคนิคการย้อมแถบสีแบบนอร์มีจุดประสงค์เพื่อหาตำแหน่งของ nucleolar organizer regions (NORs) ซึ่งเป็นตำแหน่งรอยคอดที่สองของโครโมโซม (secondary constriction) โครโมโซมเครื่องหมายที่มีรอยคอยที่สองนี้จะถูกเรียกว่าแซทเทิลไรด์โครโมโซม (satellite chromosome) ยีนที่อยู่บริเวณนี้ คือ rDNA มีหน้าที่ควบคุมการสร้างไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ (ribosomal RNA) ชนิด 18S และ 28S จากรายงานการศึกษาที่มีมาก่อนหน้านี้ พบว่าในปลาส่วนใหญ่จะมีตำแหน่งของยีนสร้างไรโบโซมอลอาร์เอ็นเออยู่บนโครโมโซม 1 คู่ (2 ตำแหน่ง) (Sharma *et al*., 2002)

จากรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้จะเห็นได้ว่าแม้ว่าปลาจะอยู่วงศ์เดียวกัน แต่จำนวนโครโมโซมที่มีนอร์มีจำนวนไม่เท่ากัน หรือแม้กระทั่งปลาชนิดเดียวกัน ตำแหน่งที่เกิดนอร์ก็อาจแตกต่างกันไป นั่นคือในบางกรณีอาจมีขนาดของนอร์บนโครโมโซมคู่เหมือนที่แตกต่างกัน เรียกว่าการเกิดภาวะพหุสัณฐาน (polymorphism) ซึ่งบริเวณของนอร์นั้นจะประกอบไปด้วยอาร์ดีเอ็นเอ (rDNA) อาร์เอ็นเอ (RNA) และโปรตีนเป็นจำนวนมาก ยีนบริเวณนี้เป็นยีนที่ซ้ำกันหลายร้อยชุด (repetitive DNA) ภาวะพหุสัณฐานของนอร์อาจเกิดจากการเพิ่มปริมาณการทำงานของยีน (gene amplification) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการสังเคราะห์โปรตีน เพราะอาร์อาร์เอ็นเอเมื่อรวมกับไรโบโซมอลโปรตีน (ribosomal protein) จะกลายเป็นไรโบโซม (ribosome) มีหน้าที่สังเคราะห์โปรตีน ยิ่งนอร์ยืดยาวหรือมีขนาดใหญ่มากเท่าใด จำนวนยีนที่สังเคราะห์อาร์อาร์เอ็นเอก็จะมากตามไปด้วย (อมรา คัมภิรานนท์, 2546) ซึ่งปรากฏการณ์ดังกล่าวสามารถพบได้ในโครโมโซมปลาหลายชนิด (Yuksel and Gaffaroglu, 2008) เช่น ปลาวงศ์ปลาช่อน *Channa punctata* (Sahoo *et al*., 1997) และในการศึกษาครั้งนี้ที่พบว่าในปลาปักเป้าเขียวมีตำแหน่งนอร์เพียง 1 ตำแหน่งทั้งในปลาเพศผู้และเพศเมีย

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
MAHASARAKHAM RAJABHAT UNIVERSITY

สำหรับในปลาปักเป้าดำ ปลาปักเป้าควาย ปลาปักเป้าท้องตาข่าย และปลาปักเป้าเขียวจุด มีตำแหน่งนอร์ 2 ตำแหน่งที่เท่ากันทั้งในปลาเพศผู้และเพศเมีย

**4. เครื่องหมายทางพันธุกรรมชนิดลายพิมพ์ดีเอ็นเอ**

เครื่องหมายทางพันธุกรรมชนิดลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ใช้ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของปลาเนื้ออ่อนทั้ง 3 ชนิดในครั้งนี้ เมื่อนำไปสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยวิธี UPGMA พบความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลามีค่าค่อนข้างสูง การวิเคราะห์โครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างตัวอย่างปลาปักเป้าในแต่ละประชากร เมื่อแบ่งประชากรทั้งหมดออกเป็น 3 พื้นที่ (แม่น้ำชี แม่น้ำมูนและแม่น้ำโขง) แสดงความแตกต่างทางพันธุกรรมอย่างมีนัยสำคัญระหว่างพื้นที่ ดังภาพที่ 5.2 ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมแสดงการแบ่งกลุ่มประชากรปลาอ่อนออกเป็น 3 กลุ่มคือ ปลาปักเป้าดำ ปลาปักเป้าควาย และปลาปักเป่าเขียว ซึ่งหากพิจารณาจากเดนโดรแกรมที่สร้างด้วยวิธี UPGMA จะพบว่าปลาปักเป้าดำ และปลาปักเป้าควายมีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมมากกว่าปลาปักเป้าเขียว และเมื่อพิจารณาปลาแต่ละชนิดตามแหล่งภูมิศาสตร์ พบว่าปลาปักเป้าที่พบในแม่น้ำมูน และแม่น้ำโขงจะมีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมมากกว่าปลาปักเป้าที่พบในแม่น้ำชี ซึ่งการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าการใช้เครื่องหมายทางพันธุกรรมที่ใช้สร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอนั้นสามารถใช้แยกประชากรของสิ่งมีชีวิตที่มาจากสภาพภูมิศาสตร์ที่แตกต่างกันได้ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ ธีระรักษ์ ศรีนวลกราย และ ศานิต ปิยพัฒนากร (2552) ที่ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรของปลาทูโดยการใช้ เครื่องหมาย Inter-simple sequence repeat (ISSR) จาก 8 สถานี ได้แก่ สงขลา สุราษฎร์ธานี ประจวบคีรีขันธ์ สมุทรสงคราม ระยอง จันทบุรี สตูล และกระบี่ พบว่าแถบดีเอ็นเอให้โพลิมอร์ฟิซึม 80.77 เปอร์เซ็นต์ พบ ความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาทูมีค่าค่อนข้างสูง การวิเคราะห์โครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างตัวอย่างปลาทูในแต่ละประชากร ($P$<0.001) เมื่อแบ่งประชากรทั้งหมดออกเป็น 2 พื้นที่ (อ่าวไทยและทะเลอันดามัน) แสดงความแตกต่างทางพันธุกรรมอย่างมีนัยสำคัญระหว่างพื้นที่ ($P$=0.0342) แผนภูมิ ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมแสดงการแบ่งกลุ่มประชากรปลาทูออกเป็น 3 กลุ่มคือ อ่าวไทยตอนบน อ่าวไทยตอนล่าง และ ทะเลอันดามัน และพบความสัมพันธ์ระหว่างความห่างทางพันธุกรรมกับระยะห่างทางภูมิศาสตร์ของแต่ละประชากร ($P$<0.0003)

## 5.3 ข้อเสนอแนะในงานวิจัยครั้งต่อไป

1. การศึกษาความหลากชนิดของพืช หรือสัตว์ เพื่อความถูกต้องของข้อมูลควรทำการสำรวจซ้ำทุกๆ ปี หรืออาจจะเว้นช่วงในการสำรวจ 2-5 ปี เพื่อดูความต่อเนื่องของข้อมูล และดูการเปลี่ยนแปลงทางนิเวศวิทยาได้ด้วย

2. การใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายแบบบาร์โค้ดสามารถใช้ในการจัดจำแนกชนิดของปลาหมูได้ และสามารถใช้ศึกษาวิวัฒนาการ และความใกล้ชิดของสายพันธุ์ปลาได้ แต่หากต้องการความถูกต้องและแม่นยำมากขึ้นควรมีการใช้ยีนหลายๆ บริเวณ เช่น *COI*, *Cytochrome b* หรือ *ND4* ซึ่งเป็นบริเวณยีนที่มีความแปรผันที่นิยมนำมาใช้ในการหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของสัตว์

3. การใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอยังสามารถใช้แยกกลุ่มประชากรของสิ่งมีชีวิตได้ และยังคงให้ความแม่นยำในการศึกษา ซึ่งจะเป็นประโยชน์อย่างมากถ้านำไปใช้ในการติดตามการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างวิวัฒนาการของประชากรสัตว์น้ำในระบบแหล่งน้ำธรรมชาติ

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

# บรรณานุกรม


กันยารัตน์ ไชยสุต. 2532. **เซลล์พันธุศาสตร์และเซลล์อนุกรมวิธานของพืชสกุล *Zephyranthes*.** ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

ชาคริต ดวงใจ. 2534. **การศึกษา Synchronization โดยใช้ Methotrexate Block และ Ethidium Bromind Block ในเทคนิค High Resolution ของโครโมโซมมนุษย์.** โครงงานวิจัย. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

ปรีชา ประเทพา. 2543. **เทคโนโลยีชีวภาพ : การปรับแต่งพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตด้วยเทคโนโลยีพันธุวิศวกรรม.** มหาสารคาม: ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม.

ประศาสตร์ เกื้อมณี. **2551**. **เทคนิคเนื้อเยื่อพืช**. พิมพ์ครั้งที่ 1. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ธวัช ดอนสกุล และวิเชียร มากตุ่น. 2546. **รายงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 41 (สาขาประมง).** หน้า 289-297. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ธีระรักษ์ ศรีนวลกราย และ ศานิต ปิยพัฒนากร. 2552. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรปลาทู Rastrelliger brachysoma ในอ่าวไทยและทะเลอันดามันโดยการวิเคราะห์ด้วย ISSR. **การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 47**: สาขาวิทยาศาสตร์. กรุงเทพฯ: 254-260.

วิวรรธน์ แสงภักดี. 2556. คาริโอไทป์และอิดิโอแกรมของปลาปักเป้ากล่องเขาวัว (*Lactoria cornuta* Linnaeus, 1785) ด้วยการย้อมสีแบบธรรมดาและแถบสีแบบนอร์. **วารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมง** 7(1): 70-78.

วีรยุทธ์ เลาหะจินดา และวุฒิ ทักษิณธรรม. 2549. **หลักอนุกรมวิธานสัตว์.** สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

วีระยุทธ สุภิวงค์. 2553. **พันธุศาสตร์เซลล์ของปลาวงศ์ปลาช่อน (Family Channidae) 4 ชนิด ใน ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ.** วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

อมรา คัมภิรานนท์. 2546. **พันธุศาสตร์ของเซลล์.** พิมพ์ครั้งที่ 2. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อลงกลด แทนออมทอง. 2554. **พันธุศาสตร์เซลล์เบื้องต้น.** โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.

Alves, l. A., Porto-Foesti, F., Oliveira, C. and Foresti, F. 2008. Supernumerary chromosomes in the pufferfish *Sphoeroides spengleri* - First occurrence in marine Teleostean Tetraodontiformes fish. **Genetics and Molecular Biology** 31: 243-245.

Arai, R. and Nagaiwa, K. 1976. Chromosome of tetraodontiform fishes from Japan. **Bulletin of the National Science Museum Tokyo** 2: 59-72.

Arai, R. 1983. Karyological and osteological approach to phylogenetic systematics of tetraodontiform fishes. **Bulletin of the National Science Museum Tokyo** 9: 175-210.

Brum, I. J. M. 2000. Cytogenetic studies in tetraodontiforms *Sphoeroides tyleri* (Tetraodontidae) and *Chilomycteras spinasus* (Diodontidae) from Rio de Janeiro Coast, Brazil. **Chromosome Science** 4: 103-105.

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

Choudhury, R. C., Prasad, R. and Das, C. C. 1982. Karyological studies in five tetraodontiform fishes from the Indian Ocean. **Copeia** 1982: 728-732.

Frezal, L. and Leblois, R. 2008. Four years of DNA barcoding: Current advances and prospects. Infection. **Genetics and Evolution** 8: 727-736.

Gomonteir, B., Tanomtong,A., Supiwong, W., Sikhruadong, S., Neeratanaphan, L. and Sanoamuang, L. 2012. Standardized Karyotype and Idiogram of Two-Spot Glass Catfish, Ompok bimaculatus (Siluriformes, Siluridae) in Thailand by Conventional and Ag-NOR Staining Techniques. **Cytologia 77(4)**: 459–464.

Galetti, P. M., Aguilar, C. T. and Molina, W. F. 2000. An overview of marine fish cytogenetics. **Hydrobiologia** 420: 55-62.

Ganai, F. A., Yousuf, A. R., Dar, S. A., Tripathi, N. K. and Wani, S. U. 2011. Cytotexonomic status of schizothoracine fishes *Kashmir himalaya* (Teleostei: cyprinidae). **Caryologia** 4(64):435-445.

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

Gregory, T. R. 2008. **Animal genome size database**. http://www.genomesize.com. March 3, 2018.

Gustavo, L. S. and Molina, F. W. 2005. Karyotype diversification in fishes of the Balistidae, Diodontidae and Tetraodontidae (Tetraodontiformes). **Caryologia** 58(3): 229-237.

Hadrys, H., Balick, M. and B. Schierwater. 1992. Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. **Mol. Ecol.** 1: 55-63.

Hardie, D. C. and Hebert, P. D. N. 2003. The nucleotypic effects of cellular DNA content in cartilaginous and ray-finned fishes. **Genome** 46: 683-706.

Herbert, P.D.N., Ratnasingham, S. And deWaard, J.R. 2003. Barcoding animal life: cytochrome coxidase subunit 1 divergences among closely related species. **Proceedings of the Royal Society B 270**: S96-S99.

Hinegardner, R. and Rosen, D. E. 1972. Cellular DNA content and the evolution of teleostean fishes. **The American Naturalist** 106: 621-644.

Hirata, J. and Urushido, T. 2000. Karyotypes and DNA contents in Osteoglossiformes fishes. **Science Report of the Reseach Institute of Evolutionary Biology** 9: 83-90.

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(8): 1014-1015.

Kaewsri, S. 2014. **Cytogenetics of Some Species of the Families Scaridae and Labridae**. Ph.D. Thesis. Graduate School, Khon Kaen University.

King, M. 1993. **Species evolution: The role of Chromosomes Change**. Cambridge: Cambridge University Press.

Lakra, W. S. and Rishi, K. K. 1991. Chromosomes of Indian fishes: an annotated list. **The Indian Journal of Animal Sciences** 61: 342-349.

Mabuchi, K., Arai, R. and Nishida, M. 2002. Karyotypes and nuclear DNA contents of two *Pseudolabrus* species from the southern coast of Japan. **Japanese Journal of Zoology** 49:87-95.

มหาวิทยาลัยมหาสารคาม
MAHASARAKHAM UNIVERSITY

Maloyjo. J, Bhattacharjee, B. A., Laskar, B. D. and Sankar K. G. 2012. Identification and Re-Evaluation of Freshwater Catfishes through DNA Barcoding. **Open Access Freely Available Online 7(11)**: 1-7.

Malakar, A. K., Lakra, W. S., Goswami, M. and Mishra, R.M. 2013. Genetic differentiation of Ompok bimaculatus (Teleostei: Siluridae) population based on mtDNA cytochrome b gene. **Mitochondrial DNA 24 (2):** 145-150.

Mani, I., Kumar, R., Singh, M., Kushwaha, B., Nagpure, N.S., Srivastava, P.K. and Lakra, W.S. 2013. Chromosomal distribution of constitutive heterochromatin in eight species of mahseers (Family: Cyprinidae) from India. **Indian Journal Biotechnology** (12):178-186.

Martinez, A. P., Araujo, C. W. and Molina, F. W. 2010. Derived cytogenetic traits, multiple NORs and B chromosomes in the compact karyotype of *Canthigaster figueiredoi* (Tetraodontiformes). **Marine Genomics** 3: 85-89.

Miyaki, K., Tabeta, O. and Kayano, H. 1995. Karyotypes in six species of pufferfishes genus *Takifugu* (Tetraodontidae, Tetraodontiformes). **Fisheries Science** 61: 594-598.

Nanda, I., Schartl, M., Feichtinger, W., Schlupp, I., Parzefall, J. and Schmid, M. 1995. Chromosomal evidence for laboratory synthesis of a triploid hybrid between the gynogenetic teleost Poecilia Formosa and its host species. **Journal of Fish Biology** 47(4):619-623.

Nelson, J. S. 1994. **Fishes of the World**. 3rd ed. John Wiley & Sons., New York.

Nelson, J.S. 2006. **Fishes of the world**. 4th ed. John Wiley and Sons., New York.

Ojima, Y. and Yamamoto, K. 1990. Cellular DNA contents of fishes determined by flow cytometry. **La Kromosomo II** 57: 1871-1888.

Olivara, C. C. and Galetti, M. P. 1995. cytogenetic studies of Two puffer species (*Sphoeroides*, Tetraodontidae) from Rio de Janeiro Coast, Brazil. **Cytologia** 60:369-374.

Painter, T. S. 1923. Studies in mammalian spermatogenesis II. **Journal of Experimental Zoology** 37(3): 291-336.

มหาวิทยาลัยมหาสารคาม
MAHASARAKHAM UNIVERSITY

Rainboth, W. J. 1996. **Fishes of the Cambodian Mekong.** FAO Species Identification Field Guide for Fishery Purposes. Mekong River Commission. FAO and DANIDA.

Rooney, D. E. 2001. **Human Cytogenetics: Constutitional Analysis: a Practical Approach**. Oxford University Press, London.

Rooney, D. E. and Czepulkowski, B. H. 1986. **Human Cytogenetics.** IRL Press, Oxford.

Sá-Gabriel, L. G. and Molina, W. F. 2005. Karyotype diversification in fishes of the Balistidae, Diodontidae and Tetraodontidae (Tetraodontiformes). **Caryologia** 58: 229-237.

Sahoo, P. K., Baral, A. and Ponniah, A. G. 1997. Replication banding in *Channa punctata* (Channidae, Pisces). **Chromosome Science** 1: 123-125.

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

Shipp, R. L. 2003. **Tetraodontidae, Puffers**. University of South Alabama, USA.

Tamrongnawasawad, T., Saisaeng, A., Temboonkiet, B. and Sumanatemeya, N. 2004. **Marine Fish of Thailand**. 2nd ed. Banpra-Artith Press, Bangkok.

Smith, H. M. 1945. **The Freshwater Fishes of Siam or Thailand.** United States Government. office, Washington.

Turpin, R. and Lejeune, J. 1965**. Les Chromosomes Humains**. Gauthier-Villars, Paris.

Veeruraj, A., Arumugam, M., Ajithkumar, T. and Balasubramanian, T. 2011. Distribution of tetraodontiformes (Family: Tetraodontidae) along the Parangipettai Coast, Southeast coast of India. **Zootaxa** 3015: 1-12.

Vidthayanon, C., Karnasuta, J. and Nabhitabhata, J. 1997. **Diversity of freshwater fishes in Thailand**. Integrated promotion technology Company, Bangkok.

Vidthayanon, C. 2008. **Marine Fish Guide**. Sarakhadee Press, Bangkok.

Vinogradov, A. E. 1998. Genome size and GC-percent in vertebrates as determined by flow cytometry: the triangular relationship**. Cytometry** 31: 100-109.

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

Wang, J. X. and Zhao, X. F. 1993. Chromosome study of three species of tetraodontiform fishes. **Zoological Research** 14: 345-346.

Wike, W. S. 1989. **Therapy in Rheumatic Disease.** Maccel Dekker, New York.

Ward, R. D., Zemlak, T. S., Innes, B. H., Last, P. R. and Hebert, P. D. N.. 2005. DNA barcoding Australia' s fish species. **Philosophical Transactions of The Royal Society**. 360: 1847-1857.

Wong, L. L., Peatman, E., Lu, J., Kucuktas, H., He, S., Zhou, C., Na-nakorn, U. and Liu, Z. 2011. DNA Barcoding of Catfish: Species Authentication and Phylogenetic Assessment. **Open Access Freely Available Online** 6(3):1-7.

Yuksel, E. and Gaffaroglu, M. 2008. The analysis of nucleolar organizer regions in *Chalcalburnus mossulensis* (Pisces: Cyprinidae). **Journal of Fisheries Science** 2(3): 587-591.

Yunis, J. J. 1976. High resolution of human chromosome. **Science** 191: 1268-1270.

Zhao, X. F., Wang, J. X., Yang, Q. and Zhang, J. L. 1994. Karyotype analysis of five species of marine fishes. **Zoological Research** 15: 103-106.

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY



**รายงานการวิจัย**

**เรื่อง**

# การใช้เครื่องหมายทางพันธุกรรมในการตรวจสอบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม และจัดจำแนกปลาปักเป้าน้ำจืด ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย

# Genetics Marker for genetic relationship and identification of freshwater pufferfish in Northeast of Thailand

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

**พันธิวา แก้วมาตย์**
**อลงกลด แทนออมทอง**
**กรรณิการ์ ทองดอนเปรียง**

**มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม**
**2561**
**ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม**
***(งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากงบประมาณแผ่นดิน ด้านการวิจัย ปีงบประมาณ พ.ศ. 2560)***

# ภาคผนวก ก.
# การเตรียมสารเคมี

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

## รายการวัสดุอุปกรณ์ สารเคมี และการเตรียมสารต่างๆ

### 1. วัสดุอุปกรณ์และสารเคมีในการศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์

#### 1.1 วัสดุอุปกรณ์

- บีกเกอร์ขนาดต่าง ๆ
- Hot plate และ magnetic stirrer
- ขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 10 และ 15 มล.
- กระบอกฉีดยา (syring) และเข็มฉีดยาขนาดต่าง ๆ
- Automicropipette, micropipette tips และ pipette ขนาดต่าง ๆ
- โถสำหรับย้อมสี (staining jar)
- เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)
- เครื่องกรองสาร และ Millipore membrane filter ขนาด 0.2 ไมโครลิตร
- เครื่องชั่งแบบละเอียด (balance)
- โถดูดความชื้น
- ตู้เย็น
- เครื่อง suction
- อ่างน้ำอุ่น (water bath)
- หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave)
- เครื่อง vortex mixture
- ตู้เพาะเลี้ยง (incubator)
- ตู้ปลอดเชื้อ (laminar air flow carbinet)
- กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงพร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ

#### 1.2 สารเคมี

- โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)
- โคลชิซิน (colchicine)
- กรดอะเซติกเข้มข้น (glacial acetic acid)
- เมทานอล (methanal)
- เอทานอล 95 และ 70 เปอร์เซ็นต์ (ethanol 95% และ 70%)
- สีย้อมจิมซ่า (Giemsa’s stain)
- โซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($NaHPO_4$)

มหาวิทยาลัยมหาสารคาม
MAHASARAKHAM UNIVERSITY

- โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ($KH_2PO_4$)
- กรดไฮโดรคลอริก (HCl)
- โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)

**2. การเตรียมอาหารและสารเคมี**

**การเตรียม hypotonic solution**

การเตรียมสาร Hypotonic solution 0.075 M HCl

น้ำยาที่ใช้เตรียม

1. KCl crystal
2. น้ำกลั่น

**วิธีเตรียม**

ชั่งผลึก KCl 0.5588 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มล. เขย่าจนผลึกละลายหมด เก็บใส่ขวดไว้ที่อุณหภูมิห้อง

หมายเหตุ : น้ำยานี้มีอายุการใช้งาน 1-2 สัปดาห์ ก่อนใช้ต้องนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

**การเตรียม colchicine**

- สูตรที่ 1 ชั่ง Colchicine 0.002 กรัม ละลายน้ำกลั่น 10 มล. ได้ความเข้มข้น 0.2 มก./มล.
- สูตรที่ 2 ชั่ง Colchicine 0.001 กรัม ละลายน้ำกลั่น 10 มล. ได้ความเข้มข้น 0.1 มก./มล.

Colchicine powder เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส

**การเตรียม fixaive**

สารที่ใช้เตรียม

1. Glacial acetic acid
2. Absolute methanol

**วิธีเตรียม**

ใช้ glacial acetic acid 1 ส่วน ผสมกับ absolute methanol 3 ส่วน เก็บใสขวดแช่ในตู้เย็น ควรทำการเตรียมใหม่ทุกครั้งที่จะใช้

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
MAHASARAKHAM UNIVERSITY

**การเตรียม Sorensen buffer**

สารที่ใช้เตรียมการเตรียม

1. Stock solution A : ใช้ $KH_2PO_4$ 9.1 กรัม ละลายน้ำกลั่น 1,000 มล.

2. Stock solution B : ใช้ $NaHPO_4$ 9.5 กรัม ละลายน้ำกลั่น 1,000 มล.

**วิธีเตรียม**

ใช้ stock solution A ปริมาณ 50.8 มล. ผสมกับ stock solution B ปริมาณ 49.2 มล. จะได้ Sorensen buffer (pH 6.8) 100 มล.

**การเตรียมสีย้อม Giemsa's**

การเตรียมสีจิมซ่า 10% (10% Giemsa's solution)

สีจิมซ่า 10% เตรียมจาก Giemsa's stain ใช้ชนิด stock Giemsa's solution โดยดูดสีจิมซ่าจาก stock Giemsa's solution มา 5 มล. ละลายใน Sorensen buffer 45 มล.

**สารละลาย 1 N NaOH**

น้ำยาที่ใช้เตรียม

1. NaOH crytal
2. น้ำกลั่น

**วิธีเตรียม (ปริมาตรที่เตรียม 500 มล.)**

**2. วัสดุอุปกรณ์และสารเคมีสำหรับการศึกษาพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุล**

**1.1 วัสดุอุปกรณ์**

(1) Auto-Pipette ขนาด 0.5-10 µl

(2) Auto-Pipette ขนาด 2-20 µl

(3) Auto-Pipette ขนาด 10-100 µl

(4) Auto-Pipette ขนาด 100-1,000 µl

(5) dNTP set

(6) Micro Pipette Tip 0.1-10 µl

(7) Micro Pipette Tip 10-200 µl

(8) Micro Pipette Tip 200-1,000 µl

(9) Micro Tube ขนาด 200 µ

(10) Micro Tube ขนาด 1.5 ml

(11) เครื่องถ่ายภาพภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลต

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

(12) เครื่องกลั่นน้ำ

(13) เครื่อง gel electrophoresis

(14) เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง

(15) เครื่องทำ PCR (PCR machine:CR cobett Research)

(16) เครื่องปั่นเหวี่ยง

(17) ตู้ควบคุมความเย็นเก็บตัวอย่าง -20° C

(18) ตู้เย็น

(19) ตู้อบฆ่าเชื้อ

(20) หม้อนึ่งความดันไอ

(21) ถุงมือยาง เบอร์ M

(22) หลอดเก็บตัวอย่างขนาด 20 ml

(23) อลูมิเนียมฟอยด์ ขนาด 24/18 นิ้ว

(24) อ่างน้ำอุ่น (water bath)

**1.2 สารเคมี**

(1) Bromophenol blue ($C_{19}H_{10}Br_4O_5S$)

(2) ß-mercaptoethanol ($HSCH_2CH_2OH$)

(3) Chlrofrom ($CHCl_3$)

(4) Enzyme Taq DNA polymerase

(5) Ethanol ($CH_3CH_2OH$)

(6) Ethidium bromide (EtBr: $C_{21}H_{20}BrN_3$)

(7) Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA: $C_{10}H_{16}N_2O_8$)

(8) GenePure Agarose

(9) Isopropanol ($C_3H_8O$)

(10) Phenol ($C_6H_5OH$)

(11) Primers

(12) Protienase K

(13) RNase A

(14) Silica gel

(15) Sodium chloride (NaCl)

(16) Sucrose ($C_{12}H_{22}O_{11}$)

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

(17) TAE buffer

(18) TE buffer

(19) Tris base ($C_4H_{11}NO_3$)

**การเตรียมสารต่างๆเพื่อใช้ในงานวิจัย**

**1. การเตรียมเจล อะกาโรส ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 40 มิลลิลิตร**

**ส่วนผสม**

| | | |
|---|---|---|
| 1. agarose | 0.6 | กรัม |
| 2. 1X TAE buffer | 30 | มิลลิลิตร |

**วิธีเตรียม** ชั่งสาร agarose ให้ได้ปริมาณ 0.6 กรัม ใส่ในขวดทดลอง เติม1X TAE buffer ปริมาตร 40 มิลลิลิตร ปิดปากขวดด้วยแผ่นพาราฟิล์ม นำไปอุ่นในเตาอบไมโครเวฟ หรือในอ่างน้ำอุ่น เมื่อเดือดให้เอาขวดทดลองออกมา แกว่งเพื่อให้ agarose ละลายได้ดียิ่งขึ้น อุ่นจนกว่าพบว่าได้สารละลายที่ใสไม่มีผง agarose เหลือในสารละลาย ทิ้งให้อุณหภูมิลดลงจนรู้สึกว่าสารละลายอุ่น ระหว่างนี้ให้แกว่งขวดทดลองเป็นระยะ เทสารละลายลงในถาดเตรียมเจล ที่จัดวางหวีเพื่อให้เกิดหลุมสำหรับหยอดดีเอ็นเอไว้แล้ว ทิ้งไว้ประมาณ 30-45 นาทีเพื่อให้เจลแข็งตัวก่อนนำไปใช้ให้ยกหวีออกอย่างระมัดระวัง

**2. การเตรียมเจล อะกาโรส ความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 30 มิลลิลิตร**

**ส่วนผสม**

| | | |
|---|---|---|
| 1. agarose | 0.32 | กรัม |
| 2. 1X TAE buffer | 40 | มิลลิลิตร |

**วิธีเตรียม** มีขั้นตอนการเตรียมเช่นเดียวกับการเตรียมเจล อะกาโรส ความเข้มข้น 1.2 เปอร์เซนต์

**3. 1X TAE buffer ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร**

**ส่วนผสม**

| | | |
|---|---|---|
| 1. Tris-base | 10.8 | กรัม |
| 2. glacial acetic acid | 5.5 | กรัม |
| 3. 5 M EDTA | 4 | มิลลิลิตร |
| 4. น้ำกลั่น | 996 | มิลลิลิตร |

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

**วิธีเตรียม** ละลาย Tris-base, glacial acetic acid และ 5 M EDTA ในน้ำกลั่นจากนั้นปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปอบฆ่าเชื้อในเครื่องอบฆ่าเชื้อควบคุมความดัน ทิ้งให้เย็น แล้วเก็บสารละลายไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

**4. TE buffer ปริมาตร มิลลิลิตร**

**ส่วนผสม**

| | | |
|---|---|---|
| 1. Tris-base | 0.303 | กรัม |
| 2. EDTA | 0.093 | กรัม |

**วิธีเตรียม** ละลาย Tris-base และ EDTA ในน้ำกลั่น ปรับ pH ให้ได้ pH8.4 และปรับปริมาตรเป็น 250 มิลลิลิตร นำไปอบฆ่าเชื้อในเครื่องอบฆ่าเชื้อควบคุมความดัน ทิ้งให้เย็น แล้วเก็บสารละลายไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

**5. Loading buffer**

**ส่วนผสม**

| | | |
|---|---|---|
| 1. sucrose | 40 | กรัม |
| 2. bromophenol blue | 0.25 | กรัม |
| 3. น้ำกลั่น | 100 | มิลลิลิตร |

**วิธีเตรียม** ละลาย sucrose และ bromophenol blue ในน้ำกลั่นจากนั้นเก็บสารละลายไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

# สารบัญ


| หัวเรื่อง | | หน้า |
|---|---|---|
| **กิตติกรรมประกาศ** | ..... | ก |
| **บทคัดย่อ** | ..... | ข |
| ABSTRACT | ..... | ง |
| **สารบัญ** | ..... | ฉ |
| **สารบัญตาราง** | ..... | ซ |
| **สารบัญภาพ** | ..... | ฎ |
| **บทที่ 1** | **บทนำ** ..... | 1 |
| | 1.1 ความสำคัญและความเป็นมาของปัญหา ..... | 1 |
| | 1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย ..... | 3 |
| | 1.3 ขอบเขตการวิจัย ..... | 3 |
| | 1.4 ทฤษฎี สมมุติฐาน (ถ้ามี) และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย ..... | 3 |
| | 1.5 ประโยชน์ที่ได้รับ ..... | 5 |
| **บทที่ 2** | **ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง** ..... | 6 |
| | 2.1 แม่น้ำที่สำคัญในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ..... | 6 |
| | 2.2 ระบบการจำแนกปลาในปัจจุบัน ..... | 8 |
| | 2.3 การจำแนกกลุ่มปลาปักเป้าในประเทศไทย..... | 31 |
| | 2.4 การศึกษาโครโมโซม | 33 |
| | 2.5 การศึกษาระดับโมเลกุล | 38 |
| | 2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง ..... | 42 |
| **บทที่ 3** | **วิธีดำเนินการวิจัย** ..... | 49 |
| | 3.1 ข้อมูลและแหล่งที่มาของข้อมูล ..... | 49 |
| | 3.2 ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง ..... | 49 |
| | 3.3 เครื่องมือในการวิจัย ..... | 49 |
| | 3.4 ขั้นตอนในการดำเนินงานวิจัย ..... | 49 |


มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

# สารบัญ (ต่อ)


| หัวเรื่อง | | หน้า |
|---|---|---|
| **บทที่ 4** | **ผลการศึกษา** ..... | 58 |
| | 4.1 ความหลากชนิดของปลาปักเป้า และการศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์.. | 58 |
| | 4.2 ผลการสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อปลาปักเป้า..... | 79 |
| | 4.3 การสร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ดของปลาปักเป้า ..... | 80 |
| | 4.4 การสร้างการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอเพื่อตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมของปลาปักเป้าที่พบในแม่น้ำสายหลักในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 3 สาย คือ แม่น้ำโขง แม่น้ำชี และ แม่น้ำมูล ..... | 81 |
| **บทที่ 5** | **สรุป และวิจารณ์ผลการวิจัย** ..... | 92 |
| | 5.1 สรุปผลการวิจัย ..... | 92 |
| | 5.2 อภิปรายผลการวิจัย ..... | 97 |
| | 5.3 ข้อเสนอแนะในงานวิจัยครั้งต่อไป..... | 100 |
| **บรรณานุกรม** | ..... | 101 |
| **ภาคผนวก ก.** | **การเตรียมสารเคมี** ..... | 107 |
| **ประวัตินักวิจัย** | ..... | 114 |


มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

# สารบัญตาราง


| ตารางที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| **ตารางที่ 2.1** | ความแตกต่างระหว่างปลากระดูกอ่อนและปลากระดูกแข็ง ..... | 12 |
| **ตารางที่ 2.2** | รายงานการศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ของปลาในวงศ์ปลาปักเป้า (family Tetraodontidae) ..... | 43 |
| **ตารางที่ 3.1** | ส่วนประกอบของสารละลายที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเพื่อสร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ด ..... | 54 |
| **ตารางที่ 3.2** | ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ 10 ชนิด ที่ใช้การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของปลาด้วยเทคนิค RAPD ..... | 56 |
| **ตารางที่ 3.3** | ส่วนประกอบของสารละลายที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยวิธีการ RAPD ..... | 56 |
| **ตารางที่ 4.1** | ความหลากชนิดของปลาปักเป้าที่ศึกษา ..... | 58 |
| **ตารางที่ 4.2** | พันธุศาสตร์เซลล์ของปลาวงศ์ปลาปักเป้า 5 ชนิด ในประเทศไทย (NF = fundamental number; *2n* = diploid number; m = metacentric chromosome; sm = submetacentric chromosome; a = acrocentric chromosome และ t = telocentric chromosome) ..... | 61 |
| **ตารางที่ 4.3** | ค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตร และ 280 นาโนเมตร ของดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อปลาปักเป้า ..... | 79 |
| **ตารางที่ 4.4** | แสดงจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สามารถเพิ่มปริมาณได้ จากไพรเมอร์ RAPD ทั้ง 10 ชนิด ..... | 81 |
| **ตารางที่ 5.1** | ตัวอย่างปลาปักเป้าที่พบในแหล่งน้ำภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ..... | 92 |
| **ตารางที่ 5.2** | ระยะห่างระหว่างพันธุกรรมของปลาปักเป้าทั้ง 3 ชนิด ที่นำมาสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยวิธี RAPD-PCR ..... | 95 |


มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

# สารบัญภาพ


| ภาพที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| **ภาพที่ 2.1** | แม่น้ำที่สำคัญในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ..... | 7 |
| **ภาพที่ 2.2** | แสดงกลุ่มปลาที่มีชีวิตอยู่ในปัจจุบัน ..... | 12 |
| **ภาพที่ 2.3** | ลักษณะภายนอกของปลากระดูกอ่อน ..... | 13 |
| **ภาพที่ 4.1** | ปลาปักเป้าที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ ได้แก่ ปลาปักเป้าดำ (ก.) ปลาปักเป้าควาย (ข.) ปลาปักเป้าท้องตาข่าย (ค.) ปลาปักเป้าเขียว (ง.) และปลาปักเป้าเขียวจุด (จ.) ..... | 59 |
| **ภาพที่ 4.2** | เมทาเฟสโครโมโซม (ก.) และแคริโอไทป์ (ข.) ของปลาปักเป้าดำ (*Tetraodon cochinchinensis*) เพศผู้ มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ (2*n*) 40 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา (สเกลบาร์เท่ากับ 5 ไมโครเมตร) ..... | 63 |
| **ภาพที่ 4.3** | เมทาเฟสโครโมโซม (ก.) และแคริโอไทป์ (ข.) ของปลาปักเป้าดำ (*Tetraodon cochinchinensis*) เพศเมีย มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ (2*n*) 40 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา (สเกลบาร์เท่ากับ 5 ไมโครเมตร) ..... | 64 |
| **ภาพที่ 4.4** | เมทาเฟสโครโมโซม (ก.) และแคริโอไทป์ (ข.) ของปลาปักเป้าดำ (*Tetraodon cochinchinensis*) เพศผู้ มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ (2*n*) 40 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมแถบสีแบบนอร์ลูกศรชี้แสดงตำแหน่งนอร์ (สเกลบาร์เท่ากับ 5 ไมโครเมตร) ..... | 65 |
| **ภาพที่ 4.5** | เมทาเฟสโครโมโซม (ก.) และแคริโอไทป์ (ข.) ของปลาปักเป้าดำ (*Tetraodon cochinchinensis*) เพศเมีย มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ (2*n*) 40 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมแถบสีแบบนอร์ลูกศรชี้แสดงตำแหน่งนอร์ (สเกลบาร์เท่ากับ 5 ไมโครเมตร) ..... | 66 |
| **ภาพที่ 4.6** | เมทาเฟสโครโมโซม (ก.) และแคริโอไทป์ (ข.) ของปลาปักเป้าควาย (*Tetraodon suvattii*) เพศผู้มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ (2*n*) 40 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา (สเกลบาร์เท่ากับ 5 ไมโครเมตร) ..... | 67 |


มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

# สารบัญภาพ (ต่อ)


| ภาพที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| **ภาพที่ 4.7** | เมทาเฟสโครโมโซม (ก.) และแคริโอไทป์ (ข.) ของปลาปักเป้าควาย (*Tetraodon suvattii*) เพศเมียมีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ (2*n*) 40 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา (สเกลบาร์เท่ากับ 5 ไมโครเมตร) ..... | 68 |
| **ภาพที่ 4.8** | เมทาเฟสโครโมโซม (ก.) และแคริโอไทป์ (ข.) ของปลาปักเป้าควาย (*Tetraodon suvattii*) เพศผู้มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ (2*n*) 40 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมสีแบบนอร์ (สเกลบาร์เท่ากับ 5 ไมโครเมตร) ..... | 69 |
| **ภาพที่ 4.9** | เมทาเฟสโครโมโซม (ก.) และแคริโอไทป์ (ข.) ของปลาปักเป้าควาย (*Tetraodon suvattii*) เพศเมียมีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ (2*n*) 40 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมสีแบบนอร์ (สเกลบาร์เท่ากับ 5 ไมโครเมตร) ..... | 70 |
| **ภาพที่ 4.10** | เมทาเฟสโครโมโซม (ก.) และแคริโอไทป์ (ข.) ของปลาปักเป้าท้องตาข่าย (*Tetraodon palembangensis*) เพศผู้ มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ (2*n*) 36 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา (สเกลบาร์เท่ากับ 5 ไมโครเมตร) ..... | 71 |
| **ภาพที่ 4.11** | เมทาเฟสโครโมโซม (ก.) และแคริโอไทป์ (ข.) ของปลาปักเป้าท้องตาข่าย (*Tetraodon palembangensis*) เพศเมีย มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ (2*n*) 36 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา (สเกลบาร์เท่ากับ 5 ไมโครเมตร ..... | 72 |
| **ภาพที่ 4.12** | เมทาเฟสโครโมโซม (ก.) และแคริโอไทป์ (ข.) ของปลาปักเป้าท้องตาข่าย (*Tetraodon palembangensis*) เพศผู้ มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ (2*n*) 36 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมสีแบบนอร์ (สเกลบาร์เท่ากับ 5 ไมโครเมตร ..... | 73 |
| **ภาพที่ 4.13** | เมทาเฟสโครโมโซม (ก.) และแคริโอไทป์ (ข.) ของปลาปักเป้าท้องตาข่าย (*Tetraodon palembangensis*) เพศผู้ มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ (2*n*) 36 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมสีแบบนอร์ (สเกลบาร์เท่ากับ 5 ไมโครเมตร ..... | 74 |


มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

# สารบัญภาพ (ต่อ)


| ภาพที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| **ภาพที่ 4.14** | เมทาเฟสโครโมโซม (ก.) และแคริโอไทป์ (ข.) ของปลาปักเป้าเขียว (*Tetraodon fluviatilis*) เพศผู้ มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ (2*n*) 40 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา (สเกลบาร์เท่ากับ 5 ไมโครเมตร) ..... | 75 |
| **ภาพที่ 4.15** | เมทาเฟสโครโมโซม (ก.) และแคริโอไทป์ (ข.) ของปลาปักเป้าเขียว (*Tetraodon fluviatilis*) เพศเมีย มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ เท่ากับ (2*n*) 40 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา (สเกลบาร์เท่ากับ 5 ไมโครเมตร) ..... | 76 |
| **ภาพที่ 4.16** | เมทาเฟสโครโมโซม (ก.) และแคริโอไทป์ (ข.) ของปลาปักเป้าเขียว (*Tetraodon fluviatilis*) เพศเมีย มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ เท่ากับ (2*n*) 40 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมสีนอร์ (สเกลบาร์เท่ากับ 5 ไมโครเมตร) ..... | 77 |
| **ภาพที่ 4.17** | เมทาเฟสโครโมโซมและแคริโอไทป์ของปลาปักเป้าเขียวจุด (*Dichotomyctere nigroviridis*) มีจำนวนโครโมโซม ดิพลอยด์ เท่ากับ (2*n*) 42 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา (ก. และ ค.) และการย้อมแถบสีแบบนอร์ (ข.) กรอบสี่เหลี่ยมเล็กแสดงตำแหน่งนอร์ (สเกลบาร์เท่ากับ 5 ไมโครเมตร) ..... | 78 |
| **ภาพที่ 5.1** | UPGMA dendrogram from RAPD analysis of Puffer fish from three river basin in northeast of Thailand. Divide three-group population in Puffer fish | 94 |


มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY