

บทที่ 5

ผลการทดลอง

5.1 ชนิดของปลาที่ใช้ในการศึกษา

จากการเก็บตัวอย่างปลาในสกุล *Chitala* ทั้งสามชนิด จากแหล่งน้ำต่างๆ และจากตลาดนัดจตุจักร ได้จำนวนดังแสดงในตารางที่ 4 ในการออกเก็บตัวอย่างปลาจากแหล่งน้ำธรรมชาติ พบว่า มีเพียงปลากลายเท่านั้นที่เก็บได้ ในขณะที่ปลาตองลายและปลาสะตือผู้ทดลองได้เดินทางไปยังจังหวัดที่ได้มีรายงานว่าพบปลาทั้งสองชนิดแต่ไม่ได้ตัวอย่างกลับมา จึงจำเป็นต้องใช้ตัวอย่างจากตลาดนัดสวนจตุจักรมาทดลอง

ตารางที่ 4 ชนิด จำนวน และสถานที่เก็บตัวอย่างปลาที่ใช้ในการทดลอง

ชนิดของปลา	สถานที่เก็บตัวอย่าง	จำนวน (ตัว)
ปลากลาย <i>C. ornata</i>	แม่น้ำปราจีนบุรี จ. ปราจีนบุรี (ปลากลายปราจีนบุรี 1-3)	3
	เขื่อนราษีไศล จ. ศรีสะเกษ (ปลากลายศรีสะเกษ 1-3)	3
	แม่น้ำชี จ. มหาสารคาม (ปลากลายมหาสารคาม 1-3)	3
	แม่น้ำเจ้าพระยา จ. ชัยนาท (ปลากลายชัยนาท)	1
	ตลาดนัดจตุจักร กรุงเทพมหานคร (ปลากลาย 1)	1
ปลาตองลาย <i>C. blanci</i>	ตลาดนัดจตุจักร กรุงเทพมหานคร (ปลาตองลาย 1)	1
ปลาสะตือ <i>C. lopis</i>	ตลาดนัดจตุจักร กรุงเทพมหานคร (ปลาสะตือ 1-3)	3
	รวม	15

นอกจากนี้ ผู้ทดลองได้เลือกลำดับเบสบริเวณไซโทโครมบีของปลาสด *Notopterus notopterus* (AY504822) ปลาทรายแอฟริกา 2 ชนิดคือ *Papyrocranus afer* (AY504823) และ *Xenomystus nigri* (AF201614) จาก GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) เข้าไปในการทดลอง เพื่อเป็นสิ่งมีชีวิตนอกกลุ่ม (outgroup species) ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

5.2 ผลการทดลองด้านพันธุศาสตร์โมเลกุล

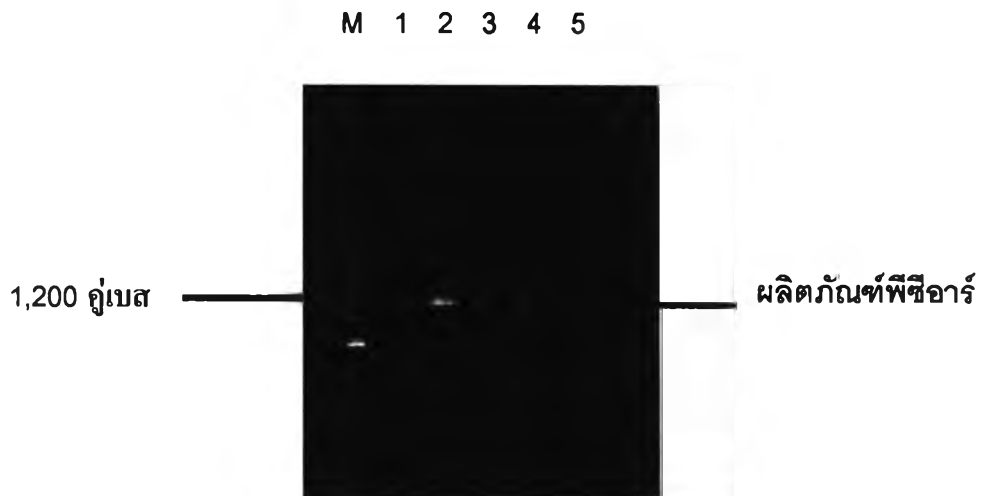
5.2.1 การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ (Genomic DNA) โดยใช้ DNeasy Tissue Kit (QIAGEN, Germany)

ในการสกัด DNA จากเนื้อเยื่อของปลาทั้งสามชนิด ปลาทราย (*C. ornata*) ปลาตองลาย (*C. blanci*) ปลาสะตือ (*C. lopis*) ทั้งจากตัวอย่างสดและตัวอย่างที่เก็บรักษาไว้ใน 70% เอทานอล ระยะแรกผู้ทดลองใช้วิธีการสกัดโดยใช้ไนโตรเจนเหลวร่วมกับการใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ DNeasy Tissue Kit แต่เมื่อทำการตรวจสอบผลการสกัดด้วย 1% agarose gel ปรากฏว่าไม่พบแถบของจีโนมิกดีเอ็นเอของปลาทั้งสามชนิด จึงเปลี่ยนมาใช้ lysis buffer ในการสกัดแทน ซึ่งได้ผลการสกัดที่ดี สามารถเห็นแถบจีโนมิกดีเอ็นเอได้อย่างชัดเจน แต่แถบจีโนมิกดีเอ็นเอของปลาทุกตัวที่นำมาใช้ในการทดลองมีลักษณะเป็นแถบยาวลากลงมาจากด้านบนสู่ด้านล่างของแผ่นวุ้นเนื่องจากเกิดการขาดของสาย จีโนมิกดีเอ็นเอเป็นชิ้นส่วนเล็กๆ พบว่าลักษณะที่เกิดขึ้นนี้ไม่ส่งผลต่อการเพิ่มปริมาณผลิตภัณฑ์พีซีอาร์

5.2.2 การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมบริเวณไซโทโครมบีด้วยวิธีพีซีอาร์

การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมบริเวณไซโทโครมบีของปลาสกุล *Chitala* ทั้งสามชนิดในการทดลองนี้ใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิด คือ ไพรเมอร์ L เป็น forward primer และ ไพรเมอร์ H เป็น reverse primer การทดลองระยะแรกประสบปัญหาไม่สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมได้ จึงทำการแก้ไขปัญหาโดยการลดความเข้มข้นของจีโนมิกดีเอ็นเอลง 10 เท่า 100 เท่า และ 1,000 เท่า ผลการทดลองที่ได้ยังคงเป็นแบบเดิม จึงหันมาให้ความสำคัญกับอุณหภูมิ annealing ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิจากเดิม 55°C ลดลงครั้งละ 0.5°C จนพบว่าที่อุณหภูมิ 50°C ให้แถบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ชัดเจนที่สุด และเมื่อตรวจสอบขนาดของบริเวณไซโทโครมบีโดยใช้ 1% agarose gel ใน 1X TBE ด้วยกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 50 นาที ได้ผลการทดลองที่ดี เห็นแถบของ

ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ชัดเจน ขนาดของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้มีขนาดประมาณ 1,200 คู่เบสเมื่อเทียบกับ ดีเอ็นเอมาตรฐาน Hyper ladder II (Bioline, U.S.A.) ดังภาพที่ 7



ภาพที่ 7 ผลการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์บริเวณไซโทโครมบีหลังจากแยกใน 1% agarose gel ใน 1X TBE ด้วยกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 50 นาที

lane M = Hyper ladder II

lane 1 = Blank

lane 2-3 = *C. blanci*

lane 4 = *C. lopis*

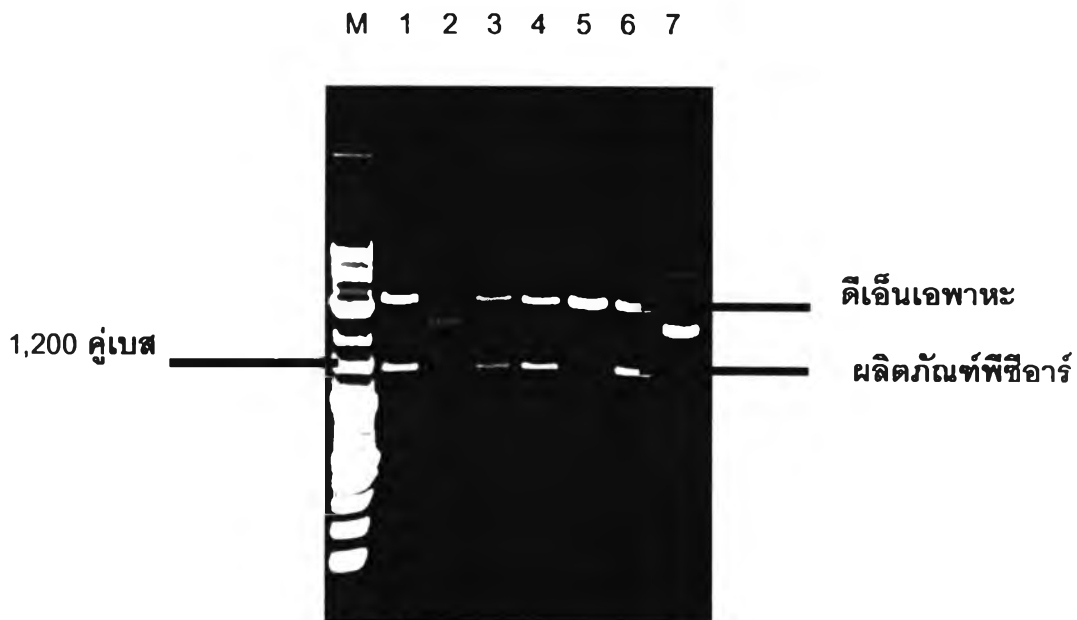
lane 5 = *C. ornata*

5.2.3 การทำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ให้บริสุทธิ์โดยการสกัดออกจากแผ่นวุ้น

ใช้ชุดสกัด QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Germany) เพื่อทำให้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ต้องการปราศจากหรือมีชิ้นส่วนของไพรเมอร์ที่จับกันเอง (primer-dimer) หรือดีเอ็นเอที่ไม่ต้องการน้อยที่สุด เมื่อเสร็จสิ้นการสกัด ได้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของบริเวณไซโทโครมบีที่บริสุทธิ์ พร้อมทั้งจะนำไปเชื่อมต่อกับดีเอ็นเอพาหะและเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียต่อไป

5.2.4 การนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย การสกัดพลาสมิดเพื่อศึกษาลำดับเบส

หลังจากทำการเชื่อมต่อดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์กับดีเอ็นเอพาหะ pGEM-T Easy Vector และส่งถ่ายเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ XL1-Blue โดยใช้วิธีคัดเลือกแบบ blue-white selection พบว่า ได้จำนวนโคโลนีสีขาวมากพอสมควรจากปลาสกุล *Chitala* 15 ตัวอย่าง จึงคัดเลือกโคโลนีสีขาวจำนวน 10 โคโลนีต่อ 1 ตัวอย่าง มาสกัดพลาสมิดเพื่อตรวจสอบการเชื่อมต่อของดีเอ็นเอพาหะและชิ้นส่วนผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วยเอนไซม์ *EcoRI* โคโลนีที่มีชิ้นส่วนผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ต้องการเมื่อตัดด้วยเอนไซม์และตรวจสอบด้วย 1% agarose gel จะให้แถบดีเอ็นเอสองแถบ แถบบนสุดคือดีเอ็นเอพาหะ และแถบที่อยู่ด้านล่างคือ แถบของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ต้องการ เมื่อเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานแล้วพบว่ามีความใกล้เคียงกับแถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 1,200 คู่เบส (ภาพที่ 8) และส่งพลาสมิดโคลนนั้นไปหาลำดับเบสที่บริษัท Macrogen Inc. (Republics of South Korea) ทั้งสาย forward และ reverse



ภาพที่ 8 ผลการตรวจสอบการเชื่อมต่อของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์และดีเอ็นเอพาหะด้วย 1% agarose gel ใน 1X TBE ที่กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 50 นาที

lane M = Hyper Ladder I

lane 1-3 = *C. ornata*

lane 4 = *C. blanci*

lane 5-7 = *C. lopis*

5.2.5 การวิเคราะห์ไฟโลเจเนติก

เมื่อได้ลำดับเบสแล้ว ใช้โปรแกรม Chromas ในการตรวจสอบและเปรียบเทียบคู่ข้อมูล ลำดับเบสของดีเอ็นเอทั้งสาย forward และ reverse เพื่อให้ได้ลำดับเบสที่ถูกต้องยิ่งขึ้น พบว่า กราฟอิเล็กโตรฟีโรแกรมที่ได้มีความชัดเจนไม่มีการซ้อนทับกันของเส้นกราฟที่เกิดจากการปนเปื้อนของลำดับเบสของตัวอย่างอื่นๆ หรือการจับกันเองของไพริเมอร์ แต่กราฟอิเล็กโตรฟีโรแกรมที่ได้ บริเวณส่วนหน้าและส่วนท้ายของการอ่านลำดับเบส ไม่สามารถอ่านผลได้ และลำดับเบสมีความชัดเจนเพียงบริเวณส่วนกลางของบริเวณไซโทโครมบี จึงได้ตัดทอนส่วนที่อ่านผลไม่ได้ออก สุดท้ายได้ลำดับเบสบริเวณไซโทโครมบีที่มีความยาว 805 คู่เบส (ไม่รวมแกป (gap) 1 ตัวก่อนที่จะนำเข้าไปโปรแกรม Clustal X) ต่อจากนั้นเปลี่ยนลำดับเบสให้อยู่ในรูปแบบ FASTA (ภาพที่ 9) ก่อนเข้าสู่กระบวนการจัดเรียงลำดับเบสและเปรียบเทียบโดยใช้โปรแกรม Clustal X

>CN1

```
CCCAATCGCAAAAATTGTTAACGACGCATTAATTGACCTGCCCGCTCCAGTTAATATCTCAGCCTGATGAAACTTCGG
CTCTTTATTAGGAATCTGCCTCATCGTCCAATCTCACCAGACTATTCTAGCCATACACTACACATCAGACATTTT
AACCGCCTTCTCATCAGTAACACACATTTGCCGAGATGTTAACTATGGTTGATTAATCCGAAACATCCACGCAAACGG
CGCCTCCTTCTTCTCATCTGCATTTATCTACAGTAGCCCGAGGTCTCTACTACGGCTCCTATCTCTACAAAGAAAC
ATGAAACGTAGGAGTAATTCTACTATTACTAGTAATAATGACCGCCTTCGTAGGATACGTCTACCTTGAGGACAAAT
ATCATTCTGAGGGGCCACAGTTATTACAAATCTTTTATCCGCCATCCCCTACATCGGAGACGCCTTAGTACAATGAAT
CTGAGGAGGCTTCTCAGTAGACAACGCAACACTAAGTTCGATTCTTTGCATTCCACTTCTATTCCCATTCCTAATCGC
AGGCGCAACCATCATAACCTCCTTTTCTACATGAAACAGGATCTAACAATCCAGTAGGACTAAACTCAGACACAGA
CAAAGTACCATTTTATCCATACTTTTATATAAAGACTTATTCCGATTATTATTATACTCTTAGCCCTTACAACACT
AGCACTATTCTACCCAACCTGCTAGGAGACCCAGAAAACCTTACACCCGCAAACCCACTAGTCACCCCTCCACACAT
TAAGCCCGAATGATATTTTCTATTT
```

>KB1

```
CCCAATCGCAAAAATTATCAACGACACATTAATTGACCTACCCGCCCGACTAATATTTTACGCCTGATGAAACTTCGG
CTCCCTGCTAGGAATCTGCCTTATCGTCCAATCTCACCAGACTATTCTAGCCATACATTACACACCTGACATTTT
AACCGCCTTCTCCTCAGTAGCACACATCTGCCGAAATGTCAATTACGGTTGACTAATCCGAAACATCCATGCAAACGG
CGCCTCCTTCTTCTCATCTGTATCTACCTACAGTAGCTCGAGGCTCTACTACGGCTCATATCTCTATAAAGAAAC
ATGAAACGTAGGGGTTATCCTCCTACTCCTAGTAATAATGACCGCCTTTGTAGGATACGTACTACCCTGGGGGCAAAT
ATCATTCTGAGGGGCCACAGTCATTACAAACCTTTTATCCGCCGCTCCCCTACACTGGAAATGCTTTAGCACAATGAAT
CTGAGGAGGTTTTTTCAGTGGACAACGCAACACTAACCAGTTTTTTCGCATTCCACTTCTATTCCCTTCTAATTGC
AGGCGCAACCATCATAACCTCCTTTTCTTACAGAAACAGGATCCAGCAACCAACAGGACTAAATTAGACACAGA
CAAAGTGCCATTTTACCCATACTTCTCATACAAAGACCTGCTCGGATTTATTATTATACTCCTAGCCCTTGCAACACT
AGCACTATTTTACCAAACCTACTAGGAGACCCAGAAAACCTTACACCCGCAAACCCATTAGTCACCCCTCCACACAT
CAAACCCGAATGATACTTCTATTT
```

>KB2

```
CCCAATCGCAAAAATTATCAACGACACATTAATTGACCTACCCGCCCGACTAATATTTTACGCCTGATGAAACTTCGG
CTCCCTGCTAGGAATCTGCCTTATCGTCCAATCTCACCAGACTATTCTAGCCATACATTACACACCTGACATTTT
AACCGCCTTCTCCTCAGTAGCACACATCTGCCGAAATGTCAATTACGGTTGACTAATCCGAAACATCCATGCAAACGG
CGCCTCCTTCTTCTCATCTGTATCTACCTACAGTAGCTCGAGGCTCTACTACGGCTCATATCTCTATAAAGAAAC
ATGAAACGTAGGGGTTATCCTCCTACTCCTAGTAATAATGACCGCCTTTGTAGGATACGTACTACCCTGGGGGCAAAT
ATCATTCTGAGGGGCCACAGTCATTACAAACCTTTTATCCGCCGCTCCCCTACACTGGAAATGCTTTAGCACAATGAAT
CTGAGGAGGTTTTTTCAGTGGACAACGCAACACTAACCAGTTTTTTCGCATTCCACTTCTATTCCCTTCTAATTGC
AGGCGCAACCATCATAACCTCCTTTTCTTACAGAAACAGGATCCAGCAACCAACAGGACTAAATTAGACACAGA
CAAAGTGCCATTTTACCCATACTTCTCATACAAAGACCTGCTCGGATTTATTATTATACTCCTAGCCCTTGCAACACT
AGCACTATTTTACCAAACCTACTAGGAGACCCAGAAAACCTTACACCCGCAAACCCATTAGTCACCCCTCCACACAT
CAAACCCGAATGATACTTCTATTT
```

>KP3

```
CCCAATCGCAAAAATTGTTAACGACGCATTAATTGACCTACCCGCTCCAGTTAATATCTCAGCCTGATGAAACTTCGG
CTCTTTATTAGGAATCTGCCTCATCGTCCAATCTCACCAGACTATTCTAGCCATACACTACACATCAGACATTTT
AACCGCCTTCTCATCAGTAACACACATTTGCCGAGATGTTAACTATGGTTGATTAATCCGAAACATCCACGCAAACGG
CGCCTCCTTCTTCTCATCTGCATTTATCTACAGTAGCCCGAGGTCTCTACTACGGCTCCTATCTCTACAAAGAAAC
ATGAAACGTAGGAGTAATTCTACTATTACTAGTAATAATGACCGCCTTCGTAGGATACGTCTACCTTGAGGACAAAT
ATCATTCTGAGGGGCCACAGTTATTACAAATCTTTTATCCGCCATCCCCTACGTCCGAGACGCCTTAGTACAATGAAT
CTGAGGAGGCTTCTCAGTAGACAACGCAACACTAAGTTCGATTCTTTGCATTCCACTTCTATTCCCTTCTAATCGC
AGGCGCAACCATCATAACCTCCTTTTCTTACATGAAACAGGATCTAACAATCCAGTAGGACTAAACTCAGACACAGA
CAAAGTACCATTTTATCCATACTTTTATATAAAGACTTATTCCGATTATTATTATACTCTTAGCCCTTACAACACT
AGCACTATTCTACCCAACCTGCTAGGAGACCCAGAAAACCTTACACCCGCAAACCCACTAGTCACCCCTCCACACAT
TAAGCCCGAATGATATTTTCTATTT
```

ภาพที่ 9 ตัวอย่างของลำดับเบสบริเวณไซโทโครมบีในรูปแบบของ FASTA

ในการใช้โปรแกรม Clustal X ผู้ทดลองได้เลือกลำดับเบสบริเวณไซโทโครมบีของปลาสด *Notopterus notopterus* (AY504822) ปลาทรายอัฟริกา 2 ชนิดคือ *Papyrocranus afer* (AY504823) และ *Xenomystus nigri* (AF201614) จาก GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) เข้าไปทดลองด้วย และเพื่อเป็นสิ่งมีชีวิตนอกกลุ่ม นำไปวิเคราะห์ต่อไป และเมื่อนำข้อมูลลำดับเบสทั้งหมดมาจัดเรียงลำดับด้วยโปรแกรม Clustal X แล้ว ได้ผลดังภาพที่ 10

CLUSTAL X (1.64b) multiple sequence alignment

```

KB1          CCCAATCGCAAAAATTATCAACGACACATTAATTGACCTACCCGCCCCGACTAATATTTTC
CLM          CCCAATCGCAAAAATTATCAACGACACATTAATTGACCTACCCGCCCCGACTAATATTTTC
KB2          CCCAATCGCAAAAATTATCAACGACACATTAATTGACCTACCCGCCCCGACTAATATTTTC
MH1          CCCAATCGCAAAAATTGTTAACGACGCATTAATTGACCTACCCGCTCCAGTTAATATCTC
MH2          CCCAATCGCAAAAATTGTTAACGACGCATTAATTGACCTACCCGCTCCAGTTAATATCTC
Sg2          CCCAATCGCAAAAATTGTTAACGACGCATTAATTGACCTACCCGCTCCAGTTAATATCTC
Sg3          CCCAATCGCAAAAATTGTTAACGACGCATTAATTGACCTACCCGCTCCAGTTAATATCTC
KP2          CCCAATCGCAAAAATTGTTAACGACGCATTAATTGACCTACCCGCTCCAGTTAATATCTC
MH3          CCCAATCGCAAAAATTGTTAACGACGCATTAATTGACCTACCCGCTCCAGTTAATATCTC
KP3          CCCAATCGCAAAAATTGTTAACGACGCATTAATTGACCTACCCGCTCCAGTTAATATCTC
Sg1          CCCAATCGCAAAAATTGTTAACGACGCATTAATTGACCTACCCGCTCCAGTTAATATCTC
CN1          CCCAATCGCAAAAATTGTTAACGACGCATTAATTGACCTGCCCGCTCCAGTTAATATCTC
COL2        CCCAATCGCAAAAATTGTTAACGACGCATTAATTGACCTGCCCGCTCCAGTTAATATCTC
KP1          CCCAATCGCAAAAATTGTTAACGACGCATTAATTGACCTACCCGCTCCAGTTAATATCTC
CBL2        CCCCATCGCAAAAATTGTTAACGACGCAC TAATCAACCTACCAGCCCCAGTTAACATCTC
N_notopterus CCCAATTGCAAAAATTATTAACGACGACTCATTGACCTCCCGCCCCAGTTAATATTTTC
Papyrocranus CCCAATCGCAAAAATTGTTAACGACGCCCTCATTGACCTCCCAACCCCCCTAAATATTTTC
Xenomystus  CCCAATTGCAAAAATTGTTAATGACGCCCTCATCGACCTCCCTACTCCAGTAAACATCTC
*** ** ***** * ** ** * * ** ***** * * ** * ** * **

KB1          AGCCTGATGAAACTTCGGCTCCCTGCTAGGAATCTGCCTTATCGTCCAAATTCACCGG
CLM          AGCCTGATGAAACTTCGGCTCCCTGCTAGGAATCTGCCTTATCGTCCAAATTCACCGG
KB2          AGCCTGATGAAACTTCGGCTCCCTGCTAGGAATCTGCCTTATCGTCCAAATTCACCGG
MH1          AGCCTGATGAAACTTCGGCTCTTTATTAGGAATCTGCCTCATCGTCCAAATCCTCACCGG
MH2          AGCCTGATGAAACTTCGGCTCTTTATTAGGAATCTGCCTCATCGTCCAAATCCTCACCGG
Sg2          AGCCTGATGAAACTTCGGCTCTTTATTAGGAATCTGCCTCATCGTCCAAATCCTCACCGG
Sg3          AGCCTGATGAAACTTCGGCTCTTTATTAGGAATCTGCCTCATCGTCCAAATCCTCACCGG
SM2          AGCCTGATGAAACTTCGGCTCTTTATTAGGAATCTGCCTCATCGTCCAAATCCTCACCGG
MH3          AGCCTGATGAAACTTCGGCTCTTTATTAGGAATCTGCCTCATCGTCCAAATCCTCACCGG
KP3          AGCCTGATGAAACTTCGGCTCTTTATTAGGAATCTGCCTCATCGTCCAAATCCTCACCGG
Sg1          AGCCTGATGAAACTTCGGCTCTTTATTAGGAATCTGCCTCATCGTCCAAATCCTCACCGG
CN1          AGCCTGATGAAACTTCGGCTCTTTATTAGGAATCTGCCTCATCGTCCAAATCCTCACCGG
COL2        AGCCTGATGAAACTTCGGCTCTTTATTAGGAATCTGCCTCATCGTCCAAATCCTCACCGG
KP1          AGCCTGATGAAACTTCGGCTCTTTATTAGGAATCTGCCTCATCGTCCAAATCCTCACCGG
CBL2        AGCCTGATGAAACTTTGGCTCTCTGCTAGGAATCTGCCTTATCGTCCAAATCCTCACCGG
N_notopterus AGCCTGATGAAACTTTGGTTCCTACTAGGACTTTGCCTCATTGTACAAATCCTAACCGG
Papyrocranus TACCTGATGAAACTTTGGCTCCCTGCTAGGCTGTGCCTAATTACTCAAATCCTAACCGG
Xenomystus  AGCTTGATGAAACTTCGGCTCTCTTCTGGGCTATGCTTAATTACACAAATCCTAACAGG
* ***** ** ** * ** * ** * ** * ** ***** * ** **

```

KB1 ACTATTCCCTAGCCATACATTACACACCTGACATTTCAACCGCCTTCTCCTCAGTAGCACA
 CLM ACTATTCCCTAGCCATACATTACACACCTGACATTTCAACCGCCTTCTCCTCAGTAGCACA
 KB2 ACTATTCCCTAGCCATACATTACACACCTGACATTTCAACCGCCTTCTCCTCAGTAGCACA
 MH1 ACTATTCCCTAGCCATACACTACACATCAGACATTTCAACCGCCTTCTCATCAGTAACACA
 MH2 ACTATTCCCTAGCCATACACTACACATCAGACATTTCAACCGCCTTCTCATCAGTAACACA
 Sg2 ACTATTCCCTAGCCATACACTACACATCAGACATTTCAACCGCCTTCTCATCAGTAACACA
 Sg3 ACTATTCCCTAGCCATACACTACACATCAGACATTTCAACCGCCTTCTCATCAGTAACACA
 SM2 ACTATTCCCTAGCCATACACTACACATCAGACATTTCAACCGCCTTCTCATCAGTAACACA
 MH3 ACTATTCCCTAGCCATACACTACACATCAGACATTTCAACCGCCTTCTCATCAGTAACACA
 KP3 ACTATTCCCTAGCCATACACTACACATCAGACATTTCAACCGCCTTCTCATCAGTAACACA
 Sg1 ACTATTCCCTAGCCATACACTACACATCAGACATTTCAACCGCCTTCTCATCAGTAACACA
 CN1 ACTATTCCCTAGCCATACACTACACATCAGACATTTCAACCGCCTTCTCATCAGTAACACA
 COL2 ACTATTCCCTAGCCATACACTACACATCAGACATTTCAACCGCCTTCTCATCAGTAACACA
 KP1 ACTATTCCCTAGCCATACACTACACATCAGACATTTCAACCGCCTTCTCATCAGTAACACA
 CBL2 GCTATTCTAGCCATACACTACATCAGATATTTCAACCGCCTTCTCCTCTGTAACACA
 N_notopterus ACTGTTCCCTAGCTATACATTATACATCAGACATCTCAACTGCCTTCTCCTCAGTAGTACA
 Papyrocranus ACTCTTCCCTAGCCATACATTACACATCAGATATCTCAACCGCCTTCTCCTCAGTAGTCCA
 Xenomystus GCTCTTCTAGCCATACACTACACGTCCGACATCTCCACCGCCTTCTCATCCGTTGTACA
 * * * * *

KB1 CATCTGCCGAAATGTCAATTACGGTTGACTAATCCGAAACATCCATGCAAACGGCGCCTC
 CLM CATCTGCCGAAATGTCAATTACGGTTGACTAATCCGAAACATCCATGCAAACGGCGCCTC
 KB2 CATCTGCCGAAATGTCAATTACGGTTGACTAATCCGAAACATCCATGCAAACGGCGCCTC
 MH1 CATTTGCCGAGATGTCAACTATGGTTGATTAATCCGAAACATCCACGCAAACGGCGCCTC
 MH2 CATTTGCCGAGATGTCAACTATGGTTGATTAATCCGAAACATCCACGCAAACGGCGCCTC
 Sg2 CATTTGCCGAGATGTCAACTATGGTTGATTAATCCGAAACATCCACGCAAACGGCGCCTC
 Sg3 CATTTGCCGAGATGTCAACTATGGTTGATTAATCCGAAACATCCACGCAAACGGCGCCTC
 SM2 CATTTGCCGAGATGTCAACTATGGTTGATTAATCCGAAACATCCACGCAAACGGCGCCTC
 MH3 CATTTGCCGAGATGTCAACTATGGTTGATTAATCCGAAACATCCACGCAAACGGCGCCTC
 KP3 CATTTGCCGAGATGTCAACTATGGTTGATTAATCCGAAACATCCACGCAAACGGCGCCTC
 Sg1 CATTTGCCGAGATGTCAACTATGGTTGATTAATCCGAAACATCCACGCAAACGGCGCCTC
 CN1 CATTTGCCGAGATGTCAACTATGGTTGATTAATCCGAAACATCCACGCAAACGGCGCCTC
 COL2 CATTTGCCGAGATGTCAACTATGGTTGATTAATCCGAAACATCCACGCAAACGGCGCCTC
 KP1 CATTTGCCGAGATGTCAACTATGGTTGATTAATCCGAAACATCCACGCAAACGGCGCCTC
 CBL2 CATCTGCCGAGACGTCAATTATGGTTGACTAATCCGAAACATCCACGCAAACGGTGCCCTC
 N_notopterus TATCTGCCGAGACGTCAACTACGGCTGACTAATCCGAAATATCCATGCAAACGGCGCCTC
 Papyrocranus CATCTGCCGAGACGTCAACTATGGCTGACTTATCCGAAATATCCACGCAAATGGGCGCCTC
 Xenomystus TATCTGTCGCGACGTCAATTATGGCTGACTAATCCGAAATATCCACGCAAACGGGAGCCTC
 * * * * *

KB1 CTTCTTCTTTCATCTGTATCTACCTACACGTAGCTCGAGGCCTCTACTACGGCTCATATCT
 CLM CTTCTTCTTTCATCTGTATCTACCTACACGTAGCTCGAGGCCTCTACTACGGCTCATATCT
 KB2 CTTCTTCTTTCATCTGTATCTACCTACACGTAGCTCGAGGCCTCTACTACGGCTCATATCT
 MH1 CTTCTTCTTTCATCTGCATTTATCTACACGTAGCCCGAGGTCTCTACTACGGCTCCTATCT
 MH2 CTTCTTCTTTCATCTGCATTTATCTACACGTAGCCCGAGGTCTCTACTACGGCTCCTATCT
 Sg2 CTTCTTCTTTCATCTGCATTTATCTACACGTAGCCCGAGGTCTCTACTACGGCTCCTATCT
 Sg3 CTTCTTCTTTCATCTGCATTTATCTACACGTAGCCCGAGGTCTCTACTACGGCTCCTATCT
 SM2 CTTCTTCTTTCATCTGCATTTATCTACACGTAGCCCGAGGTCTCTACTACGGCTCCTATCT
 MH3 CTTCTTCTTTCATCTGCATTTATCTACACGTAGCCCGAGGTCTCTACTACGGCTCCTATCT
 KP3 CTTCTTCTTTCATCTGCATTTATCTACACGTAGCCCGAGGTCTCTACTACGGCTCCTATCT
 Sg1 CTTCTTCTTTCATCTGCATTTATCTACACGTAGCCCGAGGTCTCTACTACGGCTCCTATCT
 CN1 CTTCTTCTTTCATCTGCATTTATCTACACGTAGCCCGAGGTCTCTACTACGGCTCCTATCT
 COL2 CTTCTTCTTTCATCTGCATTTATCTACACGTAGCCCGAGGTCTCTACTACGGCTCCTATCT
 KP1 CTTCTTCTTTCATCTGCATTTATCTACACGTAGCCCGAGGTCTCTACTACGGCTCCTATCT
 CBL2 CTTCTTCTTTCATCTGTATTTACCTGCACGTAGCCCGAGGTCTATATTACGGCTCATACT
 N_notopterus ATTCTTCTTTATCTGTATTTACCTACACGTAGCCCGAGGCCTTTACTACGGCTCCTACCT
 Papyrocranus CTTCTTCTTTCATCTGCATTTACCTTTCATGTTGCCCGAGGCCTTTACTATGGCTCCTACCT
 Xenomystus ATTTTCTTTCATCTGCATCTACCTACACGTAGCACGAGGCCTCTACTACGGCTCCTATCT
 * * * * *

KB1 CTATAAGAAACATGAAACGTAGGGGTTATCCTCCTACTCCTAGTAATAATGACCGCCTT
CLM CTATAAGAAACATGAAACGTAGGGGTTATCCTCCTACTCCTAGTAATAATGACCGCCTT
KB2 CTATAAGAAACATGAAACGTAGGGGTTATCCTCCTACTCCTAGTAATAATGACCGCCTT
MH1 CTACAAAGAAACATGAAACGTAGGAGTAATTCTACTATTACTAGTAATAATGACCGCCTT
MH2 CTACAAAGAAACATGAAACGTAGGAGTAATTCTACTATTACTAGTAATAATGACCGCCTT
Sg2 CTACAAAGAAACATGAAACGTAGGAGTAATTCTACTATTACTAGTAATAATGACCGCCTT
Sg3 CTACAAAGAAACATGAAACGTAGGAGTAATTCTACTATTACTAGTAATAATGACCGCCTT
SM2 CTACAAAGAAACATGAAACGTAGGAGTAATTCTACTATTACTAGTAATAATGACCGCCTT
MH3 CTACAAAGAAACATGAAACGTAGGAGTAATTCTACTATTACTAGTAATAATGACCGCCTT
KP3 CTACAAAGAAACATGAAACGTAGGAGTAATTCTACTATTACTAGTAATAATGACCGCCTT
Sg1 CTACAAAGAAACATGAAACGTAGGAGTAATTCTACTATTACTAGTAATAATGACCGCCTT
CN1 CTACAAAGAAACATGAAACGTAGGAGTAATTCTACTATTACTAGTAATAATGACCGCCTT
COL2 CTACAAAGAAACATGAAACGTAGGAGTAATTCTACTATTACTAGTAATAATGACCGCCTT
KP1 CTACAAAGAAACATGAAACGTAGGAGTAATTCTACTATTACTAGTAATAATGACCGCCTT
CBL2 CTATAAGAAACATGAAATGTGGGGTCGTCTTATTACTCCTAGTAATAATGACTGCCTT
N_notopterus ATATAAGAAACATGAAATGTGGGGTAATTCTACTTCTCCTAGTAATAATAACCGCTTT
Papyrocranus ATACTTCGAAACTTGAACATCGGAGTAATTCTCCTACTACTAGTTATGATAACTGCATT
Xenomystus ATATCTAGAAACATGAAACGTTGGAGTTATCTTATTATCTAGTTATAATGACTGCCTT
* * * * *

KB1 TGTAGGATACGTACTACCCTGGGGGCAAATATCATTCTGAGGGGCCACAGTCATTACAAA
CLM TGTAGGATACGTACTACCCTGGGGGCAAATATCATTCTGAGGGGCCACAGTCATTACAAA
KB2 TGTAGGATACGTACTACCCTGGGGGCAAATATCATTCTGAGGGGCCACAGTCATTACAAA
MH1 CGTAGGATACGTCTACCTTGAGGACAAATATCATTCTGAGGGGCCACAGTTATTACAAA
MH2 CGTAGGATACGTCTACCTTGAGGACAAATATCATTCTGAGGGGCCACAGTTATTACAAA
Sg2 CGTAGGATACGTCTACCTTGAGGACAAATATCATTCTGAGGGGCCACAGTTATTACAAA
Sg3 CGTAGGATACGTCTACCTTGAGGACAAATATCATTCTGAGGGGCCACAGTTATTACAAA
SM2 CGTAGGATACGTCTACCTTGAGGACAAATATCATTCTGAGGGGCCACAGTTATTACAAA
MH3 CGTAGGATACGTCTACCTTGAGGACAAATATCATTCTGAGGGGCCACAGTTATTACAAA
KP3 CGTAGGATACGTCTACCTTGAGGACAAATATCATTCTGAGGGGCCACAGTTATTACAAA
Sg1 CGTAGGATACGTCTACCTTGAGGACAAATATCATTCTGAGGGGCCACAGTTATTACAAA
CN1 CGTAGGATACGTCTACCTTGAGGACAAATATCATTCTGAGGGGCCACAGTTATTACAAA
COL2 CGTAGGATACGTCTACCTTGAGGACAAATATCATTCTGAGGGGCCACAGTTATTACAAA
KP1 CGTAGGATACGTCTACCTTGAGGACAAATATCATTCTGAGGGGCCACAGTTATTACAAA
CBL2 CGTAGGATACGTCTACCTTGAGGACAAATATCATTCTGAGGTGCCACAGTCATCACAAA
N_notopterus CGTAGGTTATGTCTACCTTGAGGACAAATATCATTCTGAGGAGCCACAGTCATTACCAA
Papyrocranus CGTAGGATATGTTTTACCTTGGGGCCAAATATCCTTCTGAGGTGCAACCGTNATTACCAA
Xenomystus CGTGGGCTATGTCTCCCATGAGGCCAAATATCTTTCTGAGGCGGACTGTATTACAAA
* * * * *

KB1 CCTTTTCATCCGCCGTCCCTTACACTGGAAATGCTTTAGCACAATGAATCTGAGGAGGTTT
CLM CCTTTTCATCCGCCGTCCCTTACACTGGAAATGCTTTAGCACAATGAATCTGAGGAGGTTT
KB2 CCTTTTCATCCGCCGTCCCTTACACTGGAAATGCTTTAGCACAATGAATCTGAGGAGGTTT
MH1 TCTTTTATCCGCCATCCCTTACATCGGAGAGCGCCTTAGTACAATGAATCTGAGGAGGCTT
MH2 TCTTTTATCCGCCATCCCTTACATCGGAGAGCGCCTTAGTACAATGAATCTGAGGAGGCTT
Sg2 TCTTTTATCCGCCATCCCTTACATCGGAGAGCGCCTTAGTACAATGAATCTGAGGAGGCTT
Sg3 TCTTTTATCCGCCATCCCTTACATCGGAGAGCGCCTTAGTACAATGAATCTGAGGAGGCTT
SM2 TCTTTTATCCGCCATCCCTTACATCGGAGAGCGCCTTAGTACAATGAATCTGAGGAGGCTT
MH3 TCTTTTATCCGCCATCCCTTACATCGGAGAGCGCCTTAGTACAATGAATCTGAGGAGGCTT
KP3 TCTTTTATCCGCCATCCCTTACATCGGAGAGCGCCTTAGTACAATGAATCTGAGGAGGCTT
Sg1 TCTTTTATCCGCCATCCCTTACATCGGAGAGCGCCTTAGTACAATGAATCTGAGGAGGCTT
CN1 TCTTTTATCCGCCATCCCTTACATCGGAGAGCGCCTTAGTACAATGAATCTGAGGAGGCTT
COL2 TCTTTTATCCGCCATCCCTTACATCGGAGAGCGCCTTAGTACAATGAATCTGAGGAGGCTT
KP1 TCTTTTATCCGCCATCCCTTACATCGGAGAGCGCCTTAGTACAATGAATCTGAGGAGGCTT
CBL2 CCTTTTATCCGCCGTTCCCTTACATCGGAGATGCCCTTAGTACAATGAATTTGAGGAGGCTT
N_notopterus CTTATTATCCGCCGTTCCCTATATTTGGAGATGCCCTTAGTACAATGAATTTGAGGGGGATT
Papyrocranus CCTCCTATCAGCATCCCTTACATCGGTAATACTGGTAACTAGTACAATGAATTTGAGGAGGTT
Xenomystus CCTCCTATCAGCTATCCCTTACATCGGAAACATACTAGTACAATGAATCTGAGGCGGCTT
* * * * *

KB1 TTCAGTGGACAACGCAACACTAACCCGATTTTTTCGCATTCCACTTCCCTATTTCCCCTTCCT
 CLM TTCAGTGGACAACGCAACACTAACCCGATTTTTTCGCATTCCACTTCCCTATTTCCCCTTCCT
 KB2 TTCAGTGGACAACGCAACACTAACCCGATTTTTTCGCATTCCACTTCCCTATTTCCCCTTCCT
 MH1 CTCAGTAGACAACGCAACACTAACCTCGATTCTTTGCATTCCACTTCCCTATTTCCCATTCCCT
 MH2 CTCAGTAGACAACGCAACACTAACCTCGATTCTTTGCATTCCACTTCCCTATTTCCCATTCCCT
 Sg2 CTCAGTAGACAACGCAACACTAACCTCGATTCTTTGCATTCCACTTCCCTATTTCCCATTCCCT
 Sg3 CTCAGTAGACAACGCAACACTAACCTCGATTCTTTGCATTCCACTTCCCTATTTCCCATTCCCT
 SM2 CTCAGTAGACAACGCAACACTAACCTCGATTCTTTGCATTCCACTTCCCTATTTCCCATTCCCT
 MH3 CTCAGTAGACAACGCAACACTAACCTCGATTCTTTGCATTCCACTTCCCTATTTCCCATTCCCT
 KP3 CTCAGTAGACAACGCAACACTAACCTCGATTCTTTGCATTCCACTTCCCTATTTCCCATTCCCT
 Sg1 CTCAGTAGACAACGCAACACTAACCTCGATTCTTTGCATTCCACTTCCCTATTTCCCATTCCCT
 CN1 CTCAGTAGACAACGCAACACTAACCTCGATTCTTTGCATTCCACTTCCCTATTTCCCATTCCCT
 COL2 CTCAGTAGACAACGCAACACTAACCTCGATTCTTTGCATTCCACTTCCCTATTTCCCATTCCCT
 KP1 CTCAGTAGACAACGCAACACTAACCTCGATTCTTTGCATTCCACTTCCCTATTTCCCATTCCCT
 CBL2 TTCAGTAGACAACGCAACACTAACCCGATTTTTTCGCATTCCACTTCCCTATTTCCCATTCCCT
 N_notopterus TTCAGTAGACAACGCAACACTAACCCGATTTTTTCGCATTCCACTTCCCTATTTCCCATTCCCT
 Papyrocranus CTCAGTAGACAATGCTACACTCACAGGATTCTTTCGCATTTCACTTCTTATTTCCCCTTCCT
 Xenomystus TTCAGTAGACAATGCAACTCTCACCCGATTTCTTCGCATTCCACTTCCCTACTCCCATTGT

KB1 AATTGCAGGCGCAACCATCATAACCTCCTTTTCTTACACGAAACAGGATCCAGCAACCC
 CLM AATTGCAGGCGCAACCATCATAACCTCCTTTTCTTACACGAAACAGGATCCAGCAACCC
 KB2 AATTGCAGGCGCAACCATCATAACCTCCTTTTCTTACACGAAACAGGATCCAGCAACCC
 MH1 AATCGCAGGCGCAACCATCATAACCTCCTTTTCTTACATGAAACAGGATCTAACAATCC
 MH2 AATCGCAGGCGCAACCATCATAACCTCCTTTTCTTACATGAAACAGGATCTAACAATCC
 Sg2 AATCGCAGGCGCAACCATCATAACCTCCTTTTCTTACATGAAACAGGATCTAACAATCC
 Sg3 AATCGCAGGCGCAACCATCATAACCTCCTTTTCTTACATGAAACAGGATCTAACAATCC
 SM2 AATCGCAGGCGCAACCATCATAACCTCCTTTTCTTACATGAAACAGGATCTAACAATCC
 MH3 AATCGCAGGCGCAACCATCATAACCTCCTTTTCTTACATGAAACAGGATCTAACAATCC
 KP3 AATCGCAGGCGCAACCATCATAACCTCCTTTTCTTACATGAAACAGGATCTAACAATCC
 Sg1 AATCGCAGGCGCAACCATCATAACCTCCTTTTCTTACATGAAACAGGATCTAACAATCC
 CN1 AATCGCAGGCGCAACCATCATAACCTCCTTTTCTTACATGAAACAGGATCTAACAATCC
 COL2 AATCGCAGGCGCAACCATCATAACCTCCTTTTCTTACATGAAACAGGATCTAACAATCC
 KP1 AATCGCAGGCGCAACCATCATAACCTCCTTTTCTTACATGAAACAGGATCTAACAATCC
 CBL2 AATTGCAGGCACAACCATATGACCTCCTTTTCTTACATGAAACAGGCTCCAACAACCC
 N_notopterus AATCGCAGGCGCAACTATTATTCACCTTCTTTTCTTACACGAAACAGGATCAAACAACCC
 Papyrocranus AATCGCAGCAGTACAACTCTGACCTCCTTTTCTTACATGAAACAGGATCAAACAACCC
 Xenomystus CATTGCAGGAGCAACAATTTTACATCTCCTATTTTACACAAGACAGGATCAAATAACCC
 ** *****

KB1 AACAGGACTAAATTCAGACACAGACAAAGTGCCATTTACCCATACTTCTCATACAAAGA
 CLM AACAGGACTAGATTCAGACACAGACAAAGTGCCATTTACCCATACTTCTCATACAAAGA
 KB2 AACAGGACTAAATTCAGACACAGACAAAGTGCCATTTACCCATACTTCTCATACAAAGA
 MH1 AGTAGGACTAAACTCAGACACAGACAAAGTACCATTTTATCCATACTTTTTCATATAAAGA
 MH2 AGTAGGACTAAACTCAGACACAGACAAAGTACCATTTTATCCATACTTTTTCATATAAAGA
 Sg2 AGTAGGACTAAACTCAGACACAGACAAAGTACCATTTTATCCATACTTTTTCATATAAAGA
 Sg3 AGTAGGACTAAACTCAGACACAGACAAAGTACCATTTTATCCATACTTTTTCATATAAAGA
 SM2 AGTAGGACTAAACTCAGACACAGACAAAGTACCATTTTATCCATACTTTTTCATATAAAGA
 MH3 AGTAGGACTAAACTCAGACACAGACAAAGTACCATTTTATCCATACTTTTTCATATAAAGA
 KP3 AGTAGGACTAAACTCAGACACAGACAAAGTACCATTTTATCCATACTTTTTCATATAAAGA
 Sg1 AGTAGGACTAAACTCAGACACAGACAAAGTACCATTTTATCCATACTTTTTCATATAAAGA
 CN1 AGTAGGACTAAACTCAGACACAGACAAAGTACCATTTTATCCATACTTTTTCATATAAAGA
 COL2 AGTAGGACTAAACTCAGACACAGACAAAGTACCATTTTATCCATACTTTTTCATATAAAGA
 KP1 AGTAGGACTAAACTCAGACACAGACAAAGTACCATTTTATCCATACTTTTTCATATAAAGA
 CBL2 AGTAGGACTAAATTCAGATACAGACAAAGTACCATTTACCCATACTTTTTCATACAAAGA
 N_notopterus AGCAGGACTAAACTCAGATGTAGATAAAGTACCATTTACCCATACTTTTTCATACAAAGA
 Papyrocranus AACAGGACTCAACTCAGATGCAGAAAAAATCCCTTTACCCCTACTTCTCATACAAAGA
 Xenomystus AACAGGCTTAAACTCAGATACAGAAAAAATCCATTTACCCATACTTCTCATACAAAGA
 * ** * * *

KB1 CCTGCTCGGATTTATTATTATACTCCTAGCCCTTGCAACACTAGCACTATTTTCACCAA
 CLM CCTGCTCGGATTTATTATTATACTCCTAGCCCTTGCAACACTAGCACTATTTTCACCAA
 KB2 CCTGCTCGGATTTATTATTATACTCCTAGCCCTTGCAACACTAGCACTATTTTCACCAA
 MH1 CTTATTTCGGATTCATTATTATACTCTTAGCCCTTACAACACTAGCACTATTCTCACCCAA
 MH2 CTTATTTCGGATTCATTATTATACTCTTAGCCCTTACAACACTAGCACTATTCTCACCCAA
 Sg2 CTTATTTCGGATTCATTATTATACTCTTAGCCCTTACAACACTAGCACTATTCTCACCCAA
 Sg3 CTTATTTCGGATTCATTATTATACTCTTAGCCCTTACAACACTAGCACTATTCTCACCCAA
 SM2 CTTATTTCGGATTCATTATTATACTCTTAGCCCTTACAACACTAGCACTATTCTCACCCAA
 MH3 CTTATTTCGGATTCATTATTATACTCTTAGCCCTTACAACACTAGCACTATTCTCACCCAA
 KP3 CTTATTTCGGATTCATTATTATACTCTTAGCCCTTACAACACTAGCACTATTCTCACCCAA
 Sg1 CTTATTTCGGATTCATTATTATACTCTTAGCCCTTACAACACTAGCACTATTCTCACCCAA
 CN1 CTTATTTCGGATTCATTATTATACTCTTAGCCCTTACAACACTAGCACTATTCTCACCCAA
 COL2 CTTATTTCGGATTCATTATTATACTCTTAGCCCTTACAACACTAGCACTATTCTCACCCAA
 KP1 CTTATTTCGGATTCATTATTATACTCTTAGCCCTTACAACACTAGCACTATTCTCACCCAA
 CBL2 CCTATTTCGGATTTATTATTATACTATTAGCCCTTACAACACTAGCACTATTTTCACCAA
 N_notopterus CCTCCTAGGATTTATTATTATACTCCTAGCTCTAACAACCCCTAGCGCTATTTTCACCAA
 Papyrocranus CCTCCTCGGCTTCATCATTATACTGATTGCCCTTATTTCCCTAGCCCTATTCTCCCCAA
 Xenomystus CCTCCTAGGCTTTATTATTATACTCCTACCCTAATTACCCTCTCACTATTACCCCAA
 * * * * *

KB1 CCTACTAGGAGACCCAGAAAACCTCACACCCGCAAACCCATTAGTCACCCCTCCACACAT
 CLM CCTACTAGGAGACCCAGAAAACCTCACACCCGCAAACCCATTAGTCACCCCTCCACACAT
 KB2 CCTACTAGGAGACCCAGAAAACCTCACACCCGCAAACCCATTAGTCACCCCTCCACACAT
 MH1 CCTGCTAGGAGACCCAGAAAACCTCACACCCGCAAACCCACTAGTCACCCCTCCACACAT
 MH2 CCTGCTAGGAGACCCAGAAAACCTCACACCCGCAAACCCACTAGTCACCCCTCCACACAT
 Sg2 CCTGCTAGGAGACCCAGAAAACCTCACACCCGCAAACCCACTAGTCACCCCTCCACACAT
 Sg3 CCTGCTAGGAGACCCAGAAAACCTCACACCCGCAAACCCACTAGTCACCCCTCCACACAT
 SM2 CCTGCTAGGAGACCCAGAAAACCTCACACCCGCAAACCCACTAGTCACCCCTCCACACAT
 MH3 CCTGCTAGGAGACCCAGAAAACCTCACACCCGCAAACCCACTAGTCACCCCTCCACACAT
 KP3 CCTGCTAGGAGACCCAGAAAACCTCACACCCGCAAACCCACTAGTCACCCCTCCACACAT
 Sg1 CCTGCTAGGAGACCCAGAAAACCTCACACCCGCAAACCCACTAGTCACCCCTCCACACAT
 CN1 CCTGCTAGGAGACCCAGAAAACCTCACACCCGCAAACCCACTAGTCACCCCTCCACACAT
 COL2 CCTGCTAGGAGACCCAGAAAACCTCACACCCGCAAACCCACTAGTCACCCCTCCACACAT
 KP1 CCTGCTAGGAGACCCAGAAAACCTCACACCCGCAAACCCACTAGTCACCCCTCCACACAT
 CBL2 CCTACTAGGAGACCCAGAAAACCTCACGCCCAGAAATCCACTAGTCACCCCTCCACACAT
 N_notopterus CCTACTAGGAGATCCAGAAAACCTCACACCTGCAAACCCACTAGTTACCCACCCATAT
 Papyrocranus CCTGTTAGGAGACCCAGAAAACCTTACCCAGCTAACCATTAGTCACACCACCCCATAT
 Xenomystus CCTATTAGGAGACCCAGAAAACCTCACTCCCAGTAACCCCTAGTCACCCACCCACAT
 *** ***** ** *

```

KB1          CAAACCC-GAATGATACTTCCTATTT
CLM          CAAACCC-GAATGATACTTCCTATTT
KB2          CAAACCC-GAATGATACTTCCTATTT
MH1          TAAGCCC-GAATGATATTTCTATTT
MH2          TAAGCCC-GAATGATATTTCTATTT
Sg2          TAAGCCC-GAATGATATTTCTATTT
Sg3          TAAGCCC-GAATGATATTTCTATTT
SM2          TAAGCCC-GAATGATATTTCTATTT
MH3          TAAGCCC-GAATGATATTTCTATTT
KP3          TAAGCCC-GAATGATATTTCTATTT
Sg1          TAAGCCC-GAATGATATTTCTATTT
CN1          TAAGCCC-GAATGATATTTCTATTT
COL2        TAAGCCC-GAATGATATTTCTATTT
KP1          TAAGCCC-GAATGATATTTCTATTT
CBL2        CAAGCC-TGAGTGATACTTCCTATTT
N_notopterus TAAACC-AGAATGATACTTCCTATTT
Papyrocranus TAAACC-AGAATGATATTTCTATTC
Xenomystus  TAAGCC-AGAATGATACTTCCTATTT
** **  ** ***** ** *****

```

ภาพที่ 10 การเปรียบเทียบลำดับเบสบริเวณไซโทโครมบีของปลา 6 ชนิดโดยใช้โปรแกรม Clustal X มีความยาว 806 คู่เบส (สีน้ำเงิน-กลุ่มปลาสะตือ สีเขียว-กลุ่มปลากลาย สีแดง-กลุ่มปลาทองลาย และสีชมพู-สิ่งมีชีวิตนอกกลุ่ม) เครื่องหมาย - (gap) แสดงการเกิดอินเซอชันหรือดีลชันของลำดับเบส

KB1 = ปลาสะตือ 1	MH3 = ปลากลายมหาสารคาม 3
KB2 = ปลาสะตือ 2	KP1 = ปลากลายปราจีนบุรี 1
CLM = ปลาสะตือ 3	KP2 = ปลากลายปราจีนบุรี 2
CN1 = ปลากลายชัยนาท	KP3 = ปลากลายปราจีนบุรี 3
Sg1 = ปลากลายศรีสะเกษ 1	COL2 = ปลากลาย 1
Sg2 = ปลากลายศรีสะเกษ 2	CBL2 = ปลาทองลาย 1
Sg3 = ปลากลายศรีสะเกษ 3	N_notopterus = ปลาฉลาด
MH1 = ปลากลายมหาสารคาม 1	Papyrocranus = ปลากลายอัฟริกา
MH2 = ปลากลายมหาสารคาม 2	Xenomystus = ปลากลายอัฟริกา

เมื่อนำลำดับเบสบริเวณไซโทโครมบีความยาว 805 คู่เบสของตัวอย่าง 18 ตัวอย่างเข้าสู่โปรแกรม Clustal X เพื่อเปรียบเทียบลำดับเบส ได้ความยาวจากการจัดเรียงลำดับเบส 806 คู่เบส โดยแต่ละตัวอย่างเกิด indel ขึ้น 1 ตำแหน่ง มีช่วงของ G+C content อยู่ระหว่าง 41%-45% และ G+C content เฉลี่ยเท่ากับ 43% (ตารางที่ 5)

เปลี่ยนผลการเปรียบเทียบลำดับเบสด้วยโปรแกรม Clustal X ให้อยู่ในรูปของ NEXUS ไฟล์ (ภาพที่ 11) และนำเข้าสู่โปรแกรม PAUP* ver.4.0b10 เพื่อสร้างไฟโลเจเนติกทรี

```

#NEXUS

begin taxa;
  dimensions ntax=18 nchar=806;
  format missing=? gap=- matchchar=. interleave datatype=dna;
  options gapmode=missing;
  matrix

KB1          CCCAATCGCAAAAATTATCAACGACACATTAATTGACCTACCCGCCCCGA
KB2          CCCAATCGCAAAAATTATCAACGACACATTAATTGACCTACCCGCCCCGA
CLM          CCCAATCGCAAAAATTATCAACGACACATTAATTGACCTACCCGCCCCGA
CN1          CCCAATCGCAAAAATTGTTAACGACGCATTAATTGACCTGCCCGCTCCAG
Sg1          CCCAATCGCAAAAATTGTTAACGACGCATTAATTGACCTACCCGCTCCAG
Sg2          CCCAATCGCAAAAATTGTTAACGACGCATTAATTGACCTACCCGCTCCAG
KP3          CCCAATCGCAAAAATTGTTAACGACGCATTAATTGACCTACCCGCTCCAG
MH3          CCCAATCGCAAAAATTGTTAACGACGCATTAATTGACCTACCCGCTCCAG
MH1          CCCAATCGCAAAAATTGTTAACGACGCATTAATTGACCTACCCGCTCCAG
MH2          CCCAATCGCAAAAATTGTTAACGACGCATTAATTGACCTACCCGCTCCAG
Sg3          CCCAATCGCAAAAATTGTTAACGACGCATTAATTGACCTACCCGCTCCAG
COSM2       CCCAATCGCAAAAATTGTTAACGACGCATTAATTGACCTACCCGCTCCAG
KP1          CCCAATCGCAAAAATTGTTAACGACGCATTAATTGACCTACCCGCTCCAG
COL2        CCCAATCGCAAAAATTGTTAACGACGCATTAATTGACCTGCCCGCTCCAG
CBL2        CCCCATCGCAAAAATTGTTAACGACGCACTAATCAACCTACCAGCCCCAG
N_notopterus  CCCAATTGCAAAAATTATTAACGACGCACTCATTGACCTCCCTGCCCCAG
Papyrocranus  CCCAATCGCAAAAATTGTTAACGACGCCCTCATTGACCTCCCAACCCCC
Xenomystus   CCCAATTGCAAAAATTGTTAATGACGCCCTCATCGACCTCCCTACTCCAG
;
end;

```

ภาพที่ 11 ตัวอย่างรูปแบบ NEXUS ไฟล์ที่ใช้ในการวิเคราะห์และสร้างไฟโลเจเนติกทรี

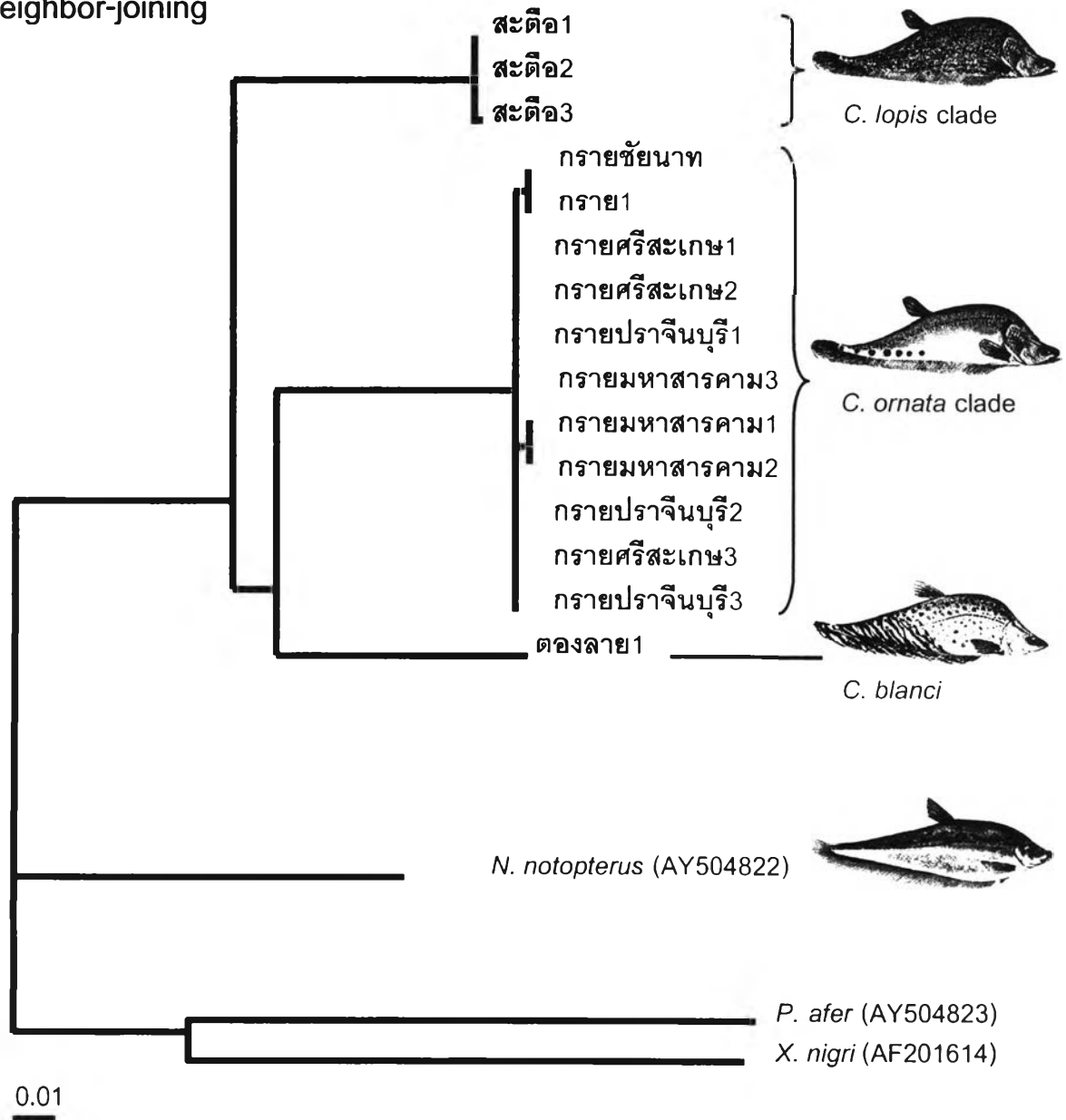
การหาค่าความแตกต่างทางพันธุกรรม โดยใช้โปรแกรม PAUP* ver.4.0b10 (ตารางที่ 6 ภาคผนวก ข) พบว่า ค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมเมื่อพิจารณาในสิ่งมีชีวิตนอกกลุ่มอยู่ระหว่าง 0%-11.4% และเมื่อรวมสิ่งมีชีวิตนอกกลุ่มเข้าไปพิจารณาจะได้ค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมอยู่ระหว่าง 13.1%-20.4% (ตารางที่ 5)

ดังตารางที่ 6 (ภาคผนวก ข) ในปลาชนิดเดียวกัน ซึ่งเก็บตัวอย่างจากแหล่งที่มาเดียวกัน จะให้ค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมน้อยเช่น ในกลุ่มปลาตะตือ (หมายเลข 1-3) มีความแตกต่างทางพันธุกรรมเพียง 0.12% ในขณะที่กลุ่มปลากลาย (หมายเลข 4-14) อาจไม่พบความแตกต่างทางพันธุกรรม (0%) หรือมีความแตกต่างทางพันธุกรรมเพียง 0.12%-0.37% และหากเปรียบเทียบในปลาต่างชนิดกัน ค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมจะสูงมากกว่า 10% (10.35%-20.4%) แต่เมื่อนำสิ่งมีชีวิตนอกกลุ่มเปรียบเทียบกับสิ่งมีชีวิตในกลุ่ม *N. notopterus* ให้ค่าความแตกต่างทางพันธุกรรม 13.1%-13.8% ซึ่งน้อยกว่าค่าของ *P. afer* และ *X. nigri* ที่ให้ค่าความแตกต่างทางพันธุกรรม 18.9%-20.4%

นำค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมที่ได้มาสร้างเป็นไฟโลเจเนติกทรีโดยใช้วิธี neighbor-joining (NJ) จากไฟโลเจเนติกทรีที่ได้พบว่า ปลาในกลุ่มปลาตะตือ (สีน้ำเงิน) ได้แยกออกมาจากกลุ่มของปลากลาย (สีเขียว) และปลาตองลาย (สีแดง) อย่างชัดเจน แต่ภายในปลาชนิดเดียวกัน เช่น ในปลากลายพบความแตกต่างทางพันธุกรรมใกล้เคียงกันมาก แม้ว่าจะได้ตัวอย่างปลาจากหลายพื้นที่ก็ตาม (ภาพที่ 12)

เพื่อให้ได้ไฟโลเจเนติกทรีที่สามารถบอกถึงระดับความสัมพันธ์และมีความถูกต้องแม่นยำขึ้น จึงนำข้อมูลของลำดับเบสทั้ง 18 ตัวอย่างรวมทั้งสิ่งมีชีวิตนอกกลุ่มทั้งสามชนิดที่อยู่ในรูปของ NEXUS ไฟล์ มาเข้าโปรแกรม PAUP* ver.4.0b10 อีกครั้งและใช้วิธี maximum parsimony (MP) ในการวิเคราะห์

Neighbor-joining



ภาพที่ 12 ไฟโลเจเนติกทรีจากวิธี neighbor-joining โดยใช้โปรแกรม PAUP* ของปลาสกุล *Chitala* 3 ชนิด อาศัยลำดับเบสไซโทโครมบีและใช้ *P. afer*, *X. nigri* และ *N. notopterus* เป็นสิ่งมีชีวิตนอกกลุ่ม

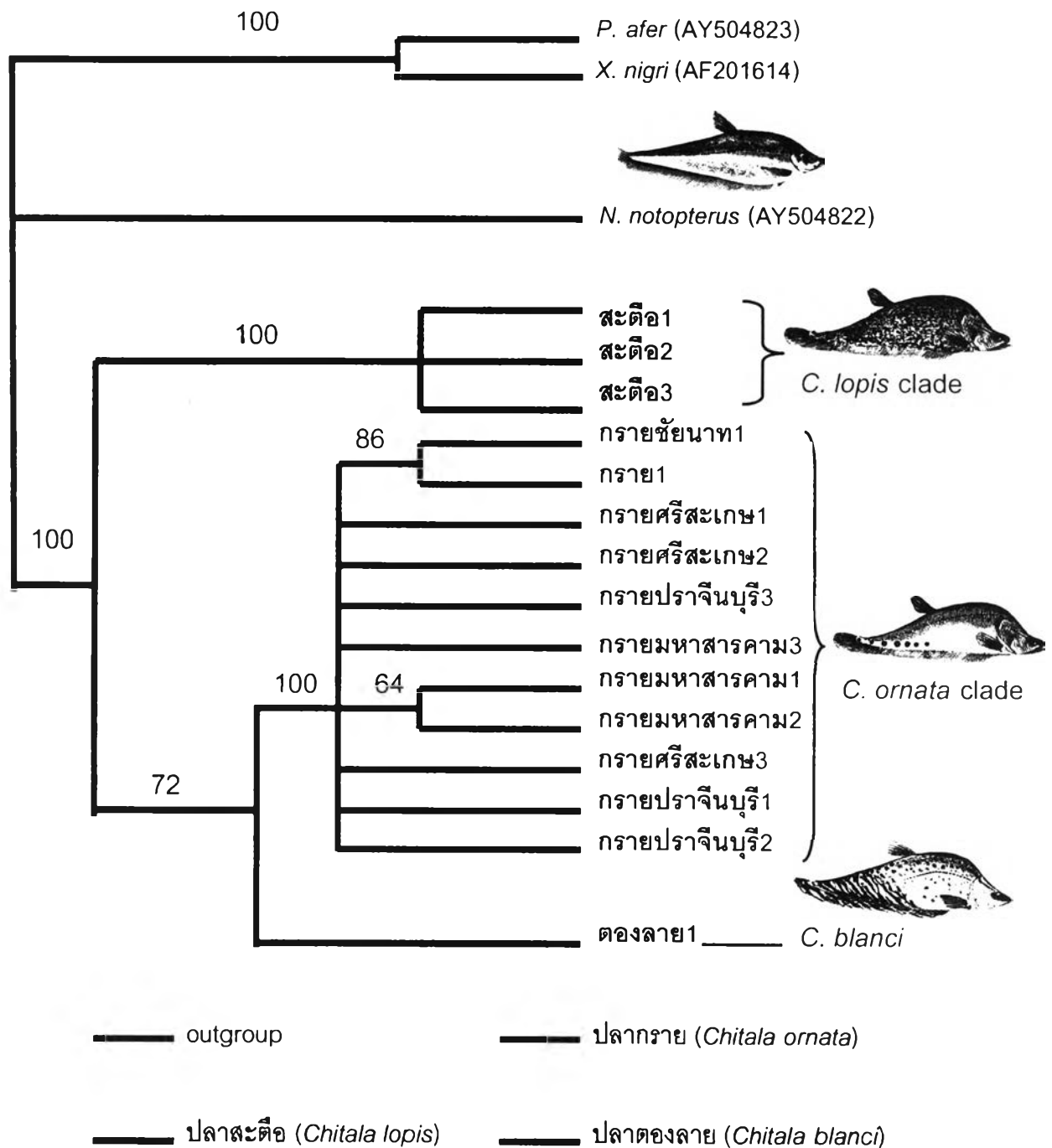
จากข้อมูลลำดับเบสในรูปแบบ NEXUS ไฟล์ของบริเวณไซโทโครมบี 18 ตัวอย่าง นำมาสร้างไฟโลเจเนติกทรีโดยใช้หลักการวิเคราะห์แบบ maximum parsimony และหาไฟโลเจเนติกทรีที่ดีที่สุดโดยการหาแบบ branch and bound จากลำดับเบสบริเวณไซโทโครมบี 806 คู่เบส มีลักษณะที่คงที่ (constant characters) 536 (66.5%) คู่เบส และมีลักษณะที่นำไปใช้ในการวิเคราะห์หาไฟโลเจเนติกทรีได้ (ซินแนปพอมอฟี) และไม่ได้ (ออแทพพอมอฟี) (parsimony-informative and uninformative) 168 (20.8%) และ 102 (12.7%) คู่เบส ตามลำดับ (ตารางที่ 5)

จากการวิเคราะห์ พบว่าได้ไฟโลเจเนติกส์ที่มีจำนวนการเปลี่ยนแปลงน้อยที่สุด 413 ขึ้นจำนวน 1 ต้น (ภาพที่ 13) ค่า consistency index (CI) เท่ากับ 0.7918 ค่า homoplasy index (HI) เท่ากับ 0.2082 และค่า retention index (RI) เท่ากับ 0.8041 จากผลการทดลอง แสดงให้เห็นว่าปลาสะตือ (สีน้ำเงิน) ปลากทราย (สีเขียว) และปลาตองลาย (สีแดง) แยกออกจากกันอย่างชัดเจน โดยปลากทรายจะมีความใกล้ชิดกับปลาตองลายมากกว่าปลาสะตือ จากนั้นหาค่าบูทสเตรปโดยใช้ค่าการสุ่ม 1000 ครั้ง ได้ผลการทดลองดังภาพที่ 13 ในกลุ่มของปลาสะตือ (สีน้ำเงิน) และปลากทราย (สีเขียว) มีความเชื่อมั่นถึง 100% ในขณะที่ค่าความเชื่อมั่นระหว่างกลุ่มปลากทราย (สีเขียว) และกลุ่มปลาตองลาย มีค่าเท่ากับ 72% ซึ่งอยู่ในช่วงค่าที่ยอมรับได้ และเมื่อวิเคราะห์ระหว่างกลุ่มปลาสะตือและกลุ่มปลากทราย-ตองลาย ได้ค่าความเชื่อมั่นถึง 100% จึงยอมรับว่ากิ่งก้านของไฟโลเจเนติกส์ต้นนี้มีความน่าเชื่อถือ

ตารางที่ 5 ลักษณะลำดับเบสบริเวณไซโทโครมบีบางส่วนของปลาสกุล *Chitala* 3 ชนิดและสิ่งมีชีวิตนอกกลุ่มรวม 18 ตัวอย่าง

Sequence characteristics	The partial region of Cytochrome <i>b</i>
	805
Length (ingroup) (bp)	805
Length (outgroup) (bp)	806
Aligned length (bp)	41-45
G+C content range (%)	43
G+C content mean (%)	0-11.4
Sequence divergence range (ingroup) (%)	13.1-20.4
Sequence divergence range (total) (%)	2
Number of indels (total)	1
Size of indels (total) (bp)	536 (66.5)
Number of constant sites (%)	270 (33.5)
Number of variable sites (%)	168 (20.8)
Number of informative sites (%)	102 (12.7)
Number of autapomorphic sites (%)	149
Number of unambiguous transitions	86
Number of unambiguous transversions	1.73
Transition/transversion ratio (ts/tv ratio)	

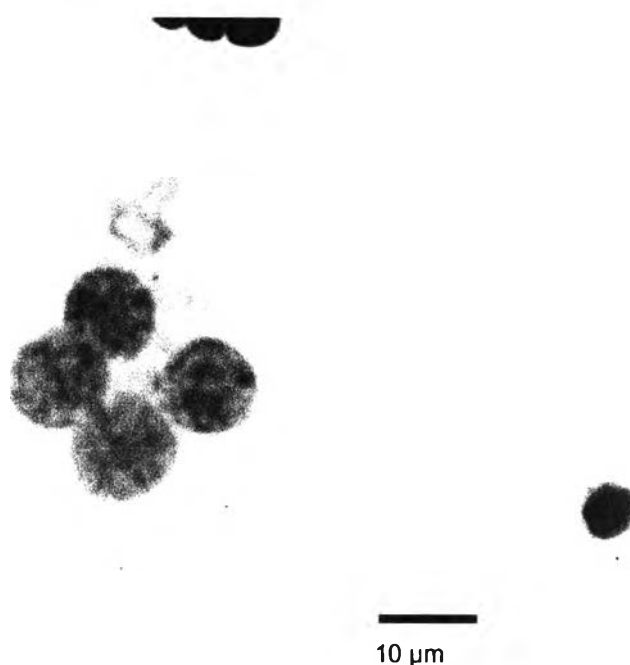
Maximum parsimony



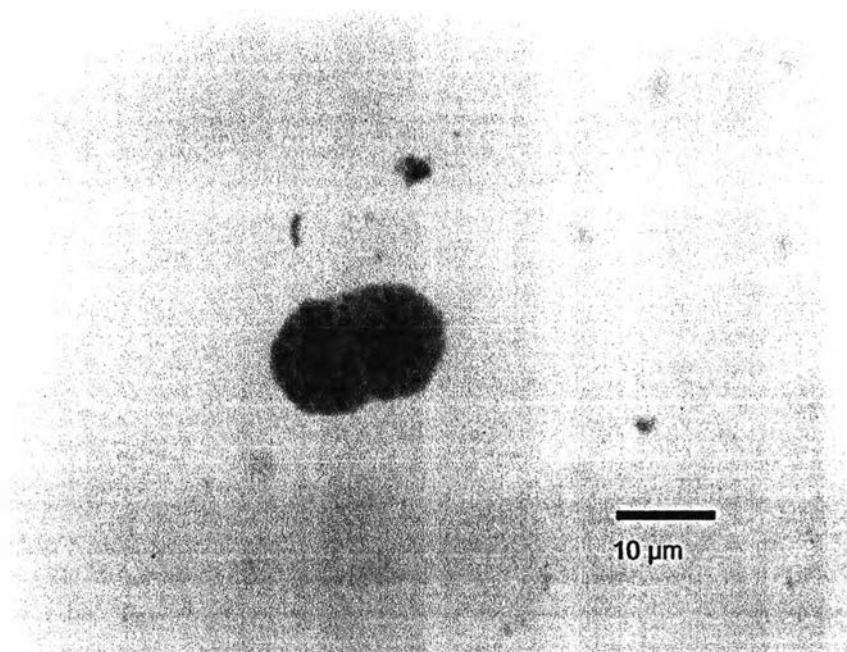
ภาพที่ 13 ไฟโลเจเนติกทรีจากวิธี maximum parsimony และค่าบูทสเตรป (%) โดยใช้โปรแกรม PAUP* ver.4.0b10 ของปลาสกุล *Chitala* 3 ชนิด อาศัยลำดับเบสไซโทโครมบี และกำหนดให้ *P. afer*, *X. nigri* และ *N. notopterus* เป็นสิ่งมีชีวิตนอกกลุ่ม

5.3 ผลการทดลองด้านเซลล์พันธุศาสตร์

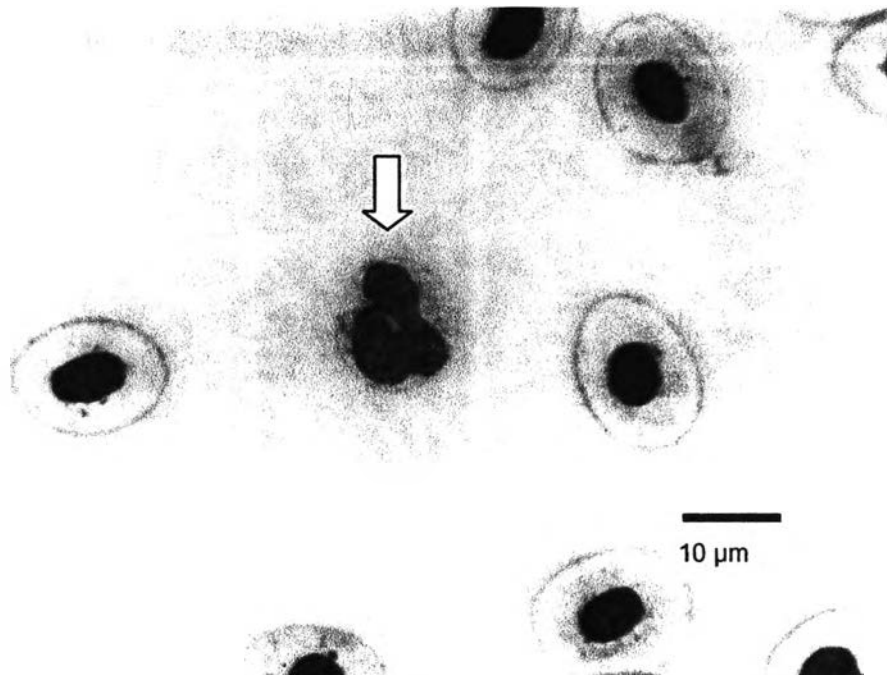
จากวิธีที่ 1 ซึ่งเป็นวิธีเจาะเลือดจากปลา แล้วนำมาเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาว โดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 (GIBCO) เพื่อเตรียมโครโมโซม ได้มีการศึกษาสภาพที่เหมาะสมต่อการแบ่งเซลล์ของปลา เช่นการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิเพื่อให้เกิดความเหมาะสมในการแบ่งเซลล์ของปลาแต่ละชนิด โดยเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในช่วงระหว่าง 22-37°C หรือแม้กระทั่งความเข้มข้นของไฟโทอีมีแอกกลูตินิน ตั้งแต่ 5-15% และ Fetal Bovine Serum ตั้งแต่ 15-30% ก็ยังไม่พบการแบ่งตัวของเซลล์ที่ทำให้เห็นโครโมโซม ซึ่งเป็นไปได้ว่า เทคนิคที่ใช้ยังไม่เหมาะสมกับการเพาะเลี้ยงเซลล์ของปลาในสกุลนี้ เนื่องจากผลการเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ได้ทดลองมานั้น ส่วนมากเกิดการตกตะกอนของเซลล์ การเกาะเป็นก้อนของเม็ดเลือดแดง และเกิดการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย โดยสามารถสังเกตได้จากลักษณะสีของอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์จากสีแดงจะเปลี่ยนเป็นสีแดงคล้ำ ชุ่น มีชั้นของแบคทีเรียลอยอยู่บริเวณผิวหน้าอาหาร ในบางกรณีพบแต่เม็ดเลือดแดงหรือพบเม็ดเลือดขาวแต่ไม่มีการแบ่งตัว และเมื่อเริ่มทดลองซ้ำอีกครั้งที่สภาวะเดิม ผลการทดลองที่ได้ก็ไม่ประสบความสำเร็จ นอกจากนี้ผู้ทดลองได้ทำการเปลี่ยนอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวแล้วเช่นกันคือ medium199 (GIBCO) และ DMEM (GIBCO) ซึ่งผลการทดลองที่ได้ไม่แตกต่างจากการใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด RPMI 1640 (ภาพที่ 14-20)



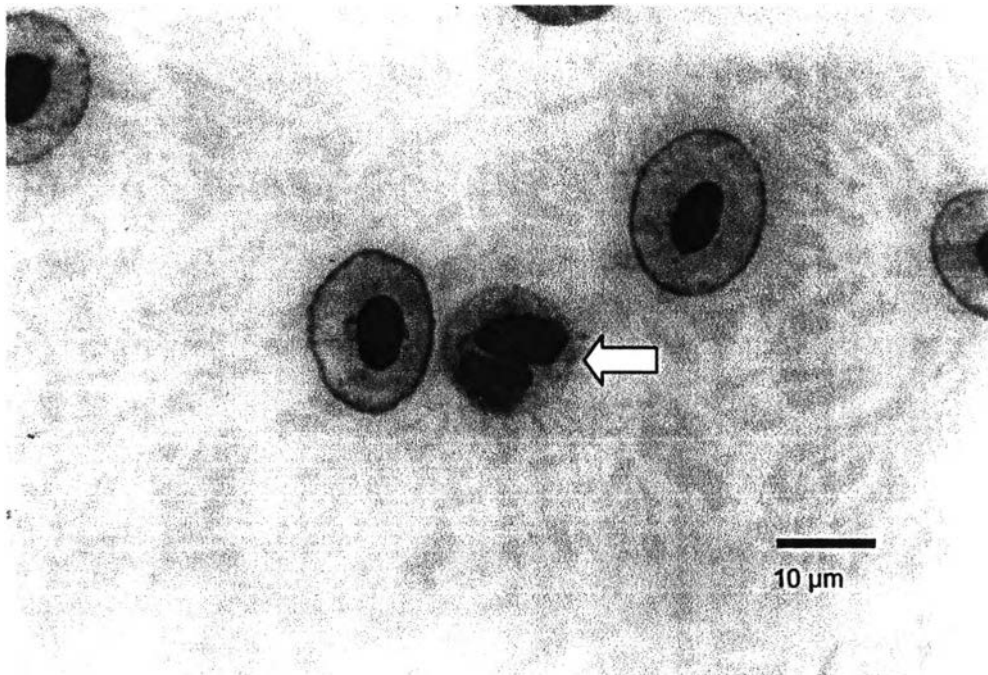
ภาพที่ 14 ลักษณะเม็ดเลือดขาวที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์โดยใช้อาหาร RPMI 1640 (GIBCO BRL, U.S.A.) 5% PHA 20% FBS ที่อุณหภูมิ 32°C ย้อมด้วยสีย้อม Giemsa



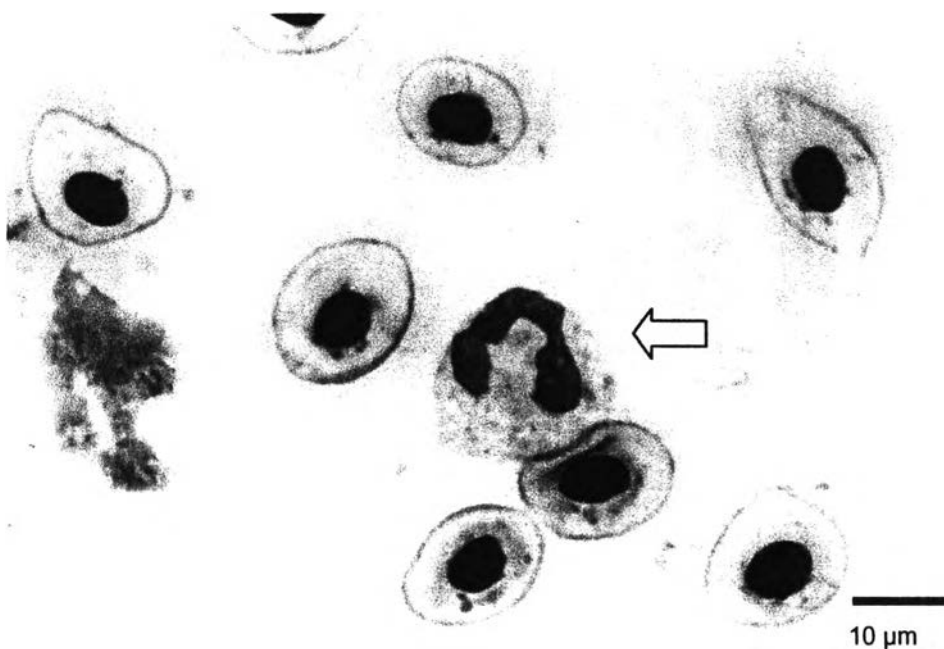
ภาพที่ 15 ลักษณะเม็ดเลือดขาวอีกหนึ่งลักษณะที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์โดยใช้อาหาร RPMI 1640 5% PHA 20% FBS ที่อุณหภูมิ 32°C ย้อมด้วยสีย้อม Giemsa



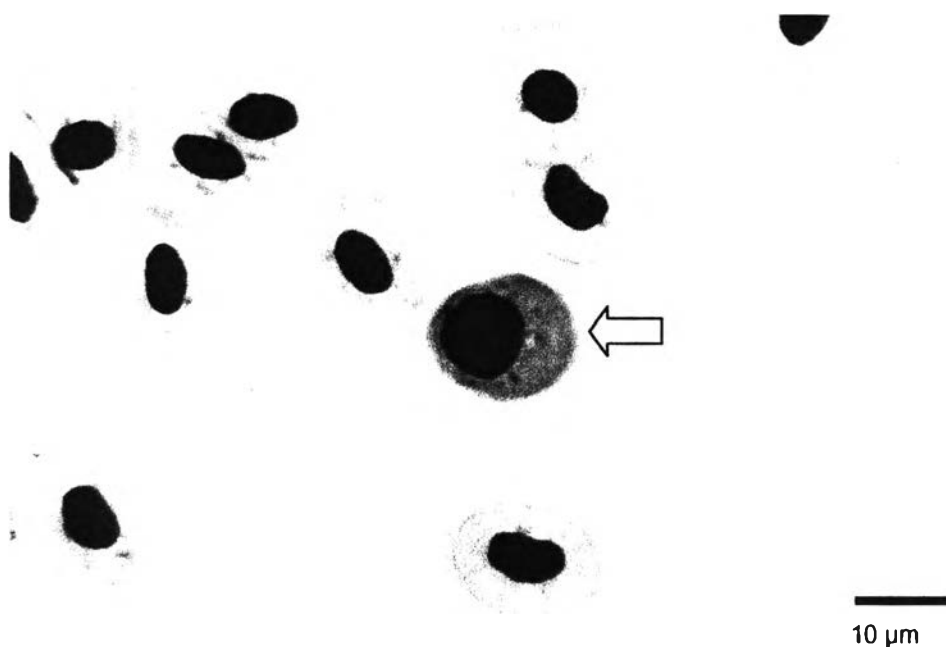
ภาพที่ 16 ลักษณะเม็ดเลือดขาวชนิด neutrophil (ลูกศรชี้) และเม็ดเลือดแดงที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์โดยใช้อาหาร Medium 199 (GIBCO BRL, U.S.A.) 5% PHA 20% FBS ที่อุณหภูมิ 30°C ย้อมด้วยสีย้อม Giemsa



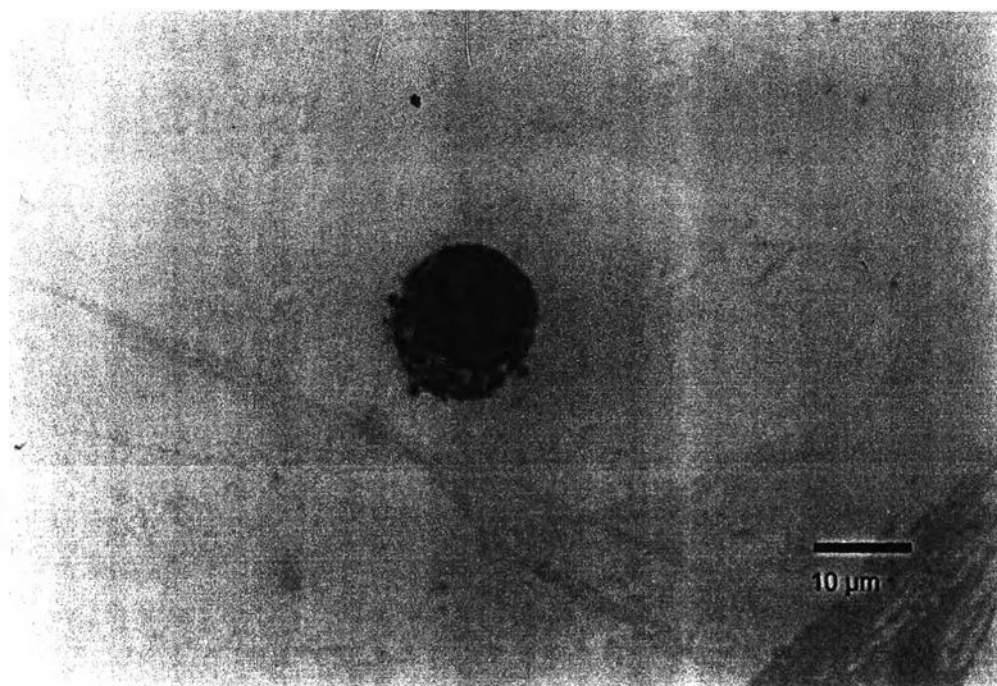
ภาพที่ 17 ลักษณะเม็ดเลือดขาวชนิด neutrophil (ลูกครี) และเม็ดเลือดแดงที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์โดยใช้อาหาร Medium 199 5% PHA 20% FBS ที่อุณหภูมิ 30°C ย้อมด้วยสีย้อม Giemsa



ภาพที่ 18 ลักษณะเม็ดเลือดขาวชนิด neutrophil (ลูกครี) และเม็ดเลือดแดงที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์โดยใช้อาหาร Medium 199 5% PHA 20% FBS ที่อุณหภูมิ 30°C ย้อมด้วยสีย้อม Giemsa



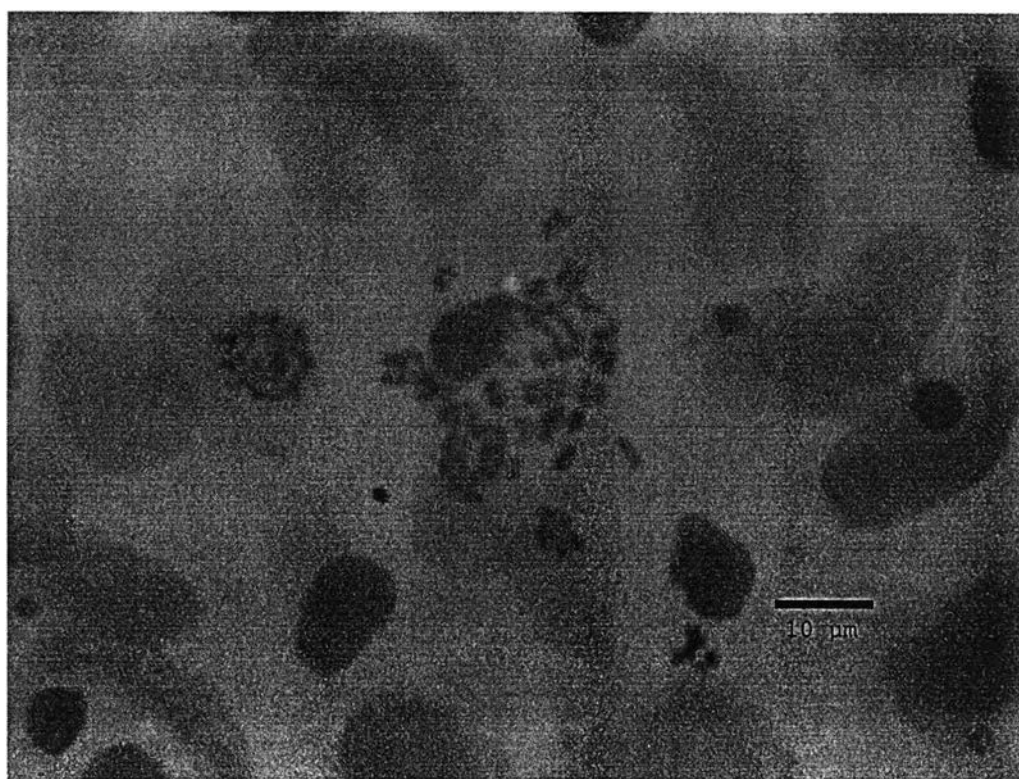
ภาพที่ 19 ลักษณะเม็ดเลือดขาวชนิด monocyte (ลูกครี) และเม็ดเลือดแดงที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์โดยใช้อาหาร Medium 199 5% PHA 20% FBS ที่อุณหภูมิ 30°C ย้อมด้วยสีย้อม Giemsa



ภาพที่ 20 ลักษณะเม็ดเลือดขาวชนิด Basophil ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์โดยใช้อาหาร Medium 199 5% PHA 20% FBS ที่อุณหภูมิ 30°C ย้อมด้วยสีย้อม Giemsa

วิธีที่ 2 คือการตัดครีบบางมาศึกษาโครโมโซมโดยวิธีกดให้แบน พบว่า เป็นวิธีที่เหมาะสมและสะดวก อีกทั้งในการปฏิบัติทดลองใช้เวลาน้อย เมื่อเทียบกับการเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวคือประมาณ 1 วันเท่านั้น ในการทดลองครั้งนี้ ได้ทดลองในปลากทราย และปลาตองลาย แต่เห็นเพียงโครโมโซมของปลากทรายเท่านั้น

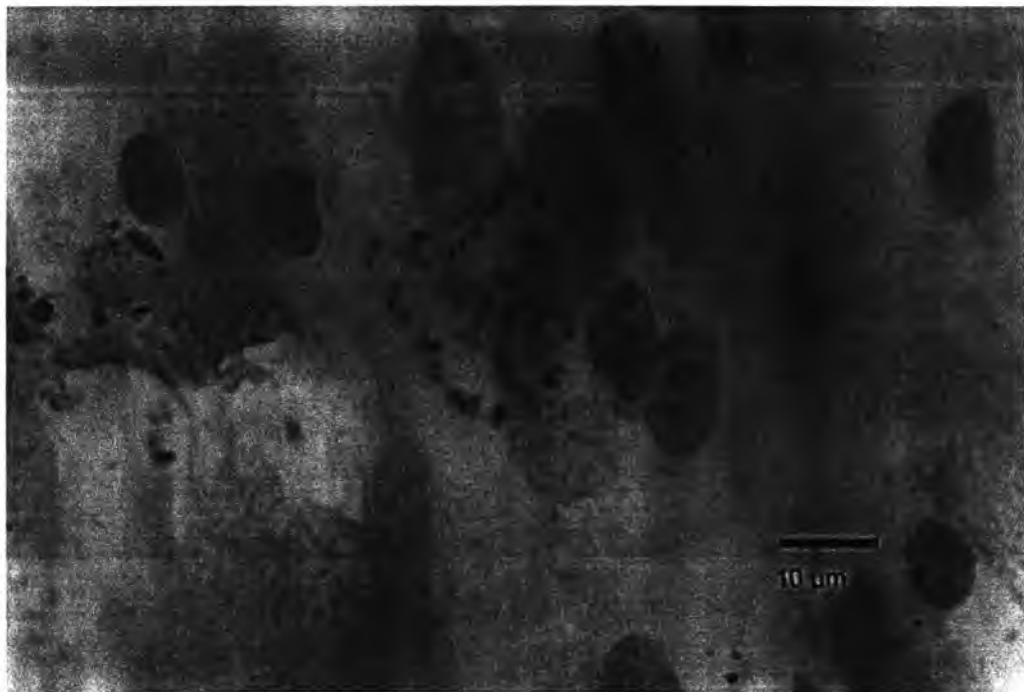
การศึกษาจำนวนและรูปร่างของโครโมโซมโดยวิธีกดให้แบนโดยใช้ครีบบางนั้น พบว่าเป็นวิธีที่เหมาะสมกับปลาในประเทศไทย และไม่ทำให้ปลาเสียชีวิต เหมาะสมกับปลาที่หายาก นอกจากนี้ ส่วนหางบริเวณที่ถูกตัดจะสามารถงอกใหม่ภายในเวลา 2-3 วัน และสามารถตัดหางบริเวณนั้นมาศึกษาโครโมโซมต่อไปได้ จากการศึกษาโครโมโซมปลากทรายที่เตรียมได้จากการนำครีบบางมากดให้แบนในจำนวนการทดลองทั้งหมด 5 ครั้ง แต่แต่ละครั้งได้จำนวนสไลด์ 3-4 สไลด์ ได้เซลล์ที่เห็นระยะเมทาเฟสประมาณ 20 เซลล์ แต่ส่วนมากจะกระจายไม่ดี หรือโครโมโซมหลุดสิ้นเกินไป จากการทดลองครั้งที่ดีที่สุดพบว่าจำนวนโครโมโซมของปลากทรายมีจำนวนประมาณ $2n = 42$ แต่ไม่สามารถนำมาจัดคาริโอไทป์ได้ เนื่องจากโครโมโซมที่ได้มีขนาดเล็ก และยังไม่กระจายดีเท่าที่ควร นอกจากนี้จำนวนเซลล์ที่อยู่ในระยะเมทาเฟสที่พบในการทดลองมีไม่มากพอ (ภาพที่ 21-28)



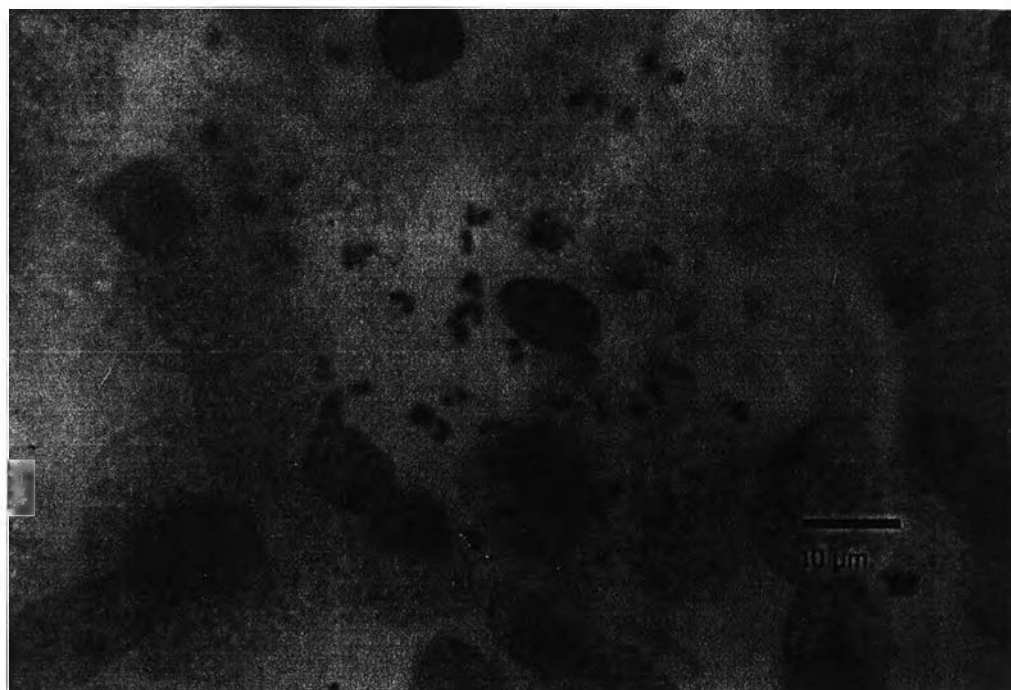
ภาพที่ 21 ผลการตรวจหาระยะเมทาเฟสโดยวิธีกดให้แบนโดยใช้ครีบบางของปลากทราย *C. ornata* ย้อมด้วยสีย้อมอะซิโต-ออซัน มีจำนวนโครโมโซมประมาณ $2n = 42$



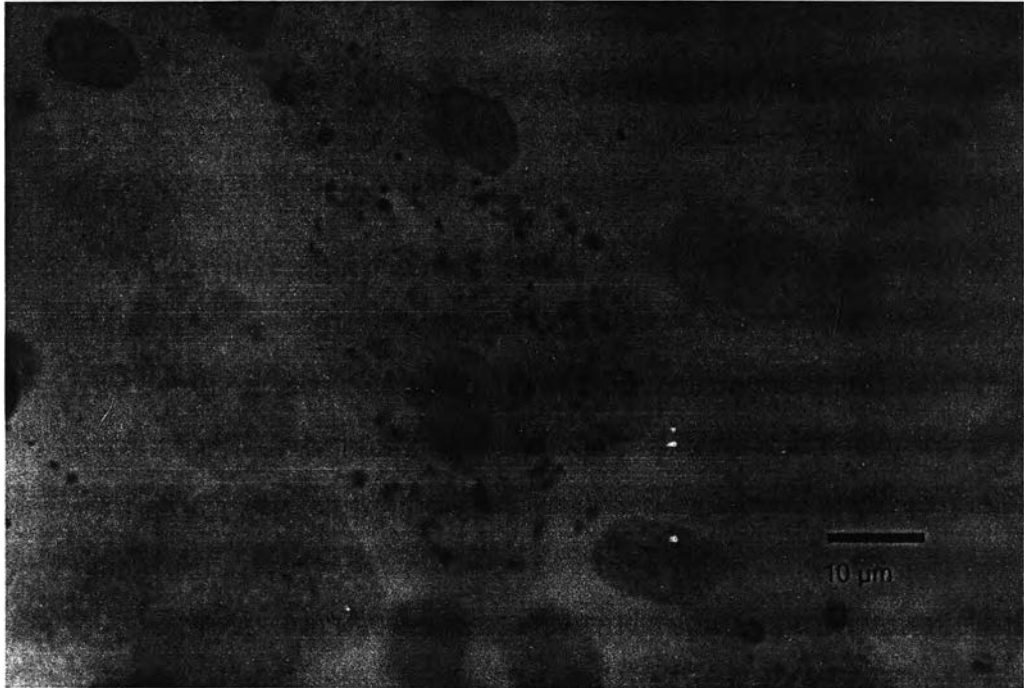
ภาพที่ 22-23 ผลการตรวจหาระยะเมทาเฟสโดยวิธีกดให้แบนโดยใช้ครีบทางของปลาทราย
C. ornata ย้อมด้วยสีย้อมอะซิโต-ออซัน



ภาพที่ 24-25 ผลการตรวจหาระยะเมทาเฟสโดยวิธีกดให้แบนโดยใช้ครีบน้ำของปลาทราย
C. ornata ย้อมด้วยสีย้อมอะซิโต-ออซัน



ภาพที่ 26-27 ผลการตรวจหาระยะเมทาเฟสโดยวิธีกดให้แบนโดยใช้ครีบหางของปลาทราย
C. ornata ย้อมด้วยสีย้อมอะซิโต-ออซัน



ภาพที่ 28 ผลการตรวจหาระยะเมทาเฟสโดยวิธีกดให้แบนโดยใช้ครีบบางของปลากทราย *C. omata* ย้อมด้วยสีย้อมอะซิโต-ออซัน