รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

เกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน และคณะ. 2547. การศึกษาเบื้องต้นลักษณะโครโมโซมจากเซลล์เม็ดเลือดขาวของปลาบึก. **วารสารการประมง** 57(4): 349-351.

จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์. 2521. การเจาะเลือดปลา. **เวชชสารสัตวแพทย์** 8(3): 109-114.

จรัลธาดา กรรณสูต และ พนม กระจ่างพจน์ สอดสุข. 2541. ลักษณะและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของปลาในวงศ์ปลาสลาดที่พบในประเทศไทย. **เอกสารวิชาการฉบับที่ 1/2541 สถาบันพิพิธภัณฑ์สัตว์น้ำ และ สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำ กรมประมง**. 33หน้า.

เจษฎา เด่นดวงบริพันธ์. 2545. **ระบบวิทยาและวงศ์วานวิวัฒนาการ** (Systematics and Phylogeny) **เปิดโลกทัศน์ใหม่ทางชีววิทยา**. กรุงเทพมหานคร: ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. (อัดสำเนา)

ชวลิต วิทยานนท์. 2538. ปลาน้ำจืดที่หายากและใกล้สูญพันธุ์ของไทย. **ข่าวกรมประมง** 19(6): 12-14.

เชษฐ์วุฒิ สถิตพิมพา, ปิยะ อภิรติกุล และชาญณรงค์ มิตรมูลพิทักษ์. 2530. **การศึกษาจำนวนและรูปร่างโครโมโซมของปลาน้ำจืดไทย 4 ชนิด**. โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ดวงสมร สุวัฑฒน, วีระพงษ์ โกยกุล และ วิวัฒน์ ชวนะนิกุล. 2544. การศึกษาโครโมโซมในโคที่มีท่อปัสสาวะผิดปกติแต่กำเนิด. **เวชชสารสัตวแพทย์** 31(2): 42-49.

ธวัช ดอนสกุล. รองศาสตราจารย์. สนทนา, 20 เมษายน 2549.

ธวัช ดอนสกุล และ วิเชียร มากตุ่น. 2532. การศึกษาโครโมโซมของปลากราย ปลาตองลาย และปลาสลาดที่พบในประเทศไทย. **การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 28 รายงานผลการวิจัยสาขาสัตว์ สัตวแพทย์ และประมง**. หน้า 459-466.

ประมงเศรษฐกิจ. 2536. ประมงผสมผสาน ไรแดง ปลาแรด ปลากราย อาชีพทำเงินเกษตรกรสามชุก. **ประมงเศรษฐกิจ** 2(21): 39-42.

พนม กระจ่างพจน์ สอดสุข, ศิริรัตน์ สอดสุข และ เฉลิมชัย สุวรรณรักษ์. 2543. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาในกลุ่มสลาด-กรายของไทย. **เอกสารวิชาการฉบับที่ 26/2543 สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำ กรมประมง**. 23 หน้า.

ไพราษฎร์ สุขสุเมฆ. 2544. **การใช้ตำแหน่งครีบท้อง** (Pelvic fin) **และครีบอก** (Pectoral fin) **เพื่อตรวจสอบระดับวิวัฒนาการของปลากระดูกแข็งในอันดับ** (Order) **ต่างๆที่พบในประเทศไทย**. โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาณุ เทวรัตน์มณีกุล. 2512. การทดลองเพาะเลี้ยงปลากราย. **รายงานประจำปี 2512 สถานีประมงจังหวัดเชียงราย กองบำรุงพันธุ์สัตว์น้ำ กรมประมง**. หน้า 66-80.

ยุพิน วิวัฒนชัยเศรษฐ์. 2537. ปลาตองลาย. **กสิกร** 67(1): 31

วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล. รองศาสตราจารย์ ดร. สนทนา, 9 มกราคม 2548.

วีณา วิลาสเดชานนท์. 2520. **แคริโอไทพ์ของแคทฟิชน้ำจืดบางชนิด**. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ศิราวุธ กลิ่นบุหงา. 2544. Phylogenetics **และความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต**. ใน วสันต์ จันทราทิตย์ และวีระพงศ์ ลุลิตานนท์, Bioinformatics **ชีวสารสนเทศศาสตร์**, หน้า 149-171. กรุงเทพมหานคร: สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ.

ศุภรินทร์ จิรสุขประเสริฐ. 2544. **การใช้สัดส่วนระหว่างกระดูกพรีแมกซิลลา** (Premaxilla) **และกระดูกแมกซิลลา** (Maxilla) **เพื่อตรวจสอบระดับวิวัฒนาการของปลากระดูกแข็งในอันดับต่าง ๆที่พบในประเทศไทย**. โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สมโภชน์ อัคคะวิวัฒน์ และ จรินทร์ จรกรรณ. 2535. ชีวประวัติบางประการของปลากราย. **เอกสารวิชาการฉบับที่** 40/2536. กองประมงน้ำจืด: กรมประมง. 33 หน้า.

สัตว์น้ำ. 2532. เผยโฉมนักเพาะเลี้ยงปลากรายมือฉมังแห่งราชบุรี. **สัตว์น้ำ** 6(66): 29-34.

สันทนา ดวงสวัสดิ์ และคณะ. 2533. อุปนิสัยของการกินอาหารปลาบางชนิดในอ่างเก็บน้ำเขื่อนกระเสียว จ.สุพรรณบุรี. **เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 115**. สถาบันประมงน้ำจืดแห่งชาติ, กรุงเทพฯ. 15 หน้า.

สืบสิน สนธิรัตน์, สุภาพ มงคลประสิทธิ์ และ ประจิตร วงศ์รัตน์. 2514. การศึกษาชนิดของปลาสลาดและปลากรายที่พบในไทย. **วารสารการประมง** 24: 383-391.

อนุสสรณ์ มีวรรณ, เดชา รอดระรัง และสมพิศ พรรณนา. 2538. การเพาะพันธุ์ปลากราย. **ประมงเศรษฐกิจ** 3(35): 40-43.

อัจฉริยา รังษิรุจิ. 2549. **เอกสารประกอบการสอน วิชา ชว 402: วิวัฒนาการ**. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร. 209 หน้า.

อุทัยรัตน์ ณ นคร. 2543. **พันธุศาสตร์สัตว์น้ำ**. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 203 หน้า.

<u>ภาษาอังกฤษ</u>

Akihito *et al.* 2000. Evolutionary aspects of gobioid fishes based upon a phylogenetic analysis of mitochondrial cytochrome *b* genes. **Gene** 259(2000): 5-15.

Allen, S.K. *et al.* 1986. Cytological evaluation of the likelihood that triploid grass carp will reproduce. **Tran. Am. Fish. Soc.** 115: 841-848.

Al-Sabti, K. 1985. Chromosomal studies by blood leukocyte culture technique on three salmonids from Yugoslavian waters. **Journal of Fish Biology** 26: 5-12.

Alves-Gomes, Jose' A. 1999. Systematic biology of Gymnotiform and Mormyriform electric fishes: Phylogenetic relationships, Molecular clocks and rates of evolution in the mitochondrial rRNA genes. **The Journal of Experimental Biology** 202: 1167-1183.

Araya, A. *et al.* 1984. Cloning, physical mapping and genome organization of mitochondrial DNA from *Cyprinus carpio* oocytes. **Mol. Gen. Genet.** 196: 43-52.

Bain, J.R. and S.R. Humphrey. 1980. **A profile of the endangered species of Thailand.** Report No. 4. Office of Ecological Services. Florida State Museum. University of Florida. 105 pp.

Bernardi, G. 1997. Molecular Phylogeny of the Fundulidae (Teleostei, Cyprinodontiformes) Based on the Cytochrome *b* Gene. In T. D. Kocher, and C. A. Stepien (eds.), **Molecular Systematics of Fishes,** pp. 189-197. California: Academic Press.

Blaxhall, P. C. 1975. Fish chromosome technique: a review of selected literature. **Journal of Fish Biology** 7: 315-320.

Blaxhall, P. C. 1985. Chromosome Karyotyping of Fish Using Conventional and G-Banding Methods. **Journal of Fish Biology** 22: 417-424.

Blaxhall, P.C. and K.W. Daisley. 1973. Routine heamatological methods for use with fish blood. **Journal of Fish Biology** 5(1973): 771-781.

Bond, C.E. 1996. **Biology of Fishes.** New York: saunders college. 750 pp.

Boore, J.L. 1999. Survey and summary animal mitochondrial genomes. **Nucleic acid research** 27: 1767-1780.

Bower, N., J.R. Struffer and T.D. Kocher. 1994. Intra- and interspesific mitochondrial DNA sequence variation within two species of Rock-dwelling Cichlids (Teleostei: Cichlidae) from Lake Malawi, Africa. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 3(1): 75-82.

Brioley, J. *et al.* 1998. Molecular phylogeny of Cyprinidae inferred from cytochrome *b* DNA sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 9(1): 100-108.

Brito, R. M. *et al.* 1997. Phylogenetic Relationships within Genus *Leuciscus* (Pisces, Cyprinidae) in Portuguese Fresh Waters, Based on Mitochondrial DNA Cytochrome *b*

Sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 8(3): 435-442.

Brown, J.R., A.T. Beckenbach and M.J. Smith. 1993. Intraspecific DNA sequence variation of the mitochondrial control region of White Sturgeon (*Acipenser transmontanus*). **Molecular Biology and Evolution** 10(2): 326-341.

Brown, W.M., M. George, Jr., and A. C. Wilson. 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. **PNAS.U.S.** 76:1967-1971.

Burridge, C.P. 1999. Molecular Phylogeny of *Nemadactylus* and *Acantholatis* (Perciformes: Cirrhitoidea), with implications for taxonomy and biogeography. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 13(1): 93-109.

Calton, M. S., and T.E. Denton. 1974. Chromosome of the Chocolate gourami: A cytogenetic anomaly. **Science** 185: 618-619.

Casey, S.P. et al. 2004. The origin and evolution of seahorses (genus *Hippocampus*): a phylogenetic study using the cytochrome *b* gene of mitochondrial DNA. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 30: 261-272.

Cherfas, N.B. 1966. Natural triploidy in the female of the unisexual variety of the silver crucian carp (*C. auratus gibelio* Bloch). *cited after* Kirpichnikov, V.S. 1981. **Genetic bases of fish selection**. New York: Springer-Verlag. 410 pp.

Chernenko, E.V. 1968. The karyotype of the dwarf and anadromous sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) [Walb.] from the lake Dalneye (Kamchatka). *cited after* Kirpichnikov, V.S. 1981. **Genetic bases of fish selection**. New York: Springer-Verlag. 410 pp.

Chernenko, E.V. 1971. The chromosomal complement of the sockeye salmon. *cited after* Kirpichnikov, V.S. 1981. **Genetic bases of fish selection**. New York: Springer-Verlag. 410 pp.

Chomyn, A., *et al.* 1985. Six unidentified reading frames of human mitochondrial DNA encode components of the respiratory chain NADH dehydrogenase. **Nature** 314: 592-597.

Chow, S. 1993. PCR-RFLP analysis on thirteen western Atlantic snappers (subfamily Lutjaninae): a simple method for species and stock identification. **Fishery Bullertin** 91: 619-627.

Chow, S. and S. Inogue. 1993. Intra- and interspecific restriction fragment length

polymorphism in mitochondrial genes of *Thunnus* tuna species. **Bulletin of the National Research Institute of Far Seas Fishery** 30: 207-224.

Dahle, G. 1991. Cod, *Godus morhua*, populations identified by mitochondrial DNA. **Journal of Fish Biology** 38: 295-303.

Delarbre, C. *et al.* 1998. The complete nucleotide sequence of the mitochondrial DNA of the dogfish, *Scyliorhinus canicula*. **Genetics** 150: 331-344.

Denton, T. E. 1973. **Fish Chromosome Methodology**. Illinois: Charle C. Thomas Publisher. 166pp.

Drewry, G. 1964. Appendix I, Chromosome number. **Tex. Meml. Mus. Bull** 8: 5-72.

Durand, J.-D. *et al.* 2002. Phylogeny and bio geography of the family Cyprinidae in the middle east inferred from cytochrome b DNA evolutionary Significance of this region. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 22(1): 91-100.

Fukuoka, H. 1972. Chromosome number variation in the rainbow trout *Salmo gairdneri irideus* (Gibbon). **Jap. J. Genet.** 47: 455-458.

Gold, J.R. and G.A.E. Gall. 1975. Chromosome cytology and polymorphism in the California High Sierra golden trout (*Salmo aquabonita*). **Can. J. Genet. Cytol.** 17: 41-54.

Grammeltvedt, A.-F. 1975. Chromosome of Salmon (*Salmo salar*) by Leukocyte Culture. **Aquaculture** 5(1975): 205-209.

Hartley, S.E. and M.T. Horne. 1983. A method for obtaining mitotic figures from blood leucocyte cultures of rainbow trout, *Salmo gairdneri*. **Journal of Fish Biology** 22:77-82.

Hartwell, L.H. *et al.* 2000. **Genetics From Gene to Genome**. New York: McGraw-Hill. 820pp.

Heckman, J. Robert and Paul E. Brubaker. 1970. Chromosome Preparation from Fish Blood Leukocytes. **The Progressive Fish-Culturist** 32(4): 206-208.

King, D.P.F. *et al.* 1993. Mitochondrial DNA variation in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., populations. **Journal of Fish Biology** 42: 25-33.

Kirpichnikov, V.S. 1981. **Genetics base of fish selection**. New York: Springer-Verlag. 410 pp.

Klontz G.W. and L.S. Smith. Fish as biological research subject. In W.I. Gay (ed.), **Methods of Animal Experimentation**, pp. 345-358. New York: Academic Press.

Kocher, T. D., *et al.* 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification

and sequencing with conserved primers. **Proceedings of National Academic of Science USA** 86: 6196-6200.

Kumazawa, Y., and Nishida M.. 2000. Molecular Phylogeny of Osteoglossoids: A New Model for Gondwanian Origin and Plate Tectonic Transportation of the Asian Arowana. **Molecular Biology and Evolution** 17(12): 1869-1878.

Levan, A., K., Fredga and A.A. Sandberg. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosome. **Hereditas** 52: 201.

Lewis, R. 2003. **Human Genetics.** 6th ed. New York: McGraw-Hill. 454pp.

Mayer, L.J., and Roberts F.L. 1969. Chromosomal homogeneity of five populations of alewife, *Alosa pseudoharengus*. **Copeia** 2: 313.

McCarthy, C. 2001. **Chromas Version 2.13**[online]. Available from: http://www.mb.mahidol.ac.th/pub/chromas/chromas.htm [2002,January,18]

Meyer, A. 1993. Evolution of mitochondrial DNA in fishes, p.1-38. *In*: **Biochemistry and molecular biology of fishes, vol. 2**: Molecular biology frontiers, P.W. Hochachka and T.P. Mommsen (eds.). Amsterdam: Elsevier.

Moorehead, P.S. *et al.* 1960. Chromosome preparation of leucocytes cultured from human peripheral blood. **Exptl. Cell. Res.** 20: 613-616.

Nass, M.M.K. 1966. The circularity of mitochondrial DNA. **Proceedings of National Academic of Science USA** 56: 1215-1222.

Nass, M.M.K., S. Nass and B.A. Afzelius. 1965. The general occurrence of mitochondrial DNA. **Exp. Cell Res.** 37: 516-539.

Nelson, J.S. 1994. **Fishes of the World**. 3rd Edition. New York: John Wiley and Son. 600pp.

Nowell, P. 1960. Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. **Cancer Research** 20: 462-466.

Patarnello, T. *et al.* 1994. Cytochrome *b* and 16S rRNA sequence variation in the *Salmo trutta* (Salmonidae, Teleostei) species complex. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 3(1): 69-74.

Peng, Z. *et al.* 2004. Phylogenetic reletionships of glyptosternoid fishes (Siluriformes: Sisoridae) inferred from mitochondrial cytochrome *b* gene sequence. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 31: 979-987.

Perdom, C.E. 1983. Genetic engineering by the manipulation of chromosome. **Aquaculture**

33: 287-300.

Ramirez, S.A. 1980. A modified technique for fish karyotype analysis using scale epithelium. **Copeia** 1980(3): 543-545.

Reed, D.L., M.J. deGravelle and K.E. Carpenter. 2001. Molecular systematics of *Selene* (Perciformes: Carangidae) based on cytochrome *b* sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 21(3): 468-475.

Robert, F.L. 1964. A chromosome study of twenty species of Centrachidae. **J. Morphol.** 115: 401-417.

Roberts, T. R. 1992. Systematic revision of the Old World freshwater fish family Notopteridae. **Ichthyol. Explor. Freshwater** 2: 361-383.

Sambrook, J.,F.F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. **Molecular Cloning: A laboratory manual.** 2nd ed. New York: Cold Spring Habor Laboratory Press.

Sick, K. *et al.* 1962. Heamoglobin pattern and chromosome number of American, European and Japanese eels. **Nature, Lond.** 193: 1001-1002.

Smith, H. M. 1933. Contributions to the ichthyology of Siam. VII. The featherback fish *Notopterus Chitala* in Siam, With notes on its egg-laying and young. **Journal Siam Society, Natural History Supplement** 9: 245-258.

Song, C.B., T.J. Near and L.M. Page. 1998. Phylogenetic relations among Percid fish as inferred from mitochondrial Cytochrome *b* DNA sequence data. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 10(3): 343-353.

Stepien, C.A. and T.D. Kocher. 1997. Molecular and morphology in studies of fish evolution. In T.D. Kocher and C.A. Stepien, **Molecular Systematics of Fishes**, pp. 1-11. New York: Academic Press.

Swofford, D.L. 1998. **PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony (* and other methods)**[computer program]. Vertion 4. Sunderland: Sinauer Associated.

Thomson,J and T. Gibson. 2003. CluatalX Multiple Sequence Alignment Program[online]. version 1.83. Available from: http://bioinformatics.ubc.ca/resources/tools/?name=clustalx [2004,June,25]

Thorgaad, G.H. and G.A.E. Gall. 1979. Adult triploids in a rainbow trout family. **Genetics** 93:961-973.

Tsigenopoulos, C.S. *et al.* 2002. Multiple origin of polyploidy in the phylogeny of southern

African barbs (Cyprinidae) as inferred from mtDNA markers. **Heredity** 88: 466-473.

Visoottiviseth, P. and N. Chanwanna. 2001. Application of cell from hybrid catfish (*Clarias gariepinus X Clarias macrocephalus*) in screening toxicity of chemicals. **ScienceAsia** 27(2001): 75-81.

Wiley, E.O., and Hagen, R. H. 1997. Mitochondrial DNA sequence variation among the sand darters (Percidae: Teleostei). In T. D. Kocher, and C. A. Stepien (eds.), **Molecular Systematics of Fishes**, pp. 75-96. California: Academic Press.

Whitemore, D.H. *et al.* 1994. The largemouth bass cytochrome *b* gene. **Journal of Fish Biology** 44: 637-645.

Wolters, W.R. *et al.* 1981. Lymphocyte culture for chromosomal analyses of channel catfish *Ictalurus panctatus*. **Copeia** 1981(2): 503-504.

Wolters, W.R. *et al.* 1982. Erythrocyte nuclear measurements of diploid and triploid channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). **Journal of Fish Biology** 20: 253-258.

Xiao, W. *et al.* 2001. Molecular systematic of Xenocyprinae (Teleostei: Cyprinidae): Taxonomy, Biogeography, and Coevolution of a special group restricted in east asia. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 18(2): 163-173.

Zardoya, R., A. Garrido-Pertierra and J.M. Bautista. 1995. The complete nucleotide sequence of mitochondrial DNA genome of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **J. Mol. Evol.** 41: 942-951.

ภาคผนวก ก

1. **TBE (10X) 500 ml**

Tris base	54 g
Boric acid	27.5 g
0.5 M EDTA (pH 7.5 – 8.0)	20 ml

เติม d H_2O ปริมาตร 450 ml

↓

คนสารให้ละลาย

↓

เติม d H_2O ให้ครบ 500 ml

↓

ปรับ pH 8.0 ด้วย 4 M HCl

TBE (10X) ⟶ TBE (1X) อัตราส่วน 1: 9 (10X: d H_2O)

2. **LB medium and plate**

1% Tryptone

0.5% Yeast extract

1% NaCl

(Agar 15 g/L)

<u>อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง</u>

1. ละลาย Tryptone 5 g Yeast extract 2.5 g และ NaCl 5 g ใน d H_2O 400 ml
2. ปรับ pH 7.0 ด้วย NaOH
3. เติม d H_2O ให้ได้ปริมาตร 500 ml
4. เติม Agar 7.5 g
5. คนให้ละลาย
6. ใส่สารละลายในขวดขนาด 500 ml และปิดฝาขวดแบบหลวมๆ
7. นำเข้าเครื่อง Autoclave ใช้เวลา 15 – 20 นาที ที่อุณหภูมิ 121°C
8. ทิ้งไว้ให้อุณหภูมิลดลงเหลือประมาณ 55°C
9. เติม 50 µg / ml ampicillin
10. เทลงจานเพาะเชื้อ ทิ้งไว้ให้อาหารแข็ง
11. พลิกจานอาหารเพาะเชื้อและเก็บที่ 4°C ในที่มืด

<u>อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว</u>

1. ปฏิบัติตามขั้นตอนการเตรียมอาหารแข็ง โดยที่ไม่ต้องใส่ Agar
2. เตรียม LB medium 100 ml
3. เติม 50 µg / ml ampicillin
4. ผสมให้เข้ากัน
5. เก็บที่ 4°C ในที่มืด

3. X – gal stock solution (40 mg / ml)
   1. ละลาย X – gal 400 mg ใน dimethylformamide (DMF)
   2. เก็บที่ -20°C ในขวดสีชา
   3. ก่อนนำไปใช้เตรียมอาหารแข็ง ควรนำออกมาวางไว้ด้านนอกจนกระทั่งอุณหภูมิ 37°C

↓

ผสม X – gal (stock solution) 40 µl กับ sterile dH_2O 50 µl

↓

spread ลงบนอาหารแข็งอย่างรวดเร็วและเบามือ

↓

ทิ้งไว้ให้แห้งประมาณ 15 min.

↓

เก็บในถุงดำ

** เก็บไว้ที่ 4°C ได้ 2 เดือน**

4. Glucose-Tris-EDTA 100 ml

Glucose (M.W. 180.16)	0.9 g (50 mM)
EDTA (M.W. 372.20)	0.372 g (10 mM)
Tris – Cl pH 3.0	0.30 g (25 mM)

5. Tris-EDTA 100 ml

EDTA	0.0372 g (1 mM)

Tris – Cl pH 8.0	0.1211 g (10 mM)

500 ml

0.5 M EDTA	1 ml
1 M Tris – Cl pH 8.0	5 ml
d H_2O	494 ml

6. 5 M KAc

30 ml of dH_2O + 14.72 g KAc

เติม 5.75 ml Glacial acetic acid

14.25 ml d H_2O

7. 10% Sodium dodecyl sulphate

ละลาย SDS 10 g ในน้ำกลั่น 100 ml นำไปอบฆ่าเชื้อ

8. 3 M Sodium Acetate

NaAc 24.61 g เติมน้ำให้ครบ 100 ml ปรับ pH 5.2 ด้วย Glacial acetic acid

9. Lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 9.0, 100 mM EDTA, 50 mM NaCl, 2% SDS)

Tris-HCl (ปรับ pH 9.0)	6.055 g
EDTA	37.225 g
NaCl	2.922 g
SDS	20 g

เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร

10. 2 mg/ml Colchicine

1. ชั่ง Colchicine 0.02 g
2. นำมาละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 10 ml
3. เก็บไว้ในขวดทึบแสงที่อุณหภูมิ 4° C

11. 0.075 M KCl

1. ชั่ง KCl 0.5588 g
2. นำมาละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 100 ml

12. 10% Giemsa

นำ Giemsa Solution ปริมาตร 5 ml ผสมกับ Sorensen Phosphate Buffer 45 ml

วิธีเตรียม Sorensen Phosphate Buffer

Solution A 50.8 ml ผสมกับ Solution B 49.2 ml

Solution A - ชั่ง KH_2PO_4 9.1 g แล้วนำมาละลายในน้ำกลั่น 1,000 ml

Solution B - ชั่ง Na_2HPO_4 9.5 g แล้วนำมาละลายในน้ำกลั่น 1,000 ml

13. 2% Aceto- orcien

1. ละลาย สี Orcine 2 g ใน glacial acetic acid ที่ร้อน ปริมาตร 45 ml และต้มต่อให้เดือดอย่างช้าๆ ใต้เครื่องดูดอากาศ เป็นเวลา 5 นาที พร้อมกับคนไปด้วย
2. กรองในขณะที่ร้อนอยู่โดยใช้กระดาษกรอง ทิ้งไว้ให้เย็น และเก็บในตู้เย็น ก่อนนำมาใช้ ควรนำมาวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง

สำนักงานวิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

การเจาะเลือดปลา

ในการเจาะเลือดปลานั้นทำได้หลายวิธี จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์ (2521) ได้เสนอแนะไว้ดังนี้

1. **การตัดส่วนโคนหาง** โดยการตัดขวางของลำตัวขอปลาให้ขาดที่บริเวณโคนหางช่วงระหว่าง anal fin และ caudal fin การเจาะเลือดโดยวิธีนี้ใช้ในกรณีที่ปลามีขนาดเล็ก และต้องการเลือดเป็นจำนวนมาก และก่อนทำการตัดควรจะเช็ดบริเวณที่จะตัดให้สะอาดและแห้ง เพื่อป้องกันการติดเชื้อจากเมือกและน้ำ

2. **การเจาะจากหัวใจ** ตำแหน่งที่ใช้สำหรับแทงเข็มนั้นมี 2 ตำแหน่ง คือ

2.1 **การแทงเข็มจากทางด้าน** ventral ให้ปลาอยู่ในท่านอนหงาย แล้วแทงเข็มทางด้านท้องตรงกึ่งกลางระหว่าง anterior base ของ pectoral fin

2.2 **การแทงเข็มจากทางด้านหน้าของ** pectoral girdle ให้ปลาอยู่ในท่านอนตะแคง เปิดเหงือก และดันเหงือกอันสุดท้ายไปทางด้านหัว แล้วแทงเข็มทางด้านล่างประมาณ 1/3 ของ pectoral girdle เข้าหาหัวใจ

การเจาะเลือดจากหัวใจนิยมทำในปลาที่มีขนาดใหญ่ ไม่ทำให้ปลาเสียชีวิต สามารถทำได้ทั้งในปลาที่วางยาสลบและไม่วางยาสลบ การเจาะเลือดโดยวิธีนี้ควรระวังการติดเชื้อที่บริเวณเหงือก

3. **การเจาะเลือดจากเส้นเลือดแดงใหญ่** ให้ปลาอยู่ในท่านอนหงายหรือนอนตะแคง แทงเข็มที่บริเวณส่วนกลางระหว่าง posterior base ของ anal fin และ anterior base ของ caudle fin ใกล้กับ lateral line ค่อยๆ แทงเข็มลงไปจนกระทั่งถึงกระดูกสันหลัง ซึ่งเส้นเลือดจะอยู่ใกล้กับบริเวณนี้

การเจาะเลือดโดยวิธีนี้เป็นวิธีที่ดีและสะอาด ไม่ทำให้ปลาเสียชีวิต

หลักในการวิเคราะห์ชนิด (Key to species) (สืบสิน สนธิรัตน์, สุภาพ มงคลประสิทธิ์ และประจิตร วงศ์รัตน์, 2514)

1. ก. เกล็ดบน opercles มีขนาดใหญ่กว่าเกล็ดบนลำตัว บน preopercle มีแถวของเกล็ดอยู่ 8-10 แถว มีหนามแหลม 28-33 คู่ เรียงไปในแนวยาวตรงกลางของด้านท้อง ไม่มีจุดสีดำหรือลายขีดเฉียงอยู่ด้านบนของครีบก้น กระดูก maxillary จรดขอบด้านหลังของลูกตา..... *Notopterus notopterus*

   ข. เกล็ดบน opercles และเกล็ดบนลำตัวมีขนาดเท่ากัน บน preopercle มีแถวของเกล็ดอยู่ 12-13 แถว มีหนามแหลม 37-45 คู่ เรียงไปในแนวยาวตรงกลางของด้านท้อง มีจุดสีดำหรือลายขีดเฉียงอยู่ด้านบนของครีบก้น.....2

2. ก. กระดูก maxillary ยาวถึงด้านหลังลูกตา บน preopercle มีแถวของเกล็ดอยู่ 20-23 แถว...3

   ข. กระดูก maxillary จรดขอบด้านหลังของลูกตาหรือเลยออกไปเล็กน้อย บน preopercle มีแถวของเกล็ดอยู่ 12-16 แถว มีจุดสีน้ำตาลเล็กกระจายไปตามด้านข้างลำตัวและครีบก้น ..... *Chitala lopis*

3. ก. มีจุดกลมสีดำขนาดใหญ่ 5-10 จุด เหนือครีบก้น บน preopercle มีแถวของเกล็ดอยู่ 20-23 แถว.....*Chitala ornata*

   ข. มีลายขีดเฉียงๆ 12-13 แถบ ด้านข้างลำตัวและครีบก้น บน preopercle มีแถวของเกล็ดอยู่ 23 แถว.....*Chitala blanci*

คำศัพท์ที่เกี่ยวข้องกับสิ่งมีชีวิตและลักษณะที่ใช้ในการศึกษาแบบคลาดิสติกส์ (อัจฉริยา รังษิรุจิ, 2549) (ภาพที่ 29)

สิ่งมีชีวิตในกลุ่ม (ingroup)

สิ่งมีชีวิตที่ต้องการศึกษา เช่น สิ่งมีชีวิตสปีชีส์ A, B, C

สิ่งมีชีวิตนอกกลุ่ม (outgroup)

สิ่งมีชีวิตที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับสิ่งมีชีวิตในกลุ่ม หรือเป็นกลุ่มใกล้เคียง (sister group) มีความสำคัญในการใช้เป็นจุดอ้างอิงเพื่อเปรียบเทียบลักษณะที่พบในสิ่งมีชีวิตในกลุ่มกับสิ่งมีชีวิตนอกกลุ่ม และประเมินว่าลักษณะใดเป็นลักษณะของบรรพบุรุษหรือลักษณะที่โบราณกว่า (primitive character) โดยทั่วไปลักษณะที่พบในสิ่งมีชีวิตนอกกลุ่ม จะถือว่าเป็นลักษณะที่โบราณกว่า เช่น สิ่งมีชีวิตสปีชีส์ O

ซินแนปพอมอร์ฟี (synapomorphy)

มาจากคำว่า syn ซึ่งหมายถึงร่วมกัน และ apomorphy ซึ่งหมายถึงลักษณะที่พัฒนาแล้ว ดังนั้น ซินแนปพอมอร์ฟี จึงหมายถึงลักษณะร่วมที่พัฒนาแล้ว (derived character) ซึ่งมีความสำคัญในการจัดจำแนกสิ่งมีชีวิตในเชิงวิวัฒนาการ เช่น ลักษณะที่พัฒนาแล้ว และพบร่วมกันในสิ่งมีชีวิตแต่ละสปีชีส์ เช่น ลักษณะ C1เป็นลักษณะร่วมที่พัฒนาแล้วของสปีชีส์ A, B และ C ลักษณะ C2เป็นลักษณะร่วมที่พัฒนาแล้วของสปีชีส์ B และ C

ซิมพลีซิโอมอร์ฟี (symplesiomorphy)

มาจากคำว่า sym ซึ่งหมายถึงร่วมกัน และ plesiomorphy หมายถึงลักษณะที่โบราณ ดังนั้น ซิมพลีซิโอมอร์ฟี จึงหมายถึงลักษณะที่โบราณและพบร่วมกันในสิ่งมีชีวิตในกลุ่ม แต่ลักษณะโบราณเหล่านี้ไม่ควรนำมาใช้ในการจัดจำแนกสิ่งมีชีวิตเชิงวิวัฒนาการ เช่น ลักษณะ C3 เป็นลักษณะร่วมที่ยังไม่ได้พัฒนาของสปีชีส์ A และ B

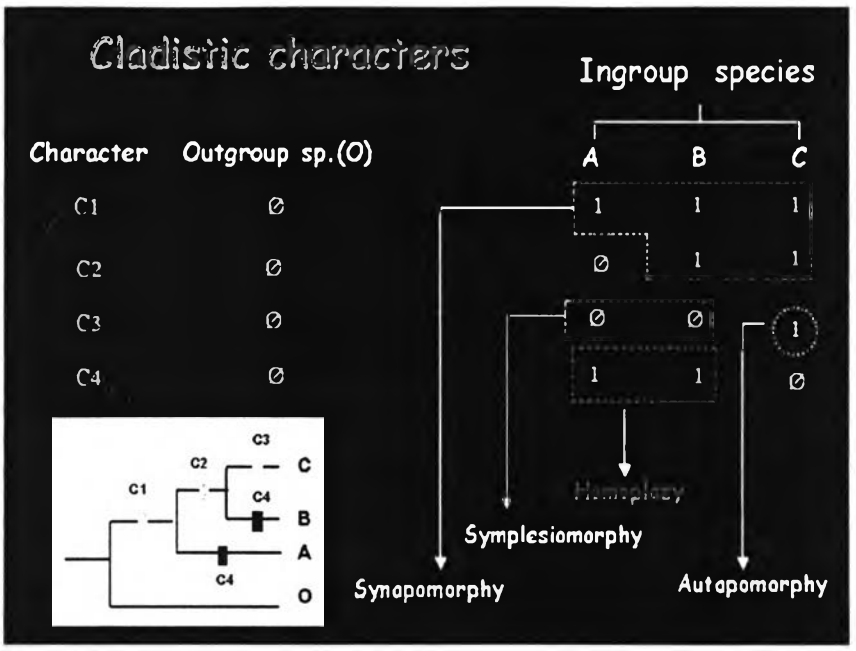
ออแทปพอมอร์ฟี (autapomorphy)

ลักษณะที่พัฒนาแล้ว และพบเฉพาะในสิ่งมีชีวิตสปีชีส์ใดสปีชีส์หนึ่งในสิ่งมีชีวิตในกลุ่ม เนื่องจากดังกล่าวนี้ไม่พบร่วมกันในสิ่งมีชีวิตในกลุ่มอื่นๆ ดังนั้นจึงไม่สามารถนำมาใช้ในการจัดจำแนกสิ่งมีชีวิตเชิงวิวัฒนาการได้ เช่น ลักษณะ C3 เป็นลักษณะที่พัฒนาแล้ว และพบในสปีชีส์ C เท่านั้น

ฮอโมเพลซี (homoplasy)

ลักษณะที่เหมือนกัน แต่เกิดขึ้นอย่างเป็นอิสระ ไม่ได้มีจุดกำเนิดเดียวกันหรือไม่มีบรรพบุรุษร่วมสุดท้ายด้วยกัน อาจเกิดจากวิวัฒนาการแบบขนาน (parallel evolution) วิวัฒนาการแบบลู่เข้า (convergent evolution) หรือการผันกลับ (reversal) โดยทั่วไปฮอโมเพลซี

อาจทำให้เกิดความสับสนว่าเป็นซินแนปพอมอร์ฟี จึงทำให้ผลการวิเคราะห์ทางคลาดิสติกส์ผิดพลาดได้ เช่น ลักษณะ C4 เป็นลักษณะร่วมที่พัฒนาแล้ว อาจเกิดจากวิวัฒนาการแบบขนาน วิวัฒนาการแบบลู่เข้า หรือการผันกลับ



ภาพที่ 29 อธิบายคำศัพท์เฉพาะที่เกี่ยวข้องกับสิ่งมีชีวิตและลักษณะที่ใช้ในการศึกษาคลาดิสติกส์ (อัจฉริยา รังษิรุจิ, 2549)

Uncorrected ("p") distance matrix

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1 KB1	-									
2 KB2	0.00000	-								
3 CLM	0.00124	0.00124	-							
4 CN1	0.10932	0.10932	0.11056	-						
5 Sg1	0.10683	0.10683	0.10807	0.00248	-					
6 Sg2	0.10683	0.10683	0.10807	0.00248	0.00000	-				
7 KP3	0.10683	0.10683	0.10807	0.00248	0.00000	0.00000	-			
8 MH3	0.10683	0.10683	0.10807	0.00248	0.00000	0.00000	0.00000	-		
9 MH1	0.10807	0.10807	0.10932	0.00373	0.00124	0.00124	0.00124	0.00124	-	
10 MH2	0.10807	0.10807	0.10932	0.00373	0.00124	0.00124	0.00124	0.00124	0.00000	-
11 Sg3	0.10683	0.10683	0.10807	0.00248	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00124	0.00124
12 COSM2	0.10683	0.10683	0.10807	0.00248	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00124	0.00124
13 KP1	0.10703	0.10703	0.10827	0.00248	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00124	0.00124
14 COL2	0.10932	0.10932	0.11056	0.00000	0.00248	0.00248	0.00248	0.00248	0.00373	0.00373
15 CBL2	0.11329	0.11329	0.11453	0.10706	0.10458	0.10458	0.10458	0.10458	0.10582	0.10582
16 N notopterus	0.13066	0.13066	0.13191	0.13808	0.13684	0.13684	0.13684	0.13684	0.13808	0.13808
17 Papyrocranus	0.19680	0.19680	0.19805	0.19172	0.19047	0.19047	0.19047	0.19047	0.19172	0.19172
18 Xenomystus	0.19653	0.19653	0.19777	0.19152	0.19028	0.19028	0.19028	0.19028	0.19153	0.19153

Uncorrected ("p") distance matrix (continued)

	11	12	13	14	15	16	17	18
11 Sg3	-							
12 COSM2	0.00000	-						
13 KP1	0.00000	0.00000	-					
14 COL2	0.00248	0.00248	0.00248	-				
15 CBL2	0.10458	0.10458	0.10350	0.10706	-			
16 N notopterus	0.13684	0.13684	0.13584	0.13808	0.13540	-		
17 Papyrocranus	0.19047	0.19047	0.19078	0.19172	0.20400	0.17783	-	
18 Xenomystus	0.19028	0.19028	0.19060	0.19152	0.18882	0.18137	0.17915	-

ตารางที่ 6 ค่าความห่างทางพันธุกรรม (genetics distance) ของปลากราย ปลาตองลาย และปลาสะตือ รวม15 ตัวอย่าง (1-15) และสิ่งมีชีวิตนอกกลุ่ม (16-18) โดยใช้โปรแกรม PAUP* ver.4.0b10

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวเวอร์จีเนีย เฉลิมชัยกิจ เกิดเมื่อวันที่ 30 ตุลาคม พุทธศักราช 2523 ที่รัฐเวอร์จีเนีย ประเทศสหรัฐอเมริกา จบการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนปลายที่โรงเรียนสายน้ำผึ้ง กรุงเทพมหานครในปีพุทธศักราช 2540 จบการศึกษาระดับปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต (ชีววิทยา) จากภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร ในปีพุทธศักราช 2544 และได้เป็นนิสิตระดับปริญญาโทในสาขาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และได้รับทุนการศึกษาต่อระดับปริญญาโท-เอก ในประเทศ โครงการพัฒนาอาจารย์ สาขาขาดแคลน ทบวงมหาวิทยาลัย