



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ พันธุศาสตร์เซลล์ระดับโมเลกุลของปลาสงงาม
ชนิดพันธุ์หายากจากลุ่มน้ำโขงในประเทศไทย

โดย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วีระยุทธ สุภิวงค์
มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ธันวาคม 2562

(ทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่)

สัญญาเลขที่ MRG6080020

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ พันธุศาสตร์เซลล์ระดับโมเลกุลของปลาชวยงาม
ชนิดพันธุ์หายากจากลุ่มน้ำโขงในประเทศไทย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วีระยุทธ สุภิวงค์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและ
มหาวิทยาลัยขอนแก่น

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย
สกว.และต้นสังกัดไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

รูปแบบ Abstract (บทคัดย่อ)

Project Code : MRG6080020

(รหัสโครงการ)

Project Title : พันธุศาสตร์เซลล์ระดับโมเลกุลของปลาสงฆามชนิดพันธุ์หายากจากลุ่มน้ำโขงในประเทศไทย

(ชื่อโครงการ)

Investigator : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วีระยุทธ สุภังค์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
(ชื่อนักวิจัย)

E-mail Address : supiwong@hotmail.com; weersu@kku.ac.th

Project Period : 4 เมษายน 2560 ถึงวันที่ 3 ตุลาคม 2562

(ระยะเวลาโครงการ)

การศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ระดับโมเลกุลของปลาสงฆามชนิดพันธุ์หายากจากลุ่มน้ำโขงในประเทศไทยจำนวน 8 ชนิด ได้แก่ ปลาแกดแดง ปลาเสือข้างลาย ปลาปากเปลี่ยน ปลาปีกไก่หนวดยาว ปลาเค้าดำ ปลาแค้ว ปลาตุ้มซี่ และปลาแรดแม่น้ำโขง มีวัตถุประสงค์ คือ เพื่อศึกษาจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ ($2n$) จำนวนโครโมโซมพื้นฐาน (NF) รูปร่าง ขนาด และโครโมโซมเครื่องหมายจากการย้อมแถบสีแบบนอร์ (Ag-NOR banding marker chromosome) จัดแคโรไทป์ สร้างอิดิโอแกรมมาตรฐาน และสูตรแคโรไทป์ รวมทั้งเปรียบเทียบข้อมูลดังกล่าว และวิเคราะห์รูปแบบการกระจายตัวของไมโครแซทเทลไลต์บนโครโมโซมภายหลังการศึกษาด้วยเทคนิค FISH การดำเนินงานคือเก็บตัวอย่างปลาทั้ง 8 ชนิด เตรียมโครโมโซม ย้อมสีโครโมโซม ถ่ายภาพ จัดแคโรไทป์ สร้างอิดิโอแกรมมาตรฐาน และศึกษาด้วยเทคนิค FISH ทำการวิเคราะห์รูปแบบสัญญาณของโพรบ ไรโบโซมอล 18S ไมโครแซทเทลไลต์ d(CA)₁₅, d(GC)₁₅, และ d(CAT)₁₀ บนโครโมโซมในปลาที่ศึกษา ผลการศึกษาพบว่าปลา 8 ชนิด ได้แก่ ปลาแกดแดง ปลาเสือข้างลาย ปลาปากเปลี่ยน ปลาปีกไก่หนวดยาว ปลาเค้าดำ ปลาแค้ว ปลาตุ้มซี่ และปลาแรดแม่น้ำโขง มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 50, 50, 50, 60, 56, 56, 48 และ 48 ตามลำดับ จำนวนโครโมโซมพื้นฐานเท่ากับ 84, 94, 66, 100, 100, 88, 88 และ 48 ตามลำดับ สูตรแคโรไทป์ในปลาทั้ง 8 ชนิดมีดังนี้ ปลาแกดแดงคือ $2n$ (diploid) $50 = L^m_2 + L^{sm}_6 + L^a_6 + M^{sm}_{12} + M^{sm}_2 + M^a_6 + M^t_{16}$ ปลาเสือข้างลายคือ $2n$ (diploid) $50 = L^m_6 + L^{sm}_{22} + L^a_4 + M^{sm}_2 + M^a_6 + S^a_4 + S^t_6$ ปลาปากเปลี่ยนคือ $2n$ (diploid) $50 = L^m_4 + L^{sm}_8 + L^t_2 + M^{sm}_4 + M^t_{30} + S^t_2$ ปลาปีกไก่หนวดยาวคือ $2n$ (diploid) $60 = L^m_8 + L^{sm}_8 + L^a_6 + M^{sm}_4 + M^{sm}_6 + M^a_8 + M^t_{10} + S^t_{10}$ ปลาเค้าดำคือ $2n$ (diploid) $56 = L^m_8 + M^{sm}_{10} + L^{sm}_8 + M^{sm}_{12} + M^a_6 + S^t_{12}$ ปลาแค้วคือ $2n$ (diploid) $56 = L^m_{10} + L^{sm}_6 + L^a_2 + L^t_2 + M^{sm}_8 + M^{sm}_4 + M^a_2 + M^t_{16} + S^t_6$ ปลาตุ้มซี่คือ $2n$ (diploid) $48 = L^m_2 + L^{sm}_8 + L^a_2 + M^{sm}_6 + M^{sm}_{12} + M^a_{10} + M^t_6 + S^t_2$ และปลาแรดแม่น้ำโขงคือ $2n$ (diploid) $48 = L^t_{18} + M^t_{30}$ โครโมโซมเครื่องหมายที่มี

ตำแหน่งนอร์โมในปลาทั้ง 8 ชนิด พบจำนวน 1 คู่แตกต่างกันในแต่ละชนิด และผลจากการศึกษาด้วยเทคนิค FISH ด้วยโพรบไรโบโซมอล 18S ไมโครแซทเทลไลต์ d(CA)₁₅, d(GC)₁₅, และ d(CAT)₁₀ บนโครโมโซม พบสัญญาณโพรบไรโบโซมอล 18S พบ 2 ตำแหน่ง ยกเว้นในปลาปากเปลี่ยนพบ 4 ตำแหน่ง สัญญาณโพรบไมโครแซทเทลไลต์ ในปลาทั้ง 8 ชนิดพบกระจายหนาแน่นตรงบริเวณเฮเทอโรโครมาทินและมีเอกลักษณ์เฉพาะตัวในแต่ละชนิด ปลาสวยงามชนิดพันธุ์หายากจากลุ่มน้ำโขงจำนวน 8 ชนิด ได้ถูกพิจารณาแล้วว่าเป็นชนิดที่มีศักยภาพในการพัฒนาต่อยอดในอนาคตเพื่อพัฒนาเป็นปลาสวยงามที่มีความสำคัญชนิดใหม่ของประเทศไทย งานวิจัยในอนาคตในการศึกษาต่อยอด ได้แก่ ศึกษาเปรียบเทียบระดับประชากรจากหลายๆ แหล่ง ศึกษาเชิงลึกโดยใช้โพรบไมโครแซทเทลไลต์ชนิดอื่นๆ เพิ่มเติม และศึกษาในระดับดีเอ็นเอของปลาทั้ง 8 ชนิด และศึกษาปลาชนิดอื่นๆ เพิ่มเติมในวงศ์เดียวกับปลาทั้ง 8 ชนิด

Keywords : พันธุศาสตร์เซลล์, โครโมโซม, เทคนิคฟลูออเรสเซนซ์ อินซิทูไฮบริไดเซชัน, ปลาสวยงาม, แม่น้ำโขง

Cytogenetics, Chromosome, Fluorescence in situ hybridization, Ornamental fish, Mekong Basin
(คำหลัก)

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ (ระบุชื่อผู้แต่ง ชื่อเรื่อง ชื่อวารสาร ปี เล่มที่ เลขที่ และหน้า) หรือผลงานตามที่คาดไว้ในสัญญาโครงการ
ผลงานตีพิมพ์แล้ว
 1. Ditcharoen, S., Bertollo, L. A. C., Ráb, P., Hnátková, E., Molina, W. F., Liehr, T., Tanomtong, A., Triantaphyllidis, C., Ozouf-Costaz, C., Tongnunui, S., Pengseng, P., **Supiwong, W.**, Aroutiounian, R. and Cioffi, M. B. 2019. Genomic Organization of Repetitive DNA Elements and Extensive Karyotype Diversity of Silurid Catfishes (Teleostei: Siluriformes): A Comparative Cytogenetic Approach. International Journal of Molecular Sciences. 2019, 20, 3545; doi:10.3390/ijms20143545ผลงานที่อยู่ระหว่างที่จะตีพิมพ์
 1. Phimphan, S., Chaiyasan, P., Suwannapoom, C., Reungsing, M., Juntaree, S., Tanomtong, A. and **Supiwong, W.** 2020. Comparative Study of Cytogenetics and Microsatellites Distributions in the Genomes of the Three Cyprinids (*Epalzeorhynchus frenatum*, *Puntigrus partipentazona*, *Scaphognatops bandanensis*; Cyprinidae) in Thailand. Comparative Cytogenetics. submitted.
2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์
 - เชิงวิชาการ (มีการพัฒนาการเรียนการสอน/สร้างนักวิจัยใหม่)
3. อื่นๆ (เช่น ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการในประเทศ การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ หนังสือ การจดสิทธิบัตร)
งานนำเสนอในที่ประชุมวิชาการ
 1. **Supiwong, W.** and Tanomtong, A. 2562. Comparative Cytogenetics between *Osphronemus exodon* and *O. goramy* by Classical and Molecular Methods. ใน: การประชุมวิชาการพันธุศาสตร์แห่งชาติ ครั้งที่ 21 (NGC2019) “พันธุศาสตร์เพื่อการพัฒนาอย่างยั่งยืน”. วันที่ 20-22 มิถุนายน พ.ศ. 2562 ณ โรงแรมเดอะชาयน์ จ. ชลบุรี หน้า 52-60.

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	ก
out put จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.	ค
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	6
บทที่ 3 วิธีการ / เครื่องมือที่ใช้ในการศึกษาวิจัย	10
บทที่ 4 ผลการวิจัย และอภิปรายผล	18
บทที่ 5 สรุป และข้อเสนอแนะ	39
เอกสารอ้างอิง	46
ภาคผนวก	53

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 ข้อมูลพันธุศาสตร์เซลล์ในปลาสวยงามสกุล <i>Epalzeorhynchos</i> , <i>Scaphognatops</i> , <i>Puntigrus</i> , <i>Bagarius</i> , <i>Kryptopterus</i> , <i>Wallago</i> , <i>Nandus</i> และ <i>Osphronemus</i>	6
ตารางที่ 2 ส่วนประกอบของสารละลายที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เพื่อสร้างโพรบ	15
ตารางที่ 3 การศึกษาเปรียบเทียบพันธุศาสตร์เซลล์ในปลาสวยงามสกุล <i>Epalzeorhynchos</i> , <i>Scaphognatops</i> , <i>Puntigrus</i> , <i>Bagarius</i> , <i>Kryptopterus</i> , <i>Wallago</i> , <i>Nandus</i> และ <i>Osphronemus</i>	29

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 ตัวอย่างปลาที่ศึกษา	19
ภาพที่ 2 เมทาเฟส แคริโอไทม์ และอิดิโอแกรมมาตรฐานจากการย้อมแบบธรรมดา และ แถบสีแบนเนอร์ของปลากาแดง	20
ภาพที่ 3 เมทาเฟส แคริโอไทม์ และอิดิโอแกรมมาตรฐานจากการย้อมแบบธรรมดา และ แถบสีแบนเนอร์ของปลาเสือข้างลาย	21
ภาพที่ 4 เมทาเฟส แคริโอไทม์ และอิดิโอแกรมมาตรฐานจากการย้อมแบบธรรมดา และ แถบสีแบนเนอร์ของปลาปากเปลี่ยน	23
ภาพที่ 5 เมทาเฟส แคริโอไทม์ และอิดิโอแกรมมาตรฐานจากการย้อมแบบธรรมดา และ แถบสีแบนเนอร์ของปลาปากไก่หนวดยาว	24
ภาพที่ 6 เมทาเฟส แคริโอไทม์ และอิดิโอแกรมมาตรฐานจากการย้อมแบบธรรมดา และ แถบสีแบนเนอร์ของเค้าดำ	25
ภาพที่ 7 เมทาเฟส แคริโอไทม์ และอิดิโอแกรมมาตรฐานจากการย้อมแบบธรรมดา และ แถบสีแบนเนอร์ของปลาแก้ว	27
ภาพที่ 8 เมทาเฟส แคริโอไทม์ และอิดิโอแกรมมาตรฐานจากการย้อมแบบธรรมดา และ แถบสีแบนเนอร์ของคูนซี	28
ภาพที่ 9 เมทาเฟส แคริโอไทม์ และอิดิโอแกรมมาตรฐานจากการย้อมแบบธรรมดา และ แถบสีแบนเนอร์ของปลาแรดแม่น้ำโขง	29
ภาพที่ 10 เมทาเฟสของปลากาแดง ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์ อินซิทู ไฮบริไดเซชัน โดยใช้โพรบไโรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ 18S โพรบไมโครแซทเทลไลต์ จำนวน 3 โพรบ ได้แก่ d(CA) ₁₅ , d(GC) ₁₅ และ d(CAT) ₁₀	31
ภาพที่ 11 เมทาเฟสของปลาเสือข้างลาย ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์ อินซิทู ไฮบริไดเซชัน โดยใช้โพรบไโรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ 18S โพรบไมโครแซทเทลไลต์ จำนวน 3 โพรบ ได้แก่ d(CA) ₁₅ , d(GC) ₁₅ และ d(CAT) ₁₀	32
ภาพที่ 12 เมทาเฟสของปลาปากเปลี่ยน ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์ อินซิทู ไฮบริไดเซชัน โดยใช้โพรบไโรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ 18S โพรบไมโครแซทเทลไลต์ จำนวน 3 โพรบ ได้แก่ d(CA) ₁₅ , d(GC) ₁₅ และ d(CAT) ₁₀	33
ภาพที่ 13 เมทาเฟสของปลาปากไก่หนวดยาว ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์ อินซิทู ไฮบริไดเซชัน โดยใช้โพรบไโรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ 18S โพรบไมโครแซทเทลไลต์ จำนวน 3 โพรบ ได้แก่ d(CA) ₁₅ , d(GC) ₁₅ และ d(CAT) ₁₀	34
ภาพที่ 14 เมทาเฟสของปลาเค้าดำ ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์ อินซิทู ไฮบริไดเซชัน โดยใช้โพรบไโรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ 18S โพรบไมโครแซทเทลไลต์ จำนวน 3 โพรบ ได้แก่ d(CA) ₁₅ , d(GC) ₁₅ และ d(CAT) ₁₀	35

สารบัญภาพ (ต่อ)

	หน้า
ภาพที่ 15 เมทาเฟสของปลาแค้วัว ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์ อินซิทู ไฮบริไดเซชัน โดยใช้โพรบไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ 18S โพรบไมโครแซทเทลไลต์ จำนวน 3 โพรบ ได้แก่ d(CA) ₁₅ , d(GC) ₁₅ และ d(CAT) ₁₀	36
ภาพที่ 16 เมทาเฟสของปลาตุ้มซี ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์ อินซิทู ไฮบริไดเซชัน โดยใช้โพรบไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ 18S โพรบไมโครแซทเทลไลต์ จำนวน 3 โพรบ ได้แก่ d(CA) ₁₅ , d(GC) ₁₅ และ d(CAT) ₁₀	37
ภาพที่ 17 เมทาเฟสของปลาแรดแม่น้ำโขง ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์ อินซิทู ไฮบริไดเซชัน โดยใช้โพรบไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ 18S โพรบไมโครแซทเทลไลต์ จำนวน 3 โพรบ ได้แก่ d(CA) ₁₅ , d(GC) ₁₅ และ d(CAT) ₁₀	38

บทที่ 1

บทนำ

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

ประเทศไทยเป็นประเทศในเขตร้อน มีภูมิอากาศและสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของสัตว์น้ำสวยงาม และพรรณไม้น้ำที่สำคัญ ส่งผลให้ประเทศไทยเป็นแหล่งที่มีความหลากหลายทางชีวภาพมากแหล่งหนึ่งของโลกรองจากทวีปอเมริกาใต้ โดยเฉพาะปลาน้ำจืด เนื่องจากลักษณะภูมิอากาศที่เหมาะสมต่อการดำรงชีวิตของสัตว์น้ำและปลาส่วนใหญ่อาศัยในแหล่งน้ำที่มีความหลากหลายของแหล่งน้ำจืดสูง ได้แก่ ลำธาร น้ำตก ห้วย หนอง คลอง บึง แม่น้ำลำ หรือลำธารใต้ดิน ประเทศไทยจะมีปลามากมายหลายชนิด หลายสายพันธุ์ โดยรวมแล้วมีชนิดพันธุ์ปลาไม่น้อยกว่า 700 ชนิด (species) (ชวลิต วิทยานนท์, 2548) โดยมากกว่าครึ่งของจำนวนชนิดปลาน้ำจืดที่พบในประเทศไทย (>350 ชนิด) มีรายงานพบในกลุ่มแม่น้ำโขงและแม่น้ำสาขา ได้แก่ แม่น้ำมูล ชี และสงคราม และมีปลาน้ำจืดถึง 200 ชนิด ที่มีลักษณะและสีสวยงาม นิยมนำมาเลี้ยงเป็นปลาสวยงาม ตัวอย่างชนิดที่มีความนิยมสูงในปัจจุบัน ได้แก่ ปลากัด (*Betta splendens*) ปลาน้ำผึ้ง (*Gyrinocheilus aymonieri*) ปลาทรงเครื่อง (*Epalzeorhynchos bicolor*) ปลาแก้มแดง (*E. frenatum*) ปลาเสือสุมาตรา (*Puntigrus tetrazona*) ปลาชะโด (*Channa micropeltes*) ปลาตะเพียนทอง (*Barbonymus alter*) ปลากระแห (*B. schwanenfeldii*) และปลาหางไหม้ (*Balantiocheilus melanopterus*) (Sermwatanakul, 2005)

ธุรกิจปลาสวยงามเป็นหนึ่งในธุรกิจที่ถูกพัฒนาจากฐานข้อมูลความหลากหลายทางชีวภาพของไทย ซึ่งได้รับความสนใจอย่างต่อเนื่องในกลุ่มเกษตรกรและผู้ประกอบการค้าสัตว์น้ำ เพราะปัจจุบันมีผู้นิยมทั้งชาวไทยและต่างชาติ เข้ามาเลือกสรรปลาสวยงาม ทำให้ส่งผลดีต่อผู้ประกอบการของไทย ประกอบกับการเตรียมพร้อมรับการเป็น AEC อย่างเต็มรูปแบบ โดยเร่งขยายแหล่งผลิตให้มากขึ้น และรักษาคุณภาพสัตว์น้ำไว้ เพื่อให้แข่งขันกับประเทศคู่ค้าอื่น ๆ การเลี้ยงปลาสวยงามเป็นงานอดิเรกประเภทหนึ่งที่มีความนิยมแพร่หลาย เนื่องจากให้ความเพลิดเพลิน คลายความเครียด อีกทั้งยังให้ความรู้เกี่ยวกับธรรมชาติของสัตว์น้ำและยังเหมาะกับบุคคลทุกเพศ ทุกวัย ทุกฐานะ (สมโภชน์ อัคระทวีวัฒน์, 2544) จากข้อมูลการส่งออกของตลาดปลาสวยงามทั่วโลกระหว่างปี พ.ศ. 2549-2553 พบว่าประเทศไทยมีมูลค่าการส่งออกปลาสวยงามสูงเป็นอันดับหกของโลก โดยมีมูลค่าการส่งออกปลาสวยงาม 13,968,611 เหรียญสหรัฐ (488.90 ล้านบาท) ในปี พ.ศ. 2549 เพิ่มขึ้นเป็น 18,928,773 เหรียญสหรัฐ (662.51 ล้านบาท) ในปี พ.ศ. 2553 ซึ่งมีอัตราการขยายตัวเพิ่มขึ้นเฉลี่ยร้อยละ 6.53 ต่อปี (Bureau of Agricultural Economics Research, 2011) จากข้อมูลดังกล่าวจะเห็นว่าการเพาะเลี้ยงปลาสวยงามเพื่อการส่งออกสามารถส่งเสริมให้เป็นอาชีพหลักและอาชีพรองให้แก่ประชากรของประเทศได้เป็นอย่างดี สร้างรายได้ให้กับประเทศไทยเพิ่มสูงขึ้น และส่งผลให้เกษตรกรมีรายได้สูงขึ้นในแต่ละปี โดยมีรายได้เฉลี่ยต่อครอบครัวมากกว่า 170,000 บาท ต่อปี (กรมประมง, 2553) ดังนั้นปลาสวยงามจึงมีบทบาทสำคัญต่อเศรษฐกิจของประเทศไทย

อย่างไรก็ตามในปัจจุบันความหลากหลายทางชีวภาพของปลาน้ำจืดในประเทศไทยกำลังลดลง เนื่องจากปัญหามลพิษแหล่งน้ำ กิจกรรมของมนุษย์ ภาวะโลกร้อน และรวมถึงปัญหาการรุกรานของ

ชนิดพันธุ์ต่างกัน ปัจจัยที่ทำให้การอนุรักษ์สัตว์ด้อยประสิทธิภาพ คือ ขาดข้อมูลทางด้านชีววิทยาของสัตว์ชนิดที่ต้องการอนุรักษ์ เพราะการอนุรักษ์สัตว์ชนิดใดก็ตามจำเป็นต้องรู้ข้อมูลพื้นฐานเสียก่อนว่า ในสัตว์แต่ละชนิดต้องการอะไร และในช่วงเวลาใด เพื่อนำมาใช้เป็นมาตรการสำหรับป้องกันพื้นที่อาศัย แหล่งอาหาร และพื้นที่ผสมพันธุ์ได้อย่างถูกต้อง ข้อมูลด้านลักษณะของโครโมโซม (chromosome) จึงเป็นข้อมูลพื้นฐานอย่างหนึ่งที่ต้องนำมาใช้ประโยชน์ด้านการอนุรักษ์ (วีระยุทธ เลาหะจินดา, 2552) นอกจากนี้ข้อมูลการศึกษาเกี่ยวกับชีววิทยาและพันธุศาสตร์ของปลาสวยงามยังมีค่อนข้างน้อย โดยเฉพาะการศึกษาในชนิดพันธุ์หายากจากกลุ่มแม่น้ำโขงของประเทศไทย การทราบข้อมูลพื้นฐานด้านชีววิทยาและพันธุศาสตร์ของปลาสวยงามชนิดพันธุ์หายากในลุ่มน้ำโขงของประเทศไทยไม่เพียงแต่จะเป็นประโยชน์ต่อการอนุรักษ์แต่ยังสามารถประยุกต์ใช้สำหรับการพัฒนาสายพันธุ์ปลาสวยงามให้เป็นที่ต้องการของตลาดในอนาคต

พันธุศาสตร์เซลล์ (cytogenetics) เป็นสาขาวิชาทางด้านพันธุศาสตร์ (genetics) ที่ศึกษาเกี่ยวกับโครโมโซม (chromosome) ซึ่งเป็นหน่วยโครงสร้างที่เป็นที่อยู่ของหน่วยพันธุกรรมหรือยีน (gene) ทำหน้าที่กำหนด ควบคุม และถ่ายทอดลักษณะต่าง ๆ ของสิ่งมีชีวิต จากชั่วรุ่นหนึ่งไปสู่อีกชั่วรุ่นหนึ่ง การกลาย (mutation) ของโครโมโซมย่อมส่งผลกระทบต่อลักษณะของสิ่งมีชีวิต และกระบวนการวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต การศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์จะมุ่งเน้นเพื่อทราบถึงจำนวน รูปร่าง ขนาด โครงสร้าง แถบสีบนโครโมโซม และพฤติกรรมของโครโมโซมในระยะต่าง ๆ (อมรา คัมภีรานนท์, 2546; อลงกลด แทนอมทอง, 2554) งานทางด้านนี้เป็นอีกหนึ่งองค์ความรู้พื้นฐานที่มีความสำคัญในปัจจุบัน เนื่องจากเป็นความรู้ที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ร่วมกับหลายสาขาวิชา ได้แก่ การศึกษาทางด้านอนุกรมวิธาน (taxonomy) โดยเฉพาะในกรณีของปลาที่มีลักษณะทางสัณฐานคล้ายคลึงกันมาก ข้อมูลทางด้านพันธุศาสตร์เซลล์จะเป็นเครื่องมือหนึ่งที่ช่วยสนับสนุนด้านอนุกรมวิธานของปลาให้ถูกต้องมากยิ่งขึ้น การเปลี่ยนแปลงของโครโมโซมที่เกิดขึ้นกับปลาชนิดที่มีความใกล้เคียงในลำดับขั้นของการจัดจำแนก จะมีรูปแบบและลักษณะของโครโมโซมที่คล้ายคลึงกัน การที่มีข้อมูลพื้นฐานทางด้านโครโมโซมเพียงพอ จะทำให้เราสามารถอธิบายรูปแบบวิวัฒนาการของปลาหนึ่งน้ำจืดในแต่ละกลุ่มได้ถูกต้อง (อลงกลด แทนอมทอง, 2554) นอกจากนี้ยังมีความสำคัญต่อการปรับปรุงพันธุ์ปลา โดยใช้วิธีการเหนี่ยวนำปลาให้มีจำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้นเป็นชุด (polyploidy) เพื่อให้มีผลผลิตที่สูงกว่าปลาทั่ว ๆ ไป ในการการสร้างสายพันธุ์ปลาใหม่ ๆ จากการผสมพันธุ์ข้ามชนิด (interspecific hybridization) หรือข้ามสกุล (intergeneric hybridization) การคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ควรที่จะต้องมีการตรวจสอบความความใกล้เคียงทางพันธุกรรม การตรวจสอบโครโมโซมก็เป็นวิธีการหนึ่งที่ใช้ตรวจสอบพ่อแม่พันธุ์ดังกล่าว นอกจากนี้ความรู้ทางพันธุศาสตร์เซลล์ยังมีประโยชน์ต่อการศึกษาทางด้านพิษวิทยาที่มีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม และระบบนิเวศทางน้ำ โดยการตรวจสอบความผิดปกติของโครโมโซมในปลาที่อาศัยอยู่ในแหล่งน้ำนั้น ๆ (วีระยุทธ สุภังค์, 2557; อลงกลด แทนอมทอง, 2554)

ในปลาบางชนิดข้อมูลแคริโอไทป์พื้นฐานไม่เพียงพอที่จะอธิบายความผันแปรภายในชนิดและระหว่างชนิดได้จึงจำเป็นต้องใช้ข้อมูลด้านอื่นประกอบจึงสามารถอธิบายอย่างสมบูรณ์ได้ โดยข้อมูลดังกล่าวได้แก่ การศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ระดับโมเลกุล เพื่ออธิบายโครงสร้างของจีโนม ซึ่งศึกษาโดยเทคนิค FISH นั้นได้สนใจโพรบกลุ่มไมโครแซทเทลไลต์ ซึ่งเป็นลำดับเบสซ้ำ ๆ มีรายงานการศึกษา

ค่อนข้างมากในปลาจากทวีปอเมริกา และพบว่าบางโพรบของไมโครแซทเทลไลต์มีความจำเพาะต่อชนิดปลาหรือประชากร นอกจากนี้ยังสามารถอธิบายถึงความหลากหลายและวิวัฒนาการในกลุ่มปลาของอเมริกาได้ (Cioffi and Bertollo, 2012) ข้อมูลการศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ในปลาสวยงามน้ำจืดของประเทศไทยมีรายงานค่อนข้างน้อย และมีเพียงรายงานการศึกษาโดยการย้อมสีโครโมโซมแบบธรรมดาเพื่อบอกจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์และแครีโอไทป์พื้นฐานเท่านั้นส่วนรายงานการศึกษาแถบสีโครโมโซมและพันธุศาสตร์เซลล์ระดับโมเลกุล โดยเทคนิค FISH ยังไม่มีรายงานการศึกษา

จากที่กล่าวมาก่อนหน้านี้ถึงความสำคัญของของปลาสวยงามต่อเศรษฐกิจของประเทศไทย แต่กลับพบว่าไม่มีข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญทางด้านพันธุศาสตร์เซลล์ซึ่งศาสตร์ที่สำคัญในการศึกษาโครโมโซมเพื่อให้ทราบเกี่ยวกับโครงสร้างทั้งหมดของจีโนมสิ่งมีชีวิต ซึ่งข้อมูลด้านนี้เป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการศึกษาด้านต่างๆ ได้แก่ อนุกรมวิธาน วิวัฒนาการ การศึกษาจีโนม พืชวิทยาสิ่งแวดล้อมและรวมถึงการปรับปรุงพันธุ์เพื่อการอนุรักษ์และการค้า โดยเฉพาะการศึกษาต่อยอดในปลาสวยงามข้อมูลด้านนี้จึงมีความจำเป็นอย่างมาก ปลาสวยงามชนิดพันธุ์หายากจากกลุ่มน้ำโขงจำนวน 8 ชนิด ได้ถูกพิจารณาแล้วว่าเป็นชนิดที่มีศักยภาพในการพัฒนาต่อยอดในอนาคตเพื่อพัฒนาเป็นปลาสวยงามที่มีความสำคัญชนิดใหม่ของประเทศไทย

2. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

2.1 เพื่อศึกษาจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ ($2n$) จำนวนโครโมโซมพื้นฐาน (NF) รูปร่าง ขนาด และโครโมโซมเครื่องหมายจากการย้อมแถบสีแบบบอร์ (Ag-NOR banding marker chromosome) ในปลาสวยงามชนิดพันธุ์หายาก 8 ชนิดจากกลุ่มน้ำโขงในประเทศไทย

2.2 เพื่อจัดแครีโอไทป์สร้างอิดิโอแกรมมาตรฐาน และสูตรแครีโอไทป์ รวมทั้งเปรียบเทียบข้อมูลดังกล่าวในปลาปลาสวยงามชนิดพันธุ์หายาก 8 ชนิดจากกลุ่มน้ำโขงในประเทศไทย

2.3 เพื่อวิเคราะห์รูปแบบการกระจายตัวของไมโครแซทเทลไลต์บนโครโมโซมภายหลังการศึกษาด้วยเทคนิค FISH ในปลาสวยงามชนิดพันธุ์หายาก 8 ชนิดจากกลุ่มน้ำโขงในประเทศไทย

3. ขอบเขตของโครงการวิจัย

3.1 งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยพื้นฐานที่ศึกษาข้อมูลพันธุศาสตร์เซลล์ทั้งระดับพื้นฐานและระดับโมเลกุลในปลาสวยงามชนิดพันธุ์หายาก 8 ชนิดจากกลุ่มน้ำโขงในประเทศไทย ได้แก่ ปลาแค้ว (*Bagarius bagarius*) ปลาแกดง (*E. frenatum*) ปลาปีกไก่หนวดยาว (*Kryptopterus limpok*) ปลาดุมซี (*Nandus oxyrhynchus*) ปลาแรดแม่น้ำโขง (*Osphronemus exodon*) ปลาเสือข้างลาย (*Puntigrus partipentazona*) ปลาปากเปลี่ยน (*Scaphognatops bandanensis*) และปลาเค้าดำ (*Wallago micropogon*) ซึ่งเป็นงานวิจัยเชิงคุณภาพที่มุ่งเน้นข้อมูลพันธุศาสตร์เซลล์ประจำชนิดพันธุ์โดยยังไม่เน้นที่ความผันแปรระหว่างประชากร

3.2 ศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์และพันธุศาสตร์เซลล์ระดับโมเลกุล ในปลาสวยงามชนิดพันธุ์หายาก 8 ชนิดจากกลุ่มน้ำโขงในประเทศไทย โดยใช้ตัวอย่างปลาชนิดละ 20 ตัว

3.3 ศึกษาในระดับพันธุศาสตร์เซลล์โดยใช้เทคนิคการย้อมสีโครโมโซมแบบธรรมดา และแถบสีแบบนอร์ ส่วนการศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ระดับโมเลกุล จะใช้เทคนิคฟลูออเรสเซนซ์ อินซิทู ไฮบริไดเซชัน โดยใช้โพรบไรโบโซมอล (ribosomal) 18S, ไมโครแซทเทลไลต์ d(CA)₁₅, d(GC)₁₅, และ d(CAT)₁₀

4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ และหน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

4.1 เป็นข้อมูลที่มีประโยชน์ต่อทางวิชาการและนำไปประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆ

1. ทราบข้อมูลที่สำคัญทางพันธุศาสตร์เซลล์ ได้แก่ จำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ จำนวนโครโมโซมพื้นฐาน ชนิด ขนาดของโครโมโซม แคริโอไทป์ และอิติโอแกรมมาตรฐาน ในปลาสวายงามชนิดพันธุ์หายาก 8 ชนิดจากลุ่มน้ำโขงในประเทศไทยโดยข้อมูลพื้นฐานนี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์เพื่อการค้า และการอนุรักษ์ต่อไป

2. ทราบเครื่องหมายโครโมโซม และการกระจายตัวของไมโครแซทเทลไลต์บนโครโมโซมที่เป็นลักษณะเฉพาะของปลาสวายงามชนิดพันธุ์หายาก 8 ชนิดจากลุ่มน้ำโขงในประเทศไทย ข้อมูลนี้สามารถบ่งบอกความสัมพันธ์ในเชิงวิวัฒนาการ และใช้ประโยชน์สำหรับข้อมูลประกอบการจัดจำแนกสิ่งมีชีวิต (taxonomy) ได้

3. ทราบความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาสวายงามชนิดพันธุ์หายาก 8 ชนิดจากลุ่มน้ำโขงในประเทศไทย จากการเปรียบเทียบทางพันธุศาสตร์เซลล์และพันธุศาสตร์เซลล์ระดับโมเลกุล ข้อมูลนี้บ่งบอกความสัมพันธ์ และความใกล้ชิดกันระหว่างปลาวงศ์ปลาแรด อธิบายรูปแบบวิวัฒนาการของโครโมโซม และรูปแบบไมโครแซทเทลไลต์ในจีโนม ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการศึกษาพันธุศาสตร์เชิงลึก รวมทั้งเป็นข้อมูลประกอบในการจัดการความหลากหลายทางชีวภาพ และการใช้ประโยชน์ทรัพยากรสัตว์น้ำอย่างยั่งยืนต่อไป

4. สามารถตีพิมพ์ผลงานในวารสารที่มีค่า ISI impact factor

หน่วยงานทั้งภาครัฐและภาคเอกชนที่จะนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์ ได้แก่

กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม, อาจารย์ และนักวิชาการของสถาบันการศึกษาในระดับอุดมศึกษา, กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ และเกษตรกรผู้สนใจนำไปเพาะขยายและปรับปรุงพันธุ์

5. สถานที่ดำเนินงานวิจัย

5.1 สถานที่เก็บตัวอย่าง ได้แก่ แม่น้ำโขง และสาขา

5.2 สถานที่เตรียมโครโมโซม ทำปฏิบัติการ คือห้องปฏิบัติการประมง คณะวิทยาศาสตร์ประยุกต์ และวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น วิทยาเขตหนองคาย และห้องปฏิบัติการพันธุศาสตร์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

2.1 การศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ในปลาสวยงามจากกลุ่มน้ำโขงของประเทศไทย

การศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ของปลาสวยงามชนิดพันธุ์หายากจากกลุ่มน้ำโขงทั้ง 8 ชนิดนั้น พบว่ามี 2 ชนิด คือปลาเสือขี้ลาย และปลาปักเป้าหนวดยาวยังไม่มีรายงานการศึกษา ส่วนในปลาอีก 6 ชนิด พบว่ามีรายงานการศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์เฉพาะการย้อมโครโมโซมแบบธรรมดา ดังนี้ ปลาปากแดงมีโครโมโซมดิพลอยด์ $2n = 48$, $NF=72$ (วิเชียร มากตุ่น และธวัช ดอนสกุล (2536) ปลาปากเปลี่ยนมีโครโมโซมดิพลอยด์ $2n = 50$ และ $NF = 64$ (ธวัช ดอนสกุล และคณะ (2550) ปลาดุมซีมีโครโมโซมดิพลอยด์ $2n=48$ และ $NF= 90$ (จิราภรณ์ มิ่งขวัญ และ อลงกลด แทนอมทอง (2556) ปลาแรดแม่น้ำโขงมีโครโมโซมดิพลอยด์ $2n = 48$, $NF= 48$ (ธวัช ดอนสกุล และคณะ (2549) ปลาเค้าดำมีโครโมโซมดิพลอยด์ $2n = 56$, $NF= 86$ (ธวัช ดอนสกุล (2539) และปลาแค้วมีโครโมโซมดิพลอยด์ $2n=56$, $NF=82$ (Rangsiruji et al., 2007) รายงานการย้อมแถบสีแบบอื่นๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งแถบสีแบบบอร์ยังไม่มีรายงานการศึกษา จึงจำเป็นต้องศึกษาเพิ่มเติมในการศึกษาแถบสีแบบบอร์ เพื่อช่วยระบุโครโมโซมเครื่องหมายที่เป็นเอกลักษณ์ประจำชนิด ส่วนเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์ อินซิทู ไฮบริไดเซชัน ในปลาทั้ง 8 ชนิดยังไม่มีรายงานมาก่อนหน้า องค์ความรู้จากงานวิจัยชิ้นนี้ยังบอกถึงการจัดเรียงตัวของลำดับเบสซ้ำๆ บนจีโนม สามารถอธิบายรูปแบบวิวัฒนาการทางโครโมโซมในปลาน้ำจืด โดยเฉพาะอย่างยิ่งปลาสวยงาม

ปลาสวยงามชนิดพันธุ์หายาก 8 ชนิด จากกลุ่มน้ำโขงที่ศึกษาครั้งนี้ มีทั้งหมด 5 วงศ์ และ 8 สกุล ดังนี้ *Epalzeorhynchos*, *Scaphognatops*, *Puntigrus* (วงศ์ปลาตะเพียน), *Bagarius* (วงศ์ปลาแค้ว), *Kryptopterus*, *Wallago* (วงศ์ปลาเนื้ออ่อน), *Nandus* (วงศ์ปลาดุมซี) และ *Osphronemus* (วงศ์ปลาแรด) ข้อมูลพันธุศาสตร์เซลล์ของปลาสวยงามชนิดพันธุ์หายากจากกลุ่มน้ำโขงมีรายงานน้อยมาก ส่วนใหญ่จะศึกษาโดยเทคนิคการย้อมแถบสีโครโมโซมแบบธรรมดา ดังข้อมูลแสดงในตารางที่ 1

วงศ์ปลาตะเพียน ธวัช ดอนสกุล และ วิเชียร มากตุ่น (2536) ศึกษาโครโมโซมของปลาปากแดง (*E. frenatum*) และปลาทรงเครื่อง พบว่ามีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ ($2n$) เท่ากับ 48 และ 50 แห่งตามลำดับ ส่วนในปลาปากเปลี่ยน (*Scaphognatops bandanensis*) ธวัช ดอนสกุล และคณะ (2550) ได้รายงานจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ ($2n$) เท่ากับ 50 แห่ง ส่วนปลาเสือขี้ลาย (*Puntigrus partipentazona*) ประเทศไทยยังไม่มีรายงานการศึกษา แต่มีศึกษาในประเทศอื่นของเอเชีย โดย Taki et al. (1977) พบว่าจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ ($2n$) เท่ากับ 50 แห่ง เช่นกันกับปลาเสือสุมาตรา (*P. pentazona*) แต่มีแคโรไทป์แตกต่างกัน ปลาในวงศ์ปลาตะเพียนส่วนใหญ่มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ เท่ากับ 50 แห่ง (Arai, 2011)

วงศ์ปลาแค้วมีรายงานในสกุลเดียวกับปลาแค้ว 3 ชนิด ได้แก่ ปลาแค้ว (*Bagarius bagarius*) ปลาแค้ง (*B. suchus*) และปลาแค้วย (*B. yarrelli*) ทั้ง 3 ชนิดมีจำนวนโครโมโซมเท่ากันคือ $2n=56$ แต่มีแคโรไทป์แตกต่างกัน (อัจฉริยา รังษิรุจิ และคณะ, 2550) วงศ์ปลาเนื้ออ่อนสกุลปลาขาไก่ มีรายงาน 3 ชนิด คือ ปลาก้างพระร่วง (*Kryptopterus bicirrhys*) จำนวนโครโมโซมดิ

พลอยด์ (2n) เท่ากับ 64 แห่ง (ธวัช ดอนสกุล, 2539) ปลาขาไก่ (*K. cryptopterus*) จำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ (2n) เท่ากับ 92 แห่ง (Donsakul, 1992) ปลาผี (*K. macrocephalus*) จำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ (2n) เท่ากับ 62 แห่ง (Magtoon and Donsakul, 2009) สกุลปลาเค้า มีรายงาน 2 ชนิด คือ ปลาเคื่อดำ (*Wallago micropogon*) และ ปลาเค้าขาว (*W. attu*) ที่ ธวัช ดอนสกุล (2539) รายงานไว้ว่าปลาเคื่อดำและเค้าขาว จำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ (2n) เท่ากับ 56 และ 88 แห่ง ตามลำดับ ซึ่งจากรายงานปลาเค้าขาวจากอินเดียที่จำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ (2n) เท่ากับ 86 แห่ง (Rishi and Singh, 1983; Sharma and Tripathi, 1984) สำหรับวงศ์ปลาตุ้มซี มีรายงานเพียง 1 ชนิด คือ ปลาตุ้มซี (*Nandus oxyrhynchus*) มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ (2n) เท่ากับ 48 แห่ง (จิราภรณ์ มิ่งขวัญ และ อลงกลด แทนอมทอง, 2556) ซึ่งเท่ากับสกุลปลาแรด ที่มีรายงานไว้ 3 ชนิด ได้แก่ ปลาแรดแม่น้ำโขง (*Osphronemus exodon*) ปลาแรด (*O. goramy*) และ ปลาแรดแดง (*O. laticlavus*) ซึ่งทั้ง 3 ชนิดมีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ (2n) เท่ากับ 48 แห่ง (ธวัช ดอนสกุล และคณะ, 2549)

ตารางที่ 1 ข้อมูลพันธุศาสตร์เซลล์ในปลาสวยงามสกุล *Epalzeorhynchus*, *Scaphognatops*, *Puntigrus*, *Bagarius*, *Kryptopterus*, *Wallago*, *Nandus* และ *Osphronemus*

Family/ Species	2n	NF	Karyotype	Ag-NORs	แหล่งตัวอย่าง	Reference
วงศ์ปลาตะเพียน (Cyprinidae)						
ปลากาแดง (<i>Epalzeorhynchos frenatum</i>)	48	72	14m+10sm+8a+16t	-	ไทย	ธวัช ดอนสกุล และ วิเชียร มากตุ่น (2536)
ปลาทรงเครื่อง (<i>E. bicolor</i>)	50	74	20m+4sm+2a+24t	-	ไทย	
ปลาปากเปียน (<i>Scaphognatops bandanensis</i>)	50	66	10m+6sm+34t	-	ไทย	ธวัช ดอนสกุล และคณะ (2550)
ปลาเสือขางลาย (<i>Puntigrus partipentazona</i>)	50	90	6m+34sm/a+10t	-	เอเชีย	Taki et al. (1977)
ปลาเสีสุมาตรา (<i>P. pentazona</i>)	50	98	22m+26sm/a+2t	-	เอเชีย	
วงศ์ปลาแค้ (Sisoridae)						
ปลาแค้ง (<i>Bagarius suchus</i>)	56	88	16m+16sm+4a+20t	-	ไทย	อัจฉริยา รังษิ รุจิ และคณะ (2550)
ปลาแค้ว (<i>B. bagarius</i>)	56	82	16m+10sm+2a+28t	-	ไทย	
ปลาแคควาย (<i>B. varrelli</i>)	56	96	14m+20sm+6a+16t	-	ไทย	

วงศ์ปลาเนื้ออ่อน (Siluridae)						
ปลาก้างพระร่วง (<i>Kryptopterus bicirrhys</i>)	64	98	20m+10sm+4a+30t	-	ไทย	ธวัช ดอนสกุล (2539)
ปลาขี้ไก่ (K. <i>cryptopterus</i>)	92	100	8m+10sm+74t	-	ไทย	Donsakul (1992)
ปลาผี (K. <i>macrocephalus</i>)	62	98	24m+12sm+26t	-	ไทย	Magtoon and Donsakul (2009)
ปลาเค้าดำ (<i>Wallago micropogon</i>)	56	86	26m+4sm+26t	-	ไทย	ธวัช ดอนสกุล (2539)
ปลาเค้าขาว (<i>Wallago attu</i>)	86	104	12m+6sm+2a+66t	-	อินเดีย	Rishi and Singh (1983)
	86	108	10m+12sm+8a+56t	-	อินเดีย	Sharma and Tripathi (1984)
	88	110	16m+2sm+4a+66t	-	ไทย	ธวัช ดอนสกุล (2539)
วงศ์ปลาตุ้มขี้ (Nandidae)						
ปลาตุ้มขี้ (<i>Nandus oxyrhynchus</i>)	48	90	6m+22sm+14a+6t	-	ไทย	จิราภรณ์ มิ่งขวัญ และ อลงกลด แทนอมทอง (2556)
วงศ์ปลาแรด (Osphronemidae)						
ปลาแรดแม่น้ำโขง (<i>Osphronemus exodon</i>)	48	48	48t	-	ไทย	ธวัช ดอนสกุล และคณะ (2549)
ปลาแรด (<i>O. goramy</i>)	48	48	48t	-		
ปลาแรดแดง (<i>O. laticlavus</i>)	48	50	2sm+46t	-		

หมายเหตุ: 2n = จำนวนโครโมโซมดิพลอยด์, NF = จำนวนโครโมโซมพื้นฐาน, m = โครโมโซมชนิดเมทาเซนทริก, sm = โครโมโซมชนิดซับเมทาเซนทริก, a = โครโมโซมชนิดอะโครเซนทริก, t = โครโมโซมชนิดเทโลเซนทริก NORs = Nucleolar organizer regions และ - = ไม่มีการศึกษา

จากข้อมูลการศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ในปลาสวยงามทั้ง 8 ชนิดในครั้งนี้จะพบว่าปลาปักไก่หนวดยาว (*Kryptopterus limpok*) ยังไม่มีข้อมูลการศึกษามาก่อน การศึกษาครั้งนี้จึงเป็นรายงานแรกอย่างใดก็ตามในปลาบางชนิดข้อมูลแคริโอไทป์พื้นฐานไม่เพียงพอที่จะอธิบายความผันแปรภายในชนิดและระหว่างชนิดได้จึงจำเป็นต้องใช้ข้อมูลด้านอื่นประกอบจึงสามารถอธิบายอย่างสมบูรณ์ได้ โดยข้อมูลดังกล่าวได้แก่ การศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ระดับโมเลกุล เพื่ออธิบายโครงสร้างของจีโนม ซึ่งศึกษาโดยเทคนิคที่ศึกษาโครโมโซมแบบติดฉลากด้วยสารเรืองแสง (Fluorescence *in situ* Hybridization: FISH) เพื่อศึกษารายละเอียดของยีนหรือดีเอ็นเอบนแท่งโครโมโซมได้ ปัจจุบันเทคนิค FISH นั้นได้สนใจโพรบกลุ่มไมโครแซทเทลไลต์ ซึ่งเป็นลำดับเบสซ้ำๆ มีรายงานการศึกษาค่อนข้างมากในปลาจากทวีปอเมริกา และพบว่าบางโพรบของไมโครแซทเทลไลต์มีความจำเพาะต่อชนิดปลาหรือประชากร นอกจากนี้ยังสามารถอธิบายถึงความหลากหลายและวิวัฒนาการในกลุ่มปลาของอเมริกาได้ (Cioffi and Bertollo, 2012) ข้อมูลการศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ในปลาสวยงามน้ำจืดของประเทศไทยมีรายงานค่อนข้างน้อย และมีเพียงรายงานการศึกษาโดยการย้อมสีโครโมโซมแบบธรรมดาเพื่อบอกจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์และแคริโอไทป์พื้นฐานเท่านั้นส่วนรายงานการศึกษาแถบสีโครโมโซมและพันธุศาสตร์เซลล์ระดับโมเลกุล โดยเทคนิค FISH ยังไม่มีรายงานการศึกษา

2.2 พันธุศาสตร์ระดับเซลล์ระดับโมเลกุลของปลา

การหาลำดับดีเอ็นเอที่อยู่บนโครโมโซมโดยใช้เทคนิคพีซี นั้นถูกนำมาประยุกต์ใช้กับปลาหลายชนิด (Cross et al., 2006) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง การตรวจหาดีเอ็นเอที่มีลักษณะเป็นชุดซ้ำ ๆ เป็นกลุ่มที่อยู่ในตำแหน่งที่แน่นอนบนโครโมโซม ได้แก่ ยีนฮิสโตน (histone genes) ยีนไรโบโซม (ribosomal RNA genes) ซึ่งยีนเหล่านี้มีประโยชน์ในการศึกษาลักษณะและรูปแบบของโครโมโซม และเป็นยีนที่พบในปลาทุกชนิด ซึ่งการศึกษายีนดังกล่าวบนโครโมโซมเป็นข้อมูลใหม่ในการสร้างวิวัฒนาการของปลาในกลุ่ม salmonids พบว่าลำดับเบสที่ซ้ำๆ แยกได้จากปลาหลายชนิด มีการกระจายอยู่ในตำแหน่งที่แตกต่างกันไป โดยอาจอยู่บริเวณตำแหน่งเซนโทเมียร์ ตัวอย่างเช่น ปลาแอนตาร์กติกไอซ์ (*Antarctic Ice*, *Chiondraco hamatus*), ปลา *Hoplias malabaricus*, ปลา *Sparus aurata* และ ปลา *Salvelinus alpinus* เป็นต้น หรือพบกระจายอยู่บริเวณเทโลเมียร์ ซึ่งจะพบในโครโมโซมสัตว์มีกระดูกสันหลังทุกชนิด ปลาที่เคยตรวจสอบด้วยโพรบเทโลเมียร์ ได้แก่ กลุ่มปลา Cypriniforms และกลุ่มปลา Salmoniforms ส่วนในปลากลุ่ม poeciliids, ปลา *Leporinus elongates*, ปลา *Chiondraco hamatus* และปลา *Oncorhynchus tshawytscha* พบกลุ่มลำดับเบสที่ซ้ำๆ จะมีความจำเพาะที่โครโมโซมเพศ การตรวจสอบดังกล่าวจะใช้โพรบที่ตรวจสอบแตกต่างกันไป เช่น โพรบที่จำเพาะต่อชนิด โพรบที่จำเพาะต่อโครโมโซม หรือโพรบที่จำเพาะต่อเพศ ซึ่งถูกนำมาใช้ประโยชน์ในการเพาะเลี้ยงปลา สำหรับโพรบเซนโทเมียร์และเทโลเมียร์ถูกใช้ในการตรวจสอบการจัดเรียงตัวใหม่ของโครโมโซมภายในชนิดเดียวกัน (Ruth and Kent, 1996)

ไรโบโซมอล อาร์เอ็นเอ ยีน หรือ อาร์ดีเอ็นเอ ในปลารวมทั้งยูแคริโอตชั้นสูงอื่นๆ ประกอบด้วยกลุ่มยีน 2 วงศ์ (multigene families) ที่แตกต่างกัน กลุ่มยีนเหล่านี้ประกอบด้วยยีนที่อยู่กันเป็นชุดซ้ำๆ ตั้งแต่ 100 ถึง 1,000 ชุด เรียงต่อกัน กลุ่มยีนวงศ์แรก (ยีนหลักของ อาร์ดีเอ็นเอ) เรียกว่า 45S rDNA เป็นตัวสร้างนิวคลีโอไรส ประกอบด้วยยีน 18S, 58S และ 28S rDNAs ส่วนกลุ่ม

ยีนอีแกวค์ (ยีนรองของอาร์ดีเอ็นเอ) เรียกว่า 5S rDNA เป็นยีนที่ไม่ได้สร้างนิวคลีโอไลต์ ดังนั้น 45S rDNA จึงเป็นกลุ่มยีนที่สัมพันธ์กับตำแหน่งนอร์ (Mazzei et al., 2004) ยีน 45S rDNA ถูกถอดรหัสโดยเอนไซม์ RNA polymerase I ในขณะที่ 5S rDNA ถูกถอดรหัสโดยเอนไซม์ RNA polymerase III (Long and David, 1980) รูปแบบของการกระจายตัวของยีนไรโบโซมมีความจำเพาะต่อชนิดและการจัดเรียงตัวของโครโมโซมในปลาวงศ์ Channichthyidae (Mazzei et al., 2004) ฟอนทานาและคณะ (Fontana et al., 2003) ยังพบว่ารูปแบบของการกระจายตัวของกลุ่มยีนเหล่านี้มีความคล้ายคลึงและอนุรักษ์สูงภายในวงศ์ของปลาเตอร์เจียน และยีนเหล่านี้เป็นเครื่องหมายทางพันธุกรรมอย่างดีในการศึกษาวิวัฒนาการรวมทั้งการระบุชนิดโดยใช้พันธุกรรมในชนิดที่ใกล้เคียงกันของปลาสกุล *Tor* นอกจากนี้การใช้ยีนไรโบโซมซึ่งเป็นเสมือนโครโมโซมเครื่องหมายมีความสำคัญยิ่งในการศึกษาเปรียบเทียบทางพันธุกรรม (Singh et al., 2009) ยีนไรโบโซม (18S and 5S rDNA) ยังเป็นเครื่องหมายที่ถูกใช้ในปลา *H. malabaricus* เพื่อแยกแต่ละประชากรออกจากกันได้ (Cioffi et al., 2009; Vicari et al., 2005) ในทำนองเดียวกันรูปแบบของโพรบ rDNA เหล่านี้สามารถถูกใช้เป็นเครื่องหมายจีโนมเพื่อใช้สำหรับตรวจสอบความสัมพันธ์ระหว่างชนิดได้ รวมถึงการทำแผนที่โครโมโซมของยีนสายเดี่ยว ตำแหน่งไมโครแซทเทลไลท์ ในปัจจุบันมีการใช้เทคนิคพีซี เพื่อใช้ประโยชน์ในการแยกลักษณะทางปริมาณ ซึ่งเป็นสิ่งสำคัญสำหรับการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ (Ruth and Kent, 1996)

ไมโครแซทเทลไลท์เป็นบริเวณที่เป็นลำดับเบสซ้ำเป็นชุดโดยมีจำนวนชุดของเบสตั้งแต่ 2-10 เบส บริเวณนี้เป็นส่วนที่ไม่ใช่ยีน การศึกษาการกระจายตัวของไมโครแซทเทลไลท์ในวงศ์ปลาแรดยังไม่มีรายงาน แต่มีรายงานการศึกษาค่อนข้างมากในปลาของทวีปอเมริกาใต้ ไมโครแซทเทลไลท์ถูกพบว่ากระจายอยู่บริเวณต่างๆ ของโครโมโซมปลาดังนี้ บริเวณที่เป็นเฮเทอโรโครมาทิน (Fischer et al., 2004; Mantovani et al., 2004) โดยชนิดปลาที่ถูกศึกษาส่วนใหญ่จะพบไมโครแซทเทลไลท์บริเวณเซนโทรเมียร์ (Lanfredi et al., 2001; Martins, 2007; Canapa et al., 2002; Oliveira and Wright, 1998; Mazzuchelli and Martins, 2009; Sola and Gornung, 2001; Reed and Phillips, 1995; Garrido-Ramos et al., 1994; Elgar et al., 1999) บางชนิดถูกพบที่บริเวณเทโลเมียร์ (Vanzela et al., 2002; Hatanaka et al., 2002) บางชนิดถูกพบบริเวณโครโมโซมเพศในปลา (Cioffi and Bertollo, 2012)

บทที่ 3

วิธีการ / เครื่องมือที่ใช้ในการศึกษาวิจัย

3.1 แบบการวิจัย (Research Design)

งานวิจัยเป็นงานวิจัยเชิงคุณภาพ เพื่อสำรวจและศึกษาลักษณะเฉพาะทางพันธุศาสตร์เซลล์ของปลาสวายงามชนิดพันธุ์หายาก 8 ชนิดจากลุ่มน้ำโขงในประเทศไทย ได้แก่ ปลาแค้ว (*Bagarius bagarius*) ปลาแกด (E. frenatum) ปลาปักเป้าหนวดยาว (*Kryptopterus limpok*) ปลาตุ้มซี (*Nandus oxyrhynchus*) ปลาแรดแม่น้ำโขง (*Osphronemus exodon*) ปลาเสือข้างลาย (*Puntigrus partipentazona*) ปลาปากเปลี่ยน (*Scaphognatops bandanensis*) และปลาเค้าดำ (*Wallago micropogon*) นำตัวอย่างปลามาศึกษาทางสัณฐานวิทยา พันธุศาสตร์เซลล์ และพันธุศาสตร์เซลล์ระดับโมเลกุล โดยแต่ละชนิดใช้ตัวอย่างละประมาณ 20 ตัวอย่าง เพื่อที่จะศึกษาเปรียบเทียบข้อมูลระหว่างชนิด ในด้านต่างๆ สถิติที่ใช้คือค่าเฉลี่ย และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานในการหาค่าความยาวโครโมโซม

3.2 ขั้นตอนและวิธีในการวิจัย การเก็บข้อมูล การกำหนดพื้นที่ ประชากรตัวอย่าง ฯลฯ และวิธีการในการวิเคราะห์ข้อมูล

1. การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างปลาสวายงามชนิดพันธุ์หายาก 8 ชนิดจากลุ่มน้ำโขงในประเทศไทย จากลุ่มแม่น้ำโขงและสาขา ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ได้แก่ จังหวัดหนองคาย เลย บึงกาฬ สกลนคร นครพนม อำนาจเจริญ และอุบลราชธานี

2. ศึกษาลักษณะภายนอกตามสัณฐานวิทยาเพื่อระบุชนิดตัวอย่างปลาสวายงามชนิดพันธุ์หายาก 8 ชนิดจากลุ่มน้ำโขงในประเทศไทย

นำตัวอย่างปลามาตรวจสอบ และระบุชนิดโดยใช้เอกสารตามคู่มือของชวลิต วิทยานนท์ (2548) ชวลิต วิทยานนท์ และคณะ (2540) สมโภชน์ อัคระทวีวัฒน์ (2547) Kottelat (2001) และ Rainboth (1996) ชื่อวิทยาศาสตร์ที่เป็นที่ยอมรับยึดตามฐานข้อมูลออนไลน์ Catalog of Fishes (Eschmeyer, 2016) ลักษณะที่ใช้ตรวจสอบได้แก่ ลักษณะความยาวลำตัวต่อความลึก ความยาวของครีบอกต่อความยาวลำตัว จำนวนเกล็ด สีของลำตัว จำนวนกระดูกเหงือก จำนวนซี่เหงือก ความยาวและความกว้างของส่วนหัว เป็นต้น

3. ศึกษาด้านพันธุศาสตร์เซลล์

การศึกษาด้านพันธุศาสตร์เซลล์ ประกอบด้วย ขั้นตอนการเตรียมโครโมโซม การเตรียมสไลด์ การย้อมสีโครโมโซม การตรวจสอบโครโมโซม การจัดทำแคโรไทป์ และการสร้างอิดีโอแกรมมาตรฐาน ดังต่อไปนี้

3.1 การเตรียมโครโมโซมโดยวิธีทางตรง (direct method)

อวัยวะที่ใช้ คือไต เนื่องจากเป็นอวัยวะที่มีการแบ่งเซลล์ตลอดเวลาโดยเตรียมจากในสิ่งมีชีวิต (*in vivo*) โดยดัดแปลงมาจากวิธีของ Chen and Ebeling (1968), Glod et al. (1990) และ Nanda et al. (1995) ดังนี้ ฉีดโคลชิซินเข้มข้นร้อยละ 0.05 ขนาด 1 มิลลิลิตร ต่อน้ำหนักตัว

100 กรัม เข้าไปในช่องท้องของปลา ปล่อยให้ปลาวายในตู้เลี้ยงปลาที่ฟั่นออกซิเจนอย่างแรง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำปลาไปทำให้ตายอย่างสงบโดยใช้น้ำแข็ง ผ่าตัดเปิดช่องท้อง และนำเฉพาะส่วนของไตมา ตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ในสารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ เข้มข้น 0.075 โมลาร์ (KCl 0.075 M) กรองเศษเซลล์ขนาดใหญ่ออกด้วยตะแกรงขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 มิลลิเมตร เทตะกอนเซลล์ขนาดเล็กลงในหลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 15 มิลลิลิตร เติมสารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ลงไปให้หลอดปั่นเหวี่ยงประมาณ 6-8 มิลลิลิตร ขึ้นกับตะกอนเซลล์ บ่มที่อุณหภูมิห้องประมาณ 30 นาที นำตะกอนเซลล์ไปปั่นที่ความเร็ว 1,200-1,500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที ที่ส่วนใสข้างบน เติมน้ำยาตรึงสภาพ (fixative) ที่มีส่วนผสมของเมทานอล (methanol) 3 ส่วนต่อกรดอะซิติก (acetic acid) 1 ส่วน ที่เตรียมใหม่ ๆ และเย็นจัดที่ละลายอย่างช้า ๆ พร้อมกับเขย่าหลอดไปด้วย เติมนจนครบ 7 มิลลิลิตร นำสารละลายไปปั่นที่ 1,200-1,500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที ที่ส่วนใสข้างบน เติมน้ำยาตรึงสภาพลงไป 7-8 มิลลิลิตร ปั่นอีกครั้ง ทาซ้ำเพื่อล้างตะกอนเซลล์ให้สะอาด 3-4 ครั้ง เก็บตะกอนเซลล์ในสารละลายตรึงเซลล์ไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะศึกษา

3.2 การเตรียมสไลด์โครโมโซม

นำตะกอนเซลล์ที่เตรียมไว้แล้วมาหยดบนสไลด์ที่สะอาด 1-2 หยด โดยหยดห่างจากสไลด์ 10 เซนติเมตร เมื่อหยดครบเวลา 15 วินาทีให้หยदन้ำยาตรึงสภาพตามอีก 1 หยด ปล่อยให้แห้งในอากาศ การเตรียมสไลด์จะเตรียมจากตัวอย่างปลาไหลนาตัวละ 8 สไลด์

3.3 การย้อมสีโครโมโซม

นำสไลด์ที่เตรียมไว้มาทำการย้อมสีโครโมโซมทั้งแบบธรรมดาและแบบนอร์ ดังนี้

3.3.1 การย้อมแบบธรรมดานั้นทำการย้อมสไลด์ด้วยสีจิมซ่า ความเข้มข้นร้อยละ 10 (10% Geimsa stain) ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer) ที่มีค่าความเป็นกรดต่าง 6.8 (pH 6.8) เป็นเวลา 30-45 นาที (Rooney, 2001) แล้วล้างสไลด์ด้วยน้ำกลั่นให้สะอาด ผึ่งให้แห้ง นำไปตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

3.3.2 สำหรับการย้อมแบบสีย้อมแบบนอร์ ดัดแปลงจากวิธีการของ Howell and Black (1980) ดังนี้สไลด์ที่จะย้อมต้องมีอายุระหว่าง 1-7 วัน โดยนำสไลด์ที่เตรียมไว้ไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส อย่างน้อย 3 ชั่วโมง หยดเจลาตินเข้มข้นร้อยละ 2 ลงบนสไลด์ 2 หยด แล้วหยดซิลเวอร์ไนเตรทเข้มข้นร้อยละ 50 (50% AgNO_3) ลงบนสไลด์ 4 หยด ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ แล้วนำเข้าตู้อบที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที หรือจนกว่าสไลด์จะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเข้ม (ห้ามทิ้งไว้นานจนสไลด์เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลโดยเด็ดขาด) ล้างซิลเวอร์ไนเตรทส่วนเกินออกด้วยน้ำกลั่น ผึ่งสไลด์ให้เกือบแห้ง นำไปย้อมด้วยสีจิมซ่าเข้มข้นร้อยละ 10 ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.8 เป็นเวลา 30 วินาที ล้างด้วยน้ำกลั่น ผึ่งให้แห้งนำไปตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กำลังขยาย 40X

3.4 การตรวจสอบโครโมโซม

เลือกเซลล์ที่มีโครโมโซมระยะเมทาเฟสกระจายตัวดีไม่ซ้อนทับกัน นำมาถ่ายภาพโครโมโซมโดยใช้เลนส์วัตถุ (objective lens) กำลังขยาย 100X โดยใช้ชุดถ่ายภาพที่ต่อกับกล้องจุลทรรศน์ หรือใช้กล้องดิจิทัล เพื่อตรวจนับจำนวนโครโมโซมจากภาพถ่ายโครโมโซมจำนวน 100 เซลล์ ความถี่ของจำนวนโครโมโซมที่พบมากที่สุด จะเป็นค่าของจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ของสิ่งมีชีวิตนั้น ๆ จากนั้นจับคู่โครโมโซมที่เหมือนกัน (homologous chromosome) และศึกษา

โครโมโซมโดยการหาความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาว (long arm; L) ความยาวของแขนโครโมโซมข้างสั้น (short arm; S) และคำนวณหาความยาวของโครโมโซมแต่ละแท่ง (total length; LT, LT = L + S) คำนวณค่า relative length (RL) และ centromeric index (CI) เพื่อระบุชนิดของโครโมโซม และนำค่าที่ได้ไปใช้ประกอบในการจัดทำแคโรไทป์ และสร้างอิดิโอแกรมมาตรฐาน

3.5 การจัดทำแคโรไทป์

ดัดแปลงจากวิธีการของกันยารัตน์ ไชยสุต (2532) และ Turpin and Lejeune (1965) ใช้รูปถ่ายที่ได้ในการจับคู่โครโมโซมที่เหมือนกัน โดยการกำหนดตำแหน่งเซนโทรเมียร์ของโครโมโซมแต่ละแท่งในเซลล์ วัดค่าความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาว ค่าความยาวของแขนโครโมโซมข้างสั้น นำค่าที่ได้มาคำนวณหาความยาวของโครโมโซมแต่ละแท่ง จัดเรียงแคโรไทป์ ให้เรียงตามความยาวของโครโมโซมแต่ละคู่จากมากไปหาน้อย ยกเว้นโครโมโซมเพศจะวางเป็นคู่สุดท้าย มุมล่างซ้ายเสมอ ต้องบอกหมายเลขของโครโมโซมแต่ละคู่ด้านล่าง วางแท่งโครโมโซมให้แขนข้างสั้นอยู่ด้านบน แขนข้างยาวอยู่ด้านล่าง

ขั้นตอนการจัดทำแคโรไทป์

1) เลือกเซลล์ในระยะเมทาเฟส ที่มีขนาดของโครโมโซมไม่ยาวหรือสั้นเกินไป มีการกระจายที่ไม่ซ้อนทับกัน และนับจำนวนโครโมโซมได้ครบเท่ากับจำนวนโครโมโซมของสิ่งมีชีวิตชนิดนั้น ถ่ายภาพเซลล์ที่เลือกไว้โดยใช้เลนส์วัตถุกำลังขยาย 100X เลือกรวบรวมจำนวน ชนิดละ 20 เซลล์

2) ใช้รูปถ่ายที่ได้ในการจับคู่โครโมโซมที่เหมือนกัน โดยกำหนดตำแหน่งของเซนโทรเมียร์ของโครโมโซมแต่ละแท่งในเซลล์ จากนั้นวัดค่าความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาว ค่าความยาวของแขนโครโมโซมข้างสั้น นำค่าที่ได้มาคำนวณหาความยาวของโครโมโซมแต่ละแท่ง การวัดค่าความยาวของโครโมโซมอาจจะใช้วิธีการตัดโครโมโซมออกมาจากรูปถ่ายที่ละแท่ง กำหนดหมายเลขให้โครโมโซมทุกแท่งก่อนการวัด เมื่อวัดความยาวเสร็จแล้วจึงจับคู่โครโมโซมที่มีความยาวของแขนแต่ละข้าง และความยาวทั้งแท่งใกล้เคียงกันมากที่สุด

3) การคำนวณค่า relative length (RL) คำนวณได้จากสูตร ดังนี้

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

การใช้ค่า RL นี้สามารถช่วยในการจับคู่โครโมโซมได้แน่นอนกว่าการใช้ค่าความยาวของโครโมโซม เพราะค่า RL ของโครโมโซมแต่ละแท่งจะคงที่ในทุก ๆ เซลล์ ส่วนค่าความยาวของโครโมโซมจะแตกต่างกันไปในเซลล์แต่ละเซลล์

4) การคำนวณค่า centromeric index (CI) คำนวณได้จากสูตร ดังนี้

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

นำค่า CI ที่ได้นำมาระบุชนิดของโครโมโซม โดยใช้เกณฑ์ ดังนี้

ค่า CI อยู่ระหว่าง 0.500–0.599 จัดเป็นโครโมโซมชนิดเมทาเซนตริก

ค่า CI อยู่ระหว่าง 0.600–0.699 จัดเป็นโครโมโซมชนิดซับเมทาเซนตริก

ค่า CI อยู่ระหว่าง 0.700–0.899 จัดเป็นโครโมโซมชนิดอะโครเซนตริก

ค่า CI อยู่ระหว่าง 0.900–1.000 จัดเป็นโครโมโซมชนิดเทโลเซนตริก

5) การกำหนดขนาดของโครโมโซม แบ่งขนาดของโครโมโซมออกเป็น 3 ขนาด โดยกำหนดให้โครโมโซมคู่ที่ยาวที่สุดเป็นโครโมโซมคู่ที่ 1 และโครโมโซมคู่ที่สั้นที่สุดเป็นโครโมโซมคู่สุดท้าย

โครโมโซมขนาดใหญ่ (large=L) คือ โครโมโซมที่มีความยาวมากกว่าครึ่งหนึ่งของผลบวกความยาวเฉลี่ยของโครโมโซมใหญ่ที่สุด รวมกับโครโมโซมคู่เล็กที่สุด

$$\text{ดังนั้น } L > \frac{LT \text{ เฉลี่ยคู่ที่ } 1 + LT \text{ เฉลี่ยคู่สุดท้าย}}{2}$$

โครโมโซมขนาดกลาง (medium=M) คือ โครโมโซมที่มีค่าความยาวน้อยกว่าครึ่งหนึ่งของความยาวเฉลี่ยของโครโมโซมใหญ่ที่สุด รวมกับโครโมโซมคู่เล็กที่สุด

$$\text{ดังนั้น } M \leq \frac{LT \text{ เฉลี่ยคู่ที่ } 1 + LT \text{ เฉลี่ยคู่สุดท้าย}}{2}$$

โครโมโซมขนาดเล็ก (small=S) ได้แก่ โครโมโซมที่มีความยาวน้อยกว่าครึ่งหนึ่งของความยาวเฉลี่ยของโครโมโซมใหญ่ที่สุด

$$\text{ดังนั้น } S < \frac{LT \text{ เฉลี่ยคู่ที่ } 1}{2}$$

6) จัดเรียงแคริโอไทป์ ให้เรียงตามชนิดโครโมโซมก่อน แล้วค่อยเรียงตามความยาวของโครโมโซมแต่ละคู่จากมากไปหาน้อย ยกเว้นโครโมโซมเพศจะวางเป็นคู่สุดท้ายมุมล่างซ้าย ต้องบอกหมายเลขของโครโมโซมแต่ละคู่ด้านล่างวางแท่งโครโมโซมให้แขนข้างสั้นอยู่ด้านบน แขนข้างยาวอยู่ด้านล่าง และนิยมวางแท่งโครโมโซมให้ตำแหน่งเซนโทรเมียร์ตรงกัน

3.6 การทำอิดิโอแกรมมาตรฐาน

อิดิโอแกรม คือ ไดอะแกรมแสดงแคริโอไทป์ของโครโมโซม 1 ชุดแฮพลอยด์ ซึ่งประกอบด้วยโครโมโซมร่างกาย และโครโมโซมเพศ โดยใช้ข้อมูลค่าเฉลี่ยความยาวของโครโมโซมรูปร่างของโครโมโซม และตำแหน่งเซนโทรเมียร์ อิดิโอแกรมจากเทคนิคการย้อมสีโครโมโซมแบบธรรมดาใช้เซลล์ระยะเมทาเฟสชนิดละ 20 เซลล์ นำมาจัดแคริโอไทป์ แล้ววัดความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาว และแขนโครโมโซมข้างสั้นของโครโมโซมทุกคู่ด้วยเวอร์เนีย (vernier) จัดทำภาพวาดอิดิโอแกรมด้วยคอมพิวเตอร์ โดยการนำค่าเฉลี่ยความยาวของโครโมโซมแต่ละคู่มาสร้างกราฟโดยใช้โปรแกรม Microsoft Excel ให้แกนตั้ง (Y) เป็นความยาวของโครโมโซมแต่ละคู่ และแกนนอน (X) เป็นลำดับของโครโมโซมคู่ที่ใหญ่ที่สุดไปหาคู่ที่เล็กที่สุด ยกเว้นโครโมโซมเพศจัดเป็นคู่สุดท้าย แล้วนำมาปรับรูปร่างของโครโมโซมโดยใช้โปรแกรม Microsoft Word หรือ Microsoft Powerpoint (อลงกลต แทนอมทอง, 2554)

4 ศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ระดับโมเลกุล

การศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ระดับโมเลกุล ประกอบด้วย ขั้นตอนการเตรียมโครโมโซม การเตรียมโพรบ การทำพรีทรีตเมนต์ (pre-treatment) การทำไฮบริดเซชัน (hybridization) และการวิเคราะห์ผล ดัดแปลงจาก Liehr (2009) และอลงกลต แทนอมทอง (2554)

4.1 ขั้นตอนการเตรียมสไลด์เหมือนกับการศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์

4.2 การทำพรีทรีตเมนต์มีขั้นตอนดังนี้

- 1 นำสไลด์ไปอบที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลาอย่างน้อย 2 ชั่วโมง
 - 2 เตรียมน้ำกลั่น 95 มิลลิลิตร ผสมกับกรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid) 0.2 โมลาร์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในโถย้อมสี จากนั้นนำไปอุ่นในอ่างน้ำอุ่นให้ได้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส
 - 3 เติมสารละลายเปปซิน (pepsin) ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงในโถย้อมสีในข้อ 4.2.2
 - 4 จุ่มแผ่นสไลด์ในโถย้อมสีที่เตรียมไว้ในอ่างน้ำอุ่น เป็นระยะเวลา 3-5 นาที
 - 5 ล้างแผ่นสไลด์ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Phosphate buffer) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที
 - 6 หยดสารละลายโพสฟิฟิกเซชัน (post-fixation solution) ที่มีส่วนผสมพาราฟอร์มัลดีไฮด์ (paraformaldehyde) 500 ไมโครลิตร สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 1 เท่า (1X PBS) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และสารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ (magnesium chloride) ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงบนกระจกปิดสไลด์ชนิดยาว (25 X 50 มิลลิเมตร) จากนั้นวางสไลด์บนกระจกปิดสไลด์ และบ่มเป็นเวลา 10 นาที
 - 7 นำกระจกปิดสไลด์ออก และล้างในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 1 เท่า เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำสไลด์ไปล้างด้วยน้ำกลั่นนาน 5 นาที
 - 8 ทำการดึงน้ำออกจากเซลล์โดยผ่านในลำดับแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 75%, 95% และ 100% ตามลำดับ เป็นเวลาลำดับละ 3 นาที แล้วปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง
- 4.3 การเตรียมโพรบ
- โพรบที่จะศึกษาในครั้งนี้ ได้แก่ โพรบไรโบโซม 18S และโพรบไมโครแซทเทลไลต์ จำนวน 3 โพรบ ได้แก่ (CA)₁₅, (GC)₁₅, (CAT)₁₀.
- 4.3.1 ไรโบโซมอล อาร์เอ็นเออินโพรบ ชนิด 18S rDNA เตรียมโดยกระบวนการปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส จากดีเอ็นเอของปลาแรดที่มีขนาดความยาวของเบส 1,400 คู่ของยีน 18S rRNA ตามวิธีของซิออฟฟิและคณะ (Cioffi et al., 2009) ซึ่งใช้ไพรเมอร์มีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้
- 18S rDNA
- | | |
|---------|-----------------------------|
| Forward | 5' CCGCTTTGGTGA CTCTTGAT 3' |
| Reverse | 5' CCGAGGACCTCACTAAACCA 3' |
- ส่วนประกอบของสารละลายที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ดังตารางที่ 1 แล้วเข้าสู่ขั้นตอนปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ตามขั้นตอนที่กำหนด
- ขั้นตอนปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ในการทำโพรบ
- ใช้เครื่อง Thermal cycle รุ่น Palm cyler ซึ่งการทำงานประกอบด้วย 3 ขั้นตอน ดังนี้
- ขั้นตอนที่ 1 Initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที
- จำนวน 1 รอบ
- ขั้นตอนที่ 2 Denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที
- Annealing ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที
- Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 30 วินาที

ทำซ้ำขั้นตอนที่ 2 จำนวน 35 รอบ

ขั้นตอนที่ 3 Final extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที จำนวน 1 รอบ

ตารางที่ 2 ส่วนประกอบของสารละลายที่ใช้ในปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอเรส เพื่อสร้างโพรบ

ส่วนประกอบของสารละลาย	ปริมาตร (μ l)
1. 50 ng DNA template	1.0
2. 10 μ M Forward Primer	0.5
3. 10 μ M Reverse Primer	0.5
4. dNTPs (1.25 mM)	3.2
5. PCR Buffer 10x	2.5
6. $MgCl_2$ (50mM)	0.75
7. Taq DNA pol (5U/ μ l)	0.1
8. Distilled water	16.45
ปริมาตรรวม	25

หลังจากนั้นนำโพรบ 18S rDNA ไปติดฉลากแบบโดยตรงด้วยสารเรืองแสงสเปกตรัม ออร์เรนจ์ (spectrum orange-dUTP) (Roche, Mannheim, Germany) ด้วยวิธีนิค ทรานสเลชัน (nick translation) (Morrison, Ramakrishnan, Ruffalo, & Wilber, 2002)

4.3.2 โพรบไมโครแซทเทลไลท์ เตรียมโดยวิธีการของ Kubat et al. (2008) และติดฉลากโดยตรงตำแหน่ง 5' ด้วย Cy3 โดยบริษัท Sigma (St. Louis, MO, USA)

4.4 การทำไฮบริไดเซชัน

4.4.1 ไรโบโซมอล อาร์เอ็นเออินโพรบ ชนิด 18S rDNA มีขั้นตอนดังนี้

1. นำแผ่นสไลด์ไปบ่มกับสารละลายฟอร์มามิดีไฮด์ความเข้มข้นร้อยละ 70 ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที
2. นำแผ่นสไลด์มาแช่ในสารละลายแอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 70 ที่เย็นจัดที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที
3. ย้ายแผ่นสไลด์ไปแช่ในลำดับแอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 95 และ 100 ตามลำดับ ที่อุณหภูมิห้องลำดับละ 2 นาที จากนั้นเป่าให้แห้งอย่างรวดเร็ว
4. นำสารละลายโพรบไริโบโซมอล อาร์เอ็นเออินโพรบ ชนิด 18S rDNA ไปบ่มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที โดยส่วนผสมของโพรบ มีดังนี้ 2.5 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ดีไอออไนด์ ฟอว์มาไมด์ (deionized formamide) ความเข้มข้นร้อยละ 50 และสารละลายเดกซ์แทรนซัลเฟต (dextran sulphate) ความเข้มข้นร้อยละ 10

(ในระหว่างขั้นตอนที่ 1-3 ต้องทำให้แล้วเสร็จพร้อมกันกับขั้นตอนที่ 4)

5. หยดสารละลายโพรบที่ถูกทำให้เสียสภาพ (denatured) ลงบนสไลด์ แล้วปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ จากนั้นนำไปบ่มในที่ชื้นและมีดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส
6. นำสไลด์ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในที่มืดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำแผ่นสไลด์ออกจากที่มืด แล้วนำกระจกปิดสไลด์ออกจากแผ่นสไลด์
7. ทำการล้างโพรบส่วนเกินออก โดยแช่ในสารละลายซาไลน์โซเดียมซิเตรท (1X SSC) ที่ถูกทำให้อุ่นอุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 นาที
8. ล้างแผ่นสไลด์ในสารละลายโซเดียมซิเตรทคลอไรด์ 4 เท่า (4X) ที่อุณหภูมิห้องและทำการเขย่าเป็นเวลา 5 นาที
9. ดึงน้ำออกจากเซลล์ด้วยการผ่านในลำดับของแอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 70, 95 และ 100 ตามลำดับ ลำดับละ 2 นาที แล้วปล่อยให้แห้งในที่มืด
10. ย้อมสไลด์ด้วยสารละลายแคปรีมาตร 20 ไมโครลิตร ปิดสไลด์ด้วยกระจกปิดสไลด์ยาว จากนั้นนำไปตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ หรือเก็บในกล่องที่บ่งแสงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4.4.2 โพรบไมโครแซทเทลไลท์ มีขั้นตอนดังนี้

1. นำแผ่นสไลด์ไปบ่มกับสารละลายฟอร์มามีด์ไฮดรอกไซด์ 70% ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที
2. นำแผ่นสไลด์มาแช่ในสารละลายแอลกอฮอล์ 70% ที่เย็นจัดที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที
3. ย้ายแผ่นสไลด์ไปแช่ในลำดับแอลกอฮอล์ 95% และ 100% ตามลำดับ ที่อุณหภูมิห้องลำดับละ 2 นาที จากนั้นเป่าให้แห้งอย่างรวดเร็ว
4. นำสารละลายโพรบไมโครแซทเทลไลท์ (CA)₁₅, (GC)₁₅, และ (CAT)₁₀ ไปบ่มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที โดยส่วนผสมของโพรบ มีดังนี้ 2.5 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ดีไอออนไนซ์ ฟอรัมาไมด์ (deionized formamide) 50% และสารละลายเดกซเทรนซัลเฟต (dextran sulphate) 10%

(ในระหว่างขั้นตอนที่ 1-3 ต้องทำให้แล้วเสร็จพร้อมกันกับขั้นตอนที่ 4)

5. หยดสารละลายโพรบที่ถูกทำให้เสียสภาพ (denatured) ลงบนสไลด์ แล้วปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ จากนั้นนำไปบ่มในที่ชื้นและมีดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส
6. นำสไลด์ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในที่มืดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำแผ่นสไลด์ออกจากที่มืด แล้วนำกระจกปิดสไลด์ออกจากแผ่นสไลด์
7. ทำการล้างโพรบส่วนเกินออก โดยแช่ในสารละลายซาไลน์ โซเดียม ซิเตรท (1X SSC) ที่ถูกทำให้อุ่นอุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 นาที
8. ล้างแผ่นสไลด์ในสารละลายโซเดียมซิเตรทคลอไรด์ 4 เท่า (4X) ที่อุณหภูมิห้องและทำการเขย่าเป็นเวลา 5 นาที
9. ดึงน้ำออกจากเซลล์ด้วยการผ่านในลำดับของแอลกอฮอล์ 70%, 95% และ 100% ตามลำดับ ลำดับละ 2 นาที แล้วปล่อยให้แห้งในที่มืด

10. ย้อมสีสไลด์ด้วยสารละลายแคปปีปริมาตร 20 ไมโครลิตร ปิดสไลด์ด้วยกระจกปิดสไลด์ยาว จากนั้นนำไปตรวจสอบด้วยกล้องฟลูออเรสเซนซ์ หรือเก็บในกล่องทึบแสงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

5 การถ่ายภาพโครโมโซมและการวิเคราะห์ผล

ตรวจสอบสัญญาณเรืองแสงบนโครโมโซมในตำแหน่งที่จำเพาะต่อชนิดของสวยามชนิดพันธุ์หายาก 8 ชนิดจากลุ่มน้ำโขงในประเทศไทย ศึกษาเปรียบเทียบลักษณะการกระจายตัวของไมโครแซทเทลไลต์บนโครโมโซมของปลา ทั้ง 8 ชนิด

บทที่ 4

ผลการศึกษาวิจัย

4.1 พันธุศาสตร์ระดับเซลล์

ข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยาในปลาที่ศึกษาทั้ง 8 ชนิด แสดงดังในภาพที่ 1 ข้อมูลพันธุศาสตร์ระดับเซลล์ประกอบด้วยข้อมูลจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ จำนวนโครโมโซมพื้นฐาน แคริโอไทป์ ขนาดโครโมโซม โครโมโซมเครื่องหมายที่พบตำแหน่งนอร์ อิติโอแกรมมาตรฐาน ของโครโมโซมปลาแต่ละชนิดดังนี้

4.1.1 แคริโอไทป์ และอิติโอแกรมมาตรฐาน ของโครโมโซมของปลากาแดง

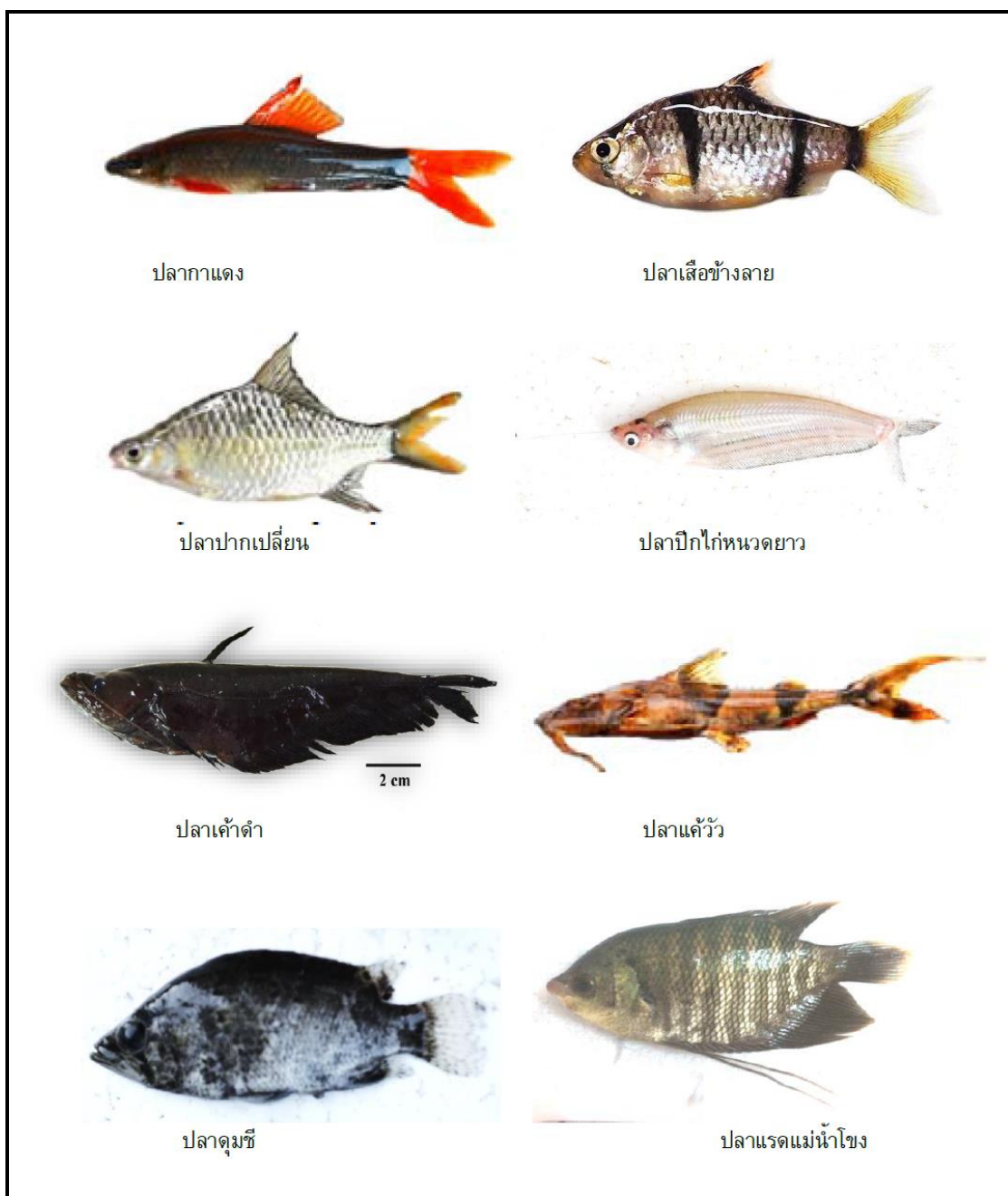
จำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ของปลากาแดง เท่ากับ 50 มีจำนวนโครโมโซมพื้นฐาน เท่ากับ 84 ไม่พบความแตกต่างของลักษณะโครโมโซมระหว่างเพศผู้และเพศเมีย แคริโอไทป์ของปลากาแดง ประกอบด้วย โครโมโซมชนิดเมทาเซนทริก-ซัปเมทาเซนทริก-อะโครเซนทริก-เทโลเซนทริก เท่ากับ 18-10-10-12 แห่ง มีโครโมโซม 2 ขนาดคือ โครโมโซมขนาดใหญ่- ขนาดกลาง จำนวน 14-36 แห่ง โครโมโซมเครื่องหมายของปลากาแดง ด้วยการย้อมด้วยเทคนิคแถบสีแบบบอร์ พบว่าปลากาแดง มีโครโมโซมที่มีตำแหน่งนอร์ 1 คู่ อยู่บนโครโมโซมชนิดซัปเมทาเซนทริกคู่ที่ 12 โดยตำแหน่งนอร์จะอยู่บนบริเวณที่เป็นแขนข้างสั้น อิติโอแกรมของปลากาแดงแสดงในรูปแบบแฮพลอยด์ การจัดเรียงตามชนิดโครโมโซม และขนาดตามลำดับ (ภาพที่ 2)

$$\text{สูตรแคริโอไทป์ในปลากาแดงคือ } 2n \text{ (diploid) } 50 = L^m_2 + L^{sm}_6 + L^a_6 + M^m_{12} + M^{sm}_2 + M^a_6 + M^t_{16}$$

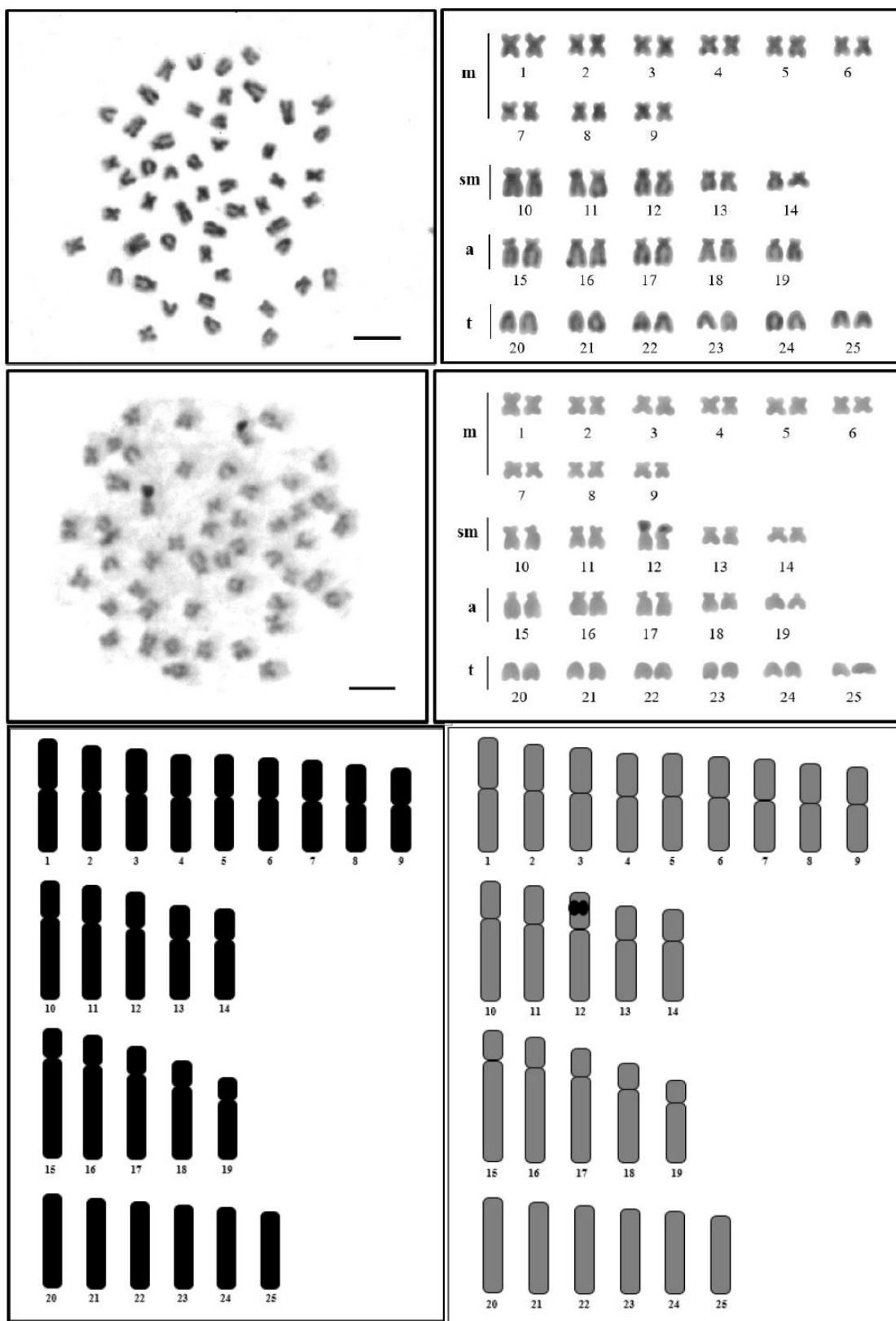
4.1.2 แคริโอไทป์ และอิติโอแกรมมาตรฐาน ของโครโมโซมของปลาเสือข้างลาย

จำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ของปลาเสือข้างลาย เท่ากับ 50 มีจำนวนโครโมโซมพื้นฐาน เท่ากับ 94 ไม่พบความแตกต่างของลักษณะโครโมโซมระหว่างเพศผู้และเพศเมีย แคริโอไทป์ของปลาเสือข้างลาย ประกอบด้วยโครโมโซมชนิดเมทาเซนทริก-ซัปเมทาเซนทริก-อะโครเซนทริก-เทโลเซนทริก เท่ากับ 6-24-14-6 แห่ง มีโครโมโซม 3 ขนาดคือ โครโมโซมขนาดใหญ่- ขนาดกลาง-ขนาดเล็ก จำนวน 32-8-10 แห่ง โครโมโซมเครื่องหมายของปลาเสือข้างลาย ด้วยการย้อมด้วยเทคนิคแถบสีแบบบอร์ พบว่าปลาเสือข้างลาย มีโครโมโซมที่มีตำแหน่งนอร์ 1 คู่ อยู่บนโครโมโซมชนิดเมทาเซนทริกคู่ที่ 1 โดยตำแหน่งนอร์จะอยู่บนบริเวณที่เป็นแขนข้างสั้น อิติโอแกรมของปลากาแดงแสดงในรูปแบบแฮพลอยด์ การจัดเรียงตามชนิดโครโมโซม และขนาดตามลำดับ (ภาพที่ 3)

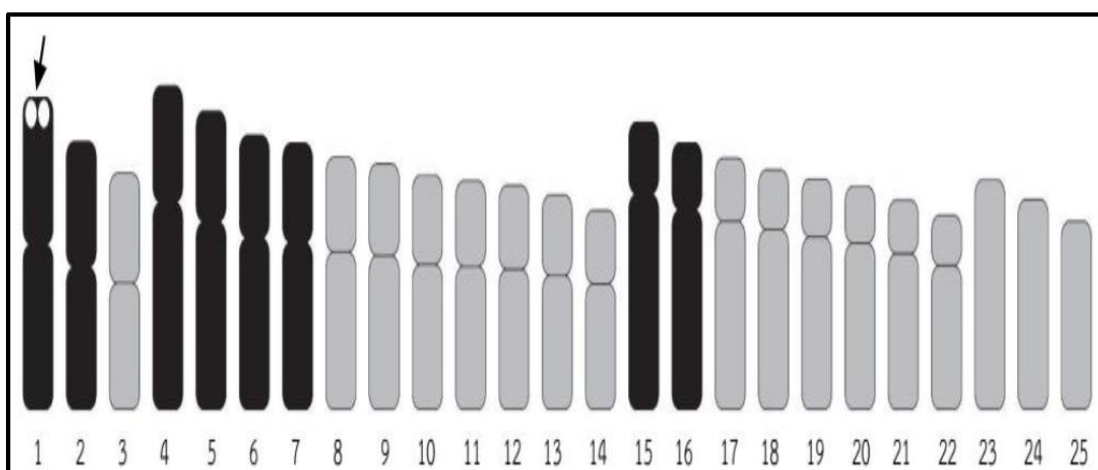
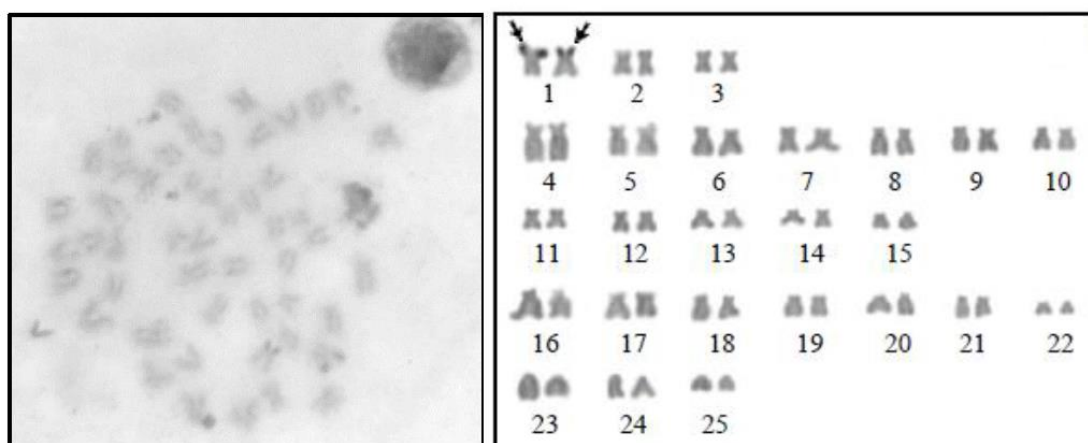
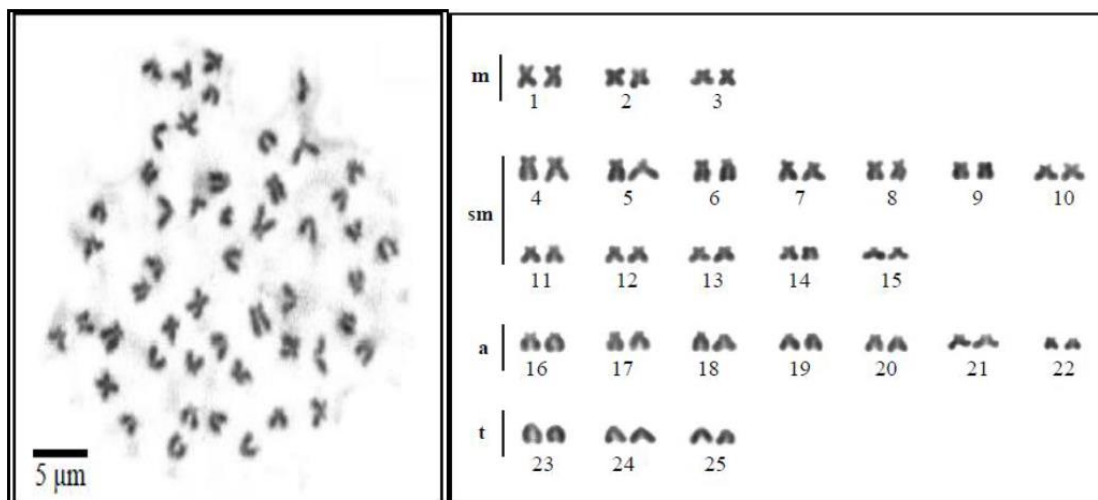
$$\text{สูตรแคริโอไทป์ในปลาเสือข้างลายคือ } 2n \text{ (diploid) } 50 = L^m_6 + L^{sm}_{22} + L^a_4 + M^{sm}_2 + M^a_6 + S^a_4 + S^t_6$$



ภาพที่ 1 ตัวอย่างปลาที่ศึกษา



ภาพที่ 2 เมทาเฟส แคริโอไทป์ และอิดิโอแกรมมาตรฐานจากการย้อมแบบธรรมดา และแถบสีแบบ นอร์ของปลากาแดง



ภาพที่ 3 เมทาเฟส แคริโอไทป์ และอิดิโอแกรมมาตรฐานจากการย้อมแบบธรรมดา และแถบสีแบบ
นอร์ของปลาเสือข้างลาย

4.1.3 แคริโอไทป์ และอิตีโอแกรมมาตรฐานของโครโมโซมของปลาปากเปลี่ยน

จำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ของปลาปากเปลี่ยน เท่ากับ 50 มีจำนวนโครโมโซมพื้นฐาน เท่ากับ 66 ไม่พบความแตกต่างของลักษณะโครโมโซมระหว่างเพศผู้และเพศเมีย แคริโอไทป์ของปลาปากเปลี่ยน ประกอบด้วย โครโมโซมชนิดเมทาเซนทริก-ซับเมทาเซนทริก-อะโครเซนทริก-เทโลเซนทริก เท่ากับ 4-12-0-34 แห่ง มีโครโมโซม 3 ขนาดคือ โครโมโซมขนาดใหญ่- ขนาดกลาง-ขนาดเล็ก จำนวน 14-34-2 แห่ง โครโมโซมเครื่องหมายของปลาปากเปลี่ยน ด้วยการย้อมด้วยเทคนิคแถบสีแบบนอร์ พบว่าปลาปากเปลี่ยน มีโครโมโซมที่มีตำแหน่งนอร์ 1 คู่ อยู่บนโครโมโซมชนิดเทโลเซนทริกคู่ที่ 9 โดยตำแหน่งนอร์จะอยู่บนบริเวณที่เป็นแขนข้างยาว อิตีโอแกรมของปลาปากเปลี่ยน แสดงในรูปแบบแฮพลอยด์ การจัดเรียงตามชนิดโครโมโซม และขนาดตามลำดับ (ภาพที่ 4)

$$\text{สูตรแคริโอไทป์ในปลาปากเปลี่ยนคือ } 2n \text{ (diploid) } 50 = L^m_4 + L^{sm}_8 + L^t_2 + M^{sm}_4 + M^t_{30} + S^t_2$$

4.1.4 แคริโอไทป์ และอิตีโอแกรมมาตรฐาน ของโครโมโซมของปลาปักโก่หนวดยาว

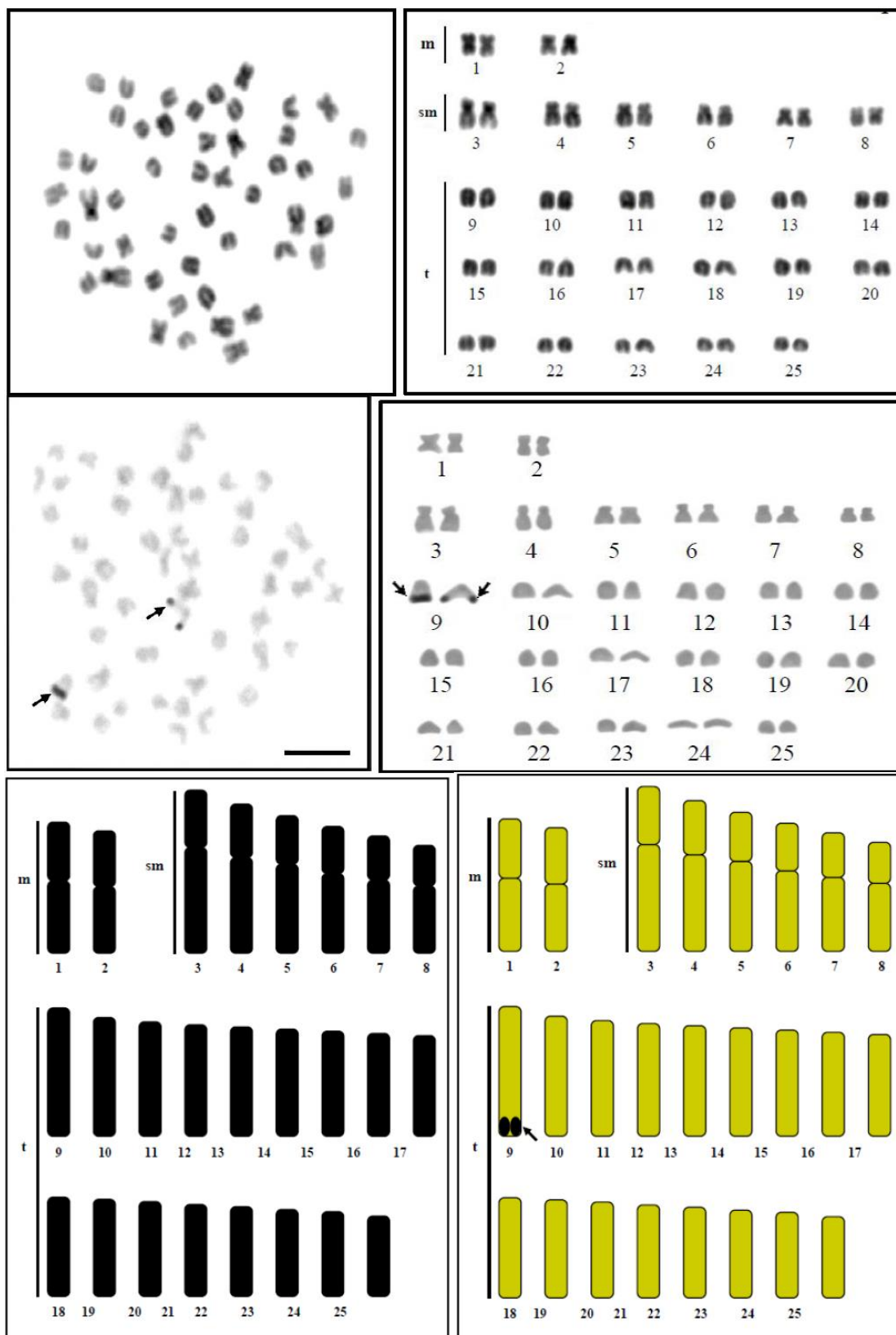
จำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ของปลาปักโก่หนวดยาว เท่ากับ 60 มีจำนวนโครโมโซมพื้นฐาน เท่ากับ 100 ไม่พบความแตกต่างของลักษณะโครโมโซมระหว่างเพศผู้และเพศเมีย แคริโอไทป์ของปลาปักโก่หนวดยาว ประกอบด้วย โครโมโซมชนิดเมทาเซนทริก-ซับเมทาเซนทริก-อะโครเซนทริก-เทโลเซนทริก เท่ากับ 12-14-14-20 แห่ง มีโครโมโซม 3 ขนาดคือ โครโมโซมขนาดใหญ่- ขนาดกลาง - ขนาดเล็ก จำนวน 22-28-10 แห่ง โครโมโซมเครื่องหมายของปลาปักโก่หนวดยาว ด้วยการย้อมด้วยเทคนิคแถบสีแบบนอร์ พบว่าปลาปักโก่หนวดยาว มีโครโมโซมที่มีตำแหน่งนอร์ 1 คู่ อยู่บนโครโมโซมชนิดซับเมทาเซนทริกคู่ที่ 8 โดยตำแหน่งนอร์จะอยู่บนบริเวณที่เป็นแขนข้างสั้น อิตีโอแกรมของปลาปักโก่หนวดยาว แสดงในรูปแบบแฮพลอยด์ การจัดเรียงตามชนิดโครโมโซม และขนาดตามลำดับ (ภาพที่ 5)

$$\text{สูตรแคริโอไทป์ในปลาปักโก่หนวดยาวคือ } 2n \text{ (diploid) } 60 = L^m_8 + L^{sm}_8 + L^a_6 + M^m_4 + M^{sm}_6 + M^a_8 + M^t_{10} + S^t_{10}$$

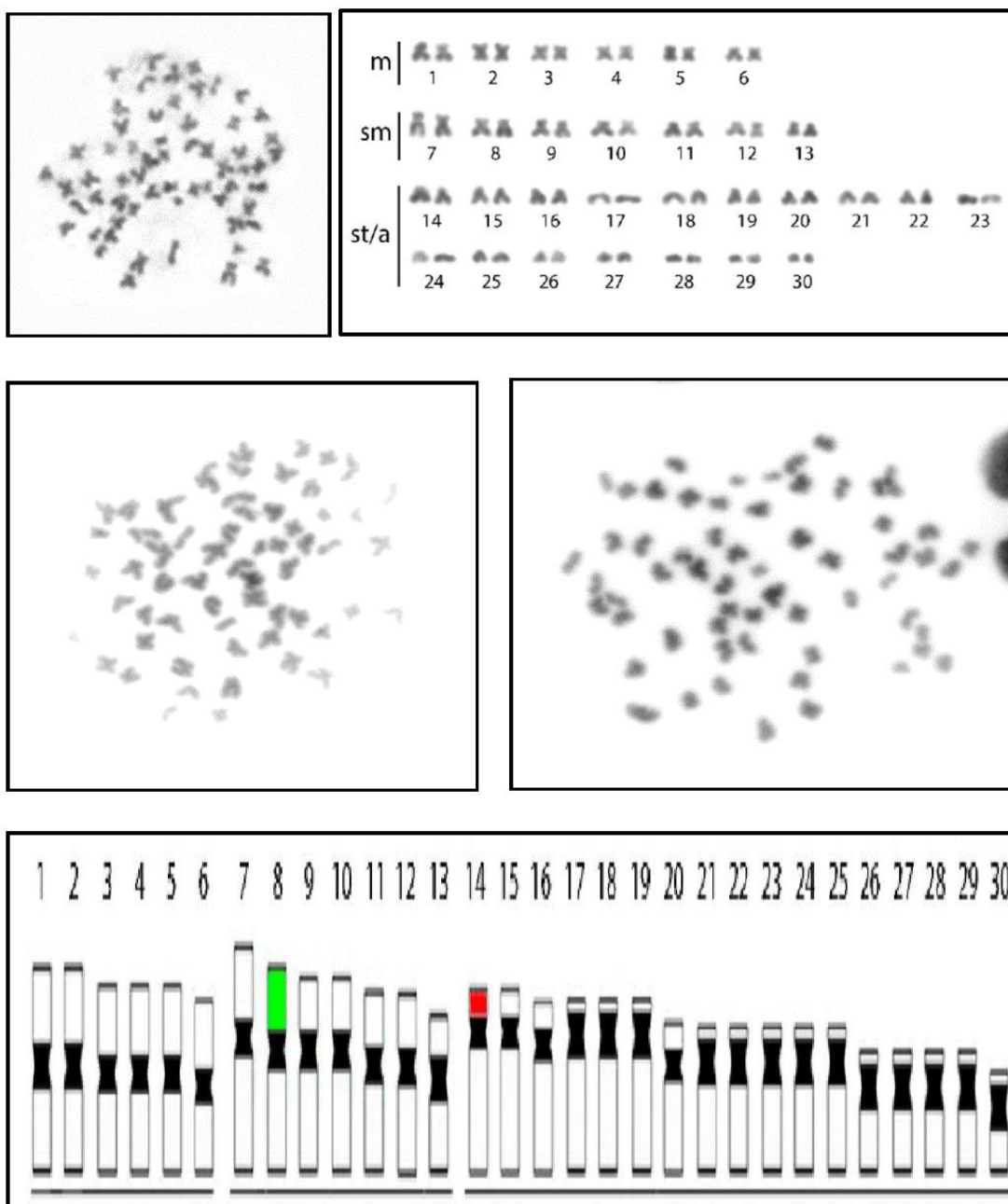
4.1.5 แคริโอไทป์ และอิตีโอแกรมมาตรฐาน ของโครโมโซมของปลาเค้าดำ

จำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ของปลาเค้าดำ เท่ากับ 56 มีจำนวนโครโมโซมพื้นฐาน เท่ากับ 100 ไม่พบความแตกต่างของลักษณะโครโมโซมระหว่างเพศผู้และเพศเมีย แคริโอไทป์ของปลาเค้าดำ ประกอบด้วย โครโมโซมชนิดเมทาเซนทริก-ซับเมทาเซนทริก-อะโครเซนทริก-เทโลเซนทริก เท่ากับ 18-20-6-12 แห่ง มีโครโมโซม 3 ขนาดคือ โครโมโซมขนาดใหญ่- ขนาดกลาง-ขนาดเล็ก จำนวน 16-28-12 แห่ง โครโมโซมเครื่องหมายของปลาเค้าดำ ด้วยการย้อมด้วยเทคนิคแถบสีแบบนอร์ พบว่าปลาเค้าดำ มีโครโมโซมที่มีตำแหน่งนอร์ 1 คู่ อยู่บนโครโมโซมชนิดซับเมทาเซนทริกคู่ที่ 10 โดยตำแหน่งนอร์จะอยู่บนบริเวณที่เป็นแขนข้างสั้น อิตีโอแกรมของปลาเค้าดำ แสดงในรูปแบบแฮพลอยด์ การจัดเรียงตามชนิดโครโมโซม และขนาดตามลำดับ (ภาพที่ 6)

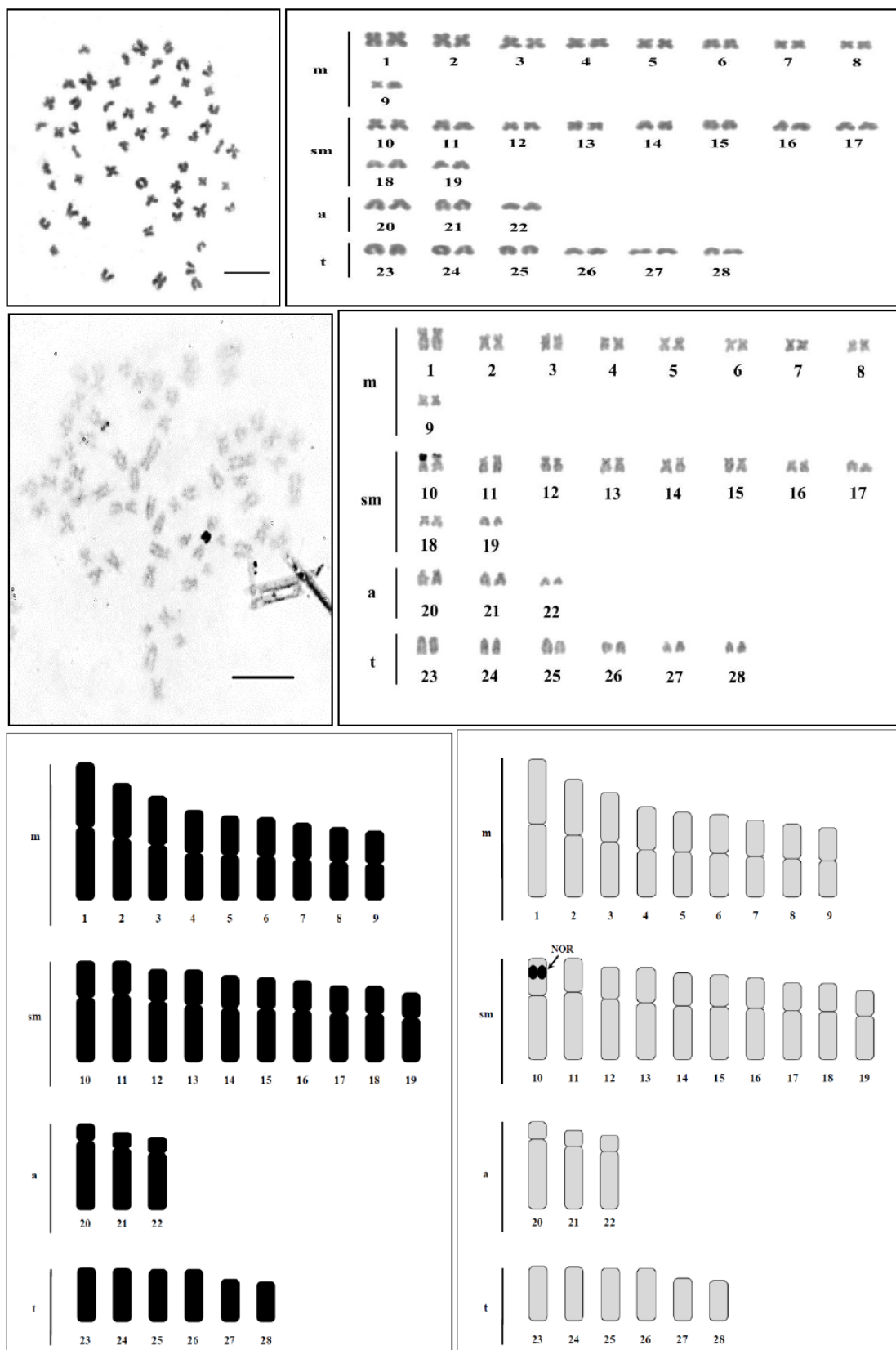
$$\text{สูตรแคริโอไทป์ใน ปลาเค้าดำคือ } 2n \text{ (diploid) } 56 = L^m_8 + L^{sm}_8 + M^m_{10} + M^{sm}_{12} + M^a_6 + S^t_{12}$$



ภาพที่ 4 เมทาเฟส แคริโอไทป์ และอิดิโอแกรมมาตรฐานจากการย้อมแบบธรรมดา และแถบสีแบบ
นอร์ซของปลาปากเปลี่ยน



ภาพที่ 5 เมทาเฟส แคริโอไทป์ และอิดิโอแกรมมาตรฐานจากการย้อมแบบธรรมดา และแถบสีแบบ นอร์ของปลาปักเป้าหนวดยาว



ภาพที่ 6 เมทาเฟส แคริโอไทป์ และอิดิโอแกรมมาตรฐานจากการย้อมแบบธรรมดา และแถบสีแบบนอร์ของเค้าน้ำ

4.1.6 แคริโอไทป์ และอิตีโอแกรมมาตรฐาน ของโครโมโซมของปลาแค้ว

จำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ของปลาแค้ว เท่ากับ 56 มีจำนวนโครโมโซมพื้นฐาน เท่ากับ 88 ไม่พบความแตกต่างของลักษณะโครโมโซมระหว่างเพศผู้และเพศเมีย แคริโอไทป์ของปลาแค้ว ประกอบด้วย โครโมโซมชนิดเมทาเซนทริก-ซับเมทาเซนทริก-อะโครเซนทริก-เทโลเซนทริก เท่ากับ 18-10-4-24 แห่ง มีโครโมโซม 3 ขนาดคือ โครโมโซมขนาดใหญ่- ขนาดกลาง-ขนาดเล็ก จำนวน 20-30-6 แห่ง โครโมโซมเครื่องหมายของปลาแค้ว ด้วยการย้อมด้วยเทคนิคแถบสีแบบบอร์ พบว่าปลาแค้ว มีโครโมโซมที่มีตำแหน่งบอร์ 1 คู่ อยู่บนโครโมโซมชนิดซับเมทาเซนทริกคู่ที่ 12 โดยตำแหน่งบอร์จะอยู่บนบริเวณที่เป็นแขนข้างสั้น อิตีโอแกรมของปลาแค้ว แสดงในรูปแบบแฮพลอยด์ การจัดเรียงตามชนิดโครโมโซม และขนาดตามลำดับ (ภาพที่ 7)

$$\text{สูตรแคริโอไทป์ในปลาแค้วคือ } 2n \text{ (diploid) } 56 = L^m_{10} + L^{sm}_6 + L^a_2 + L^t_2 + M^m_8 + M^{sm}_4 + M^a_2 + M^t_{16} + S^t_6$$

4.1.7 แคริโอไทป์ และอิตีโอแกรมมาตรฐาน ของโครโมโซมของปลาตุ้มซี

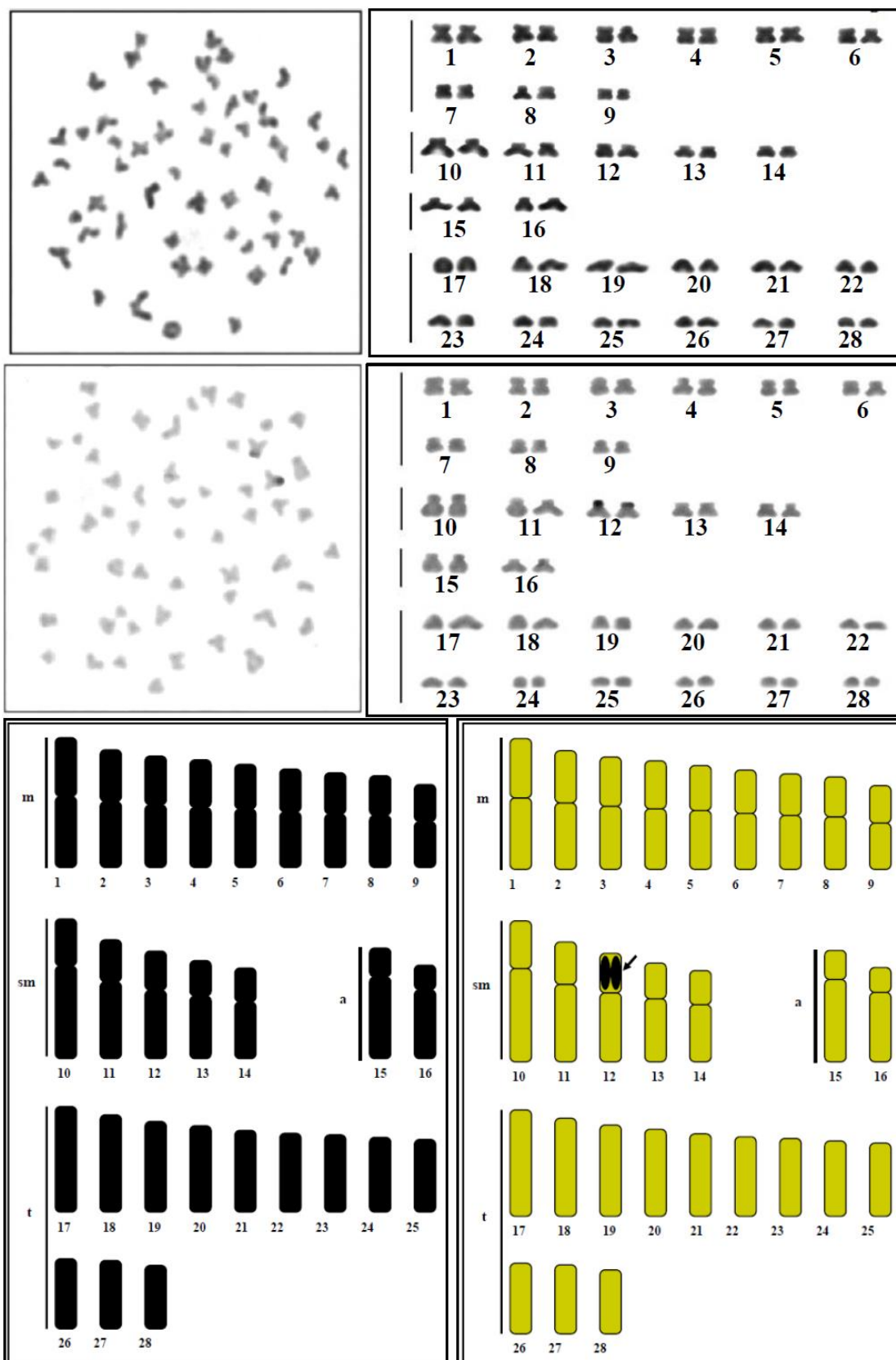
จำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ของปลาตุ้มซี เท่ากับ 48 มีจำนวนโครโมโซมพื้นฐาน เท่ากับ 90 ไม่พบความแตกต่างของลักษณะโครโมโซมระหว่างเพศผู้และเพศเมีย แคริโอไทป์ของปลาตุ้มซี ประกอบด้วย โครโมโซมชนิดเมทาเซนทริก-ซับเมทาเซนทริก-อะโครเซนทริก-เทโลเซนทริก เท่ากับ 8-20-12-8 แห่ง มีโครโมโซม 3 ขนาดคือ โครโมโซมขนาดใหญ่- ขนาดกลาง-ขนาดเล็ก จำนวน 12-34-2 แห่ง โครโมโซมเครื่องหมายของปลาตุ้มซี ด้วยการย้อมด้วยเทคนิคแถบสีแบบบอร์ พบว่าปลาตุ้มซี มีโครโมโซมที่มีตำแหน่งบอร์ 1 คู่ อยู่บนโครโมโซมชนิดเมทาเซนทริกคู่ที่ 1 โดยตำแหน่งบอร์จะอยู่บนบริเวณที่เป็นแขนข้างสั้น อิตีโอแกรมของปลาตุ้มซี แสดงในรูปแบบแฮพลอยด์ การจัดเรียงตามชนิดโครโมโซม และขนาดตามลำดับ (ภาพที่ 8)

$$\text{สูตรแคริโอไทป์ในปลาตุ้มซีคือ } 2n \text{ (diploid) } 48 = L^m_2 + L^{sm}_8 + L^a_2 + M^m_6 + M^{sm}_{12} + M^a_{10} + M^t_6 + S^t_2$$

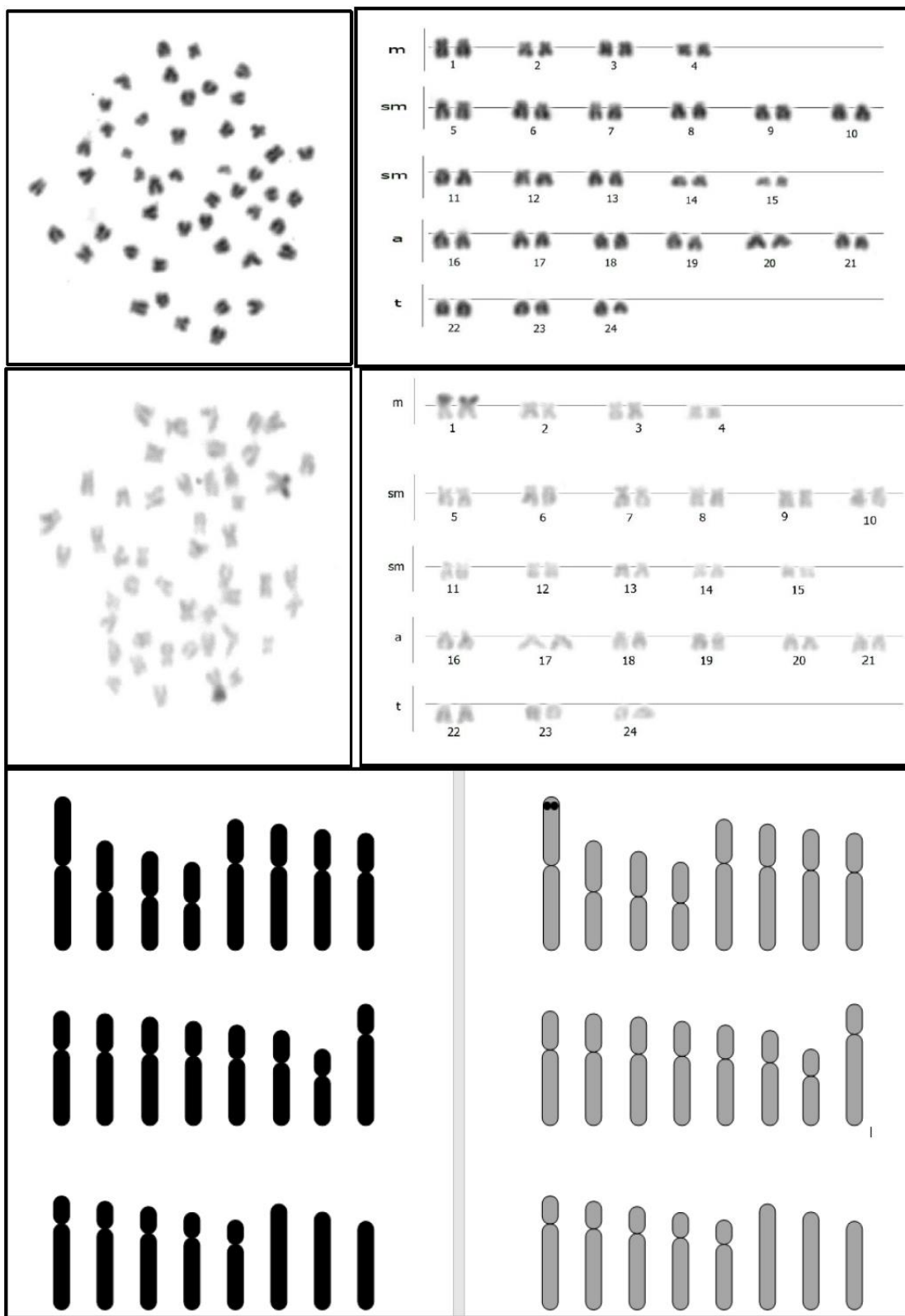
4.1.8 แคริโอไทป์ และอิตีโอแกรมมาตรฐาน ของโครโมโซมของปลาแรดแม่น้ำโขง

ปลาแรดแม่น้ำโขงมีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 48 แห่ง มีจำนวนโครโมโซมพื้นฐาน เท่ากับ 48 ทั้งเพศผู้ และเพศเมีย แคริโอไทป์ประกอบด้วยโครโมโซมขนาดใหญ่จำนวน 18 แห่ง โครโมโซมขนาดกลางจำนวน 30 แห่ง และชนิดโครโมโซมประกอบด้วยโครโมโซมชนิด เทโลเซนทริก ขนาดใหญ่ 18 แห่ง และเทโลเซนทริกขนาดกลาง 30 แห่ง พบโครโมโซมเครื่องหมายบริเวณเซนโทรเมียร์ของโครโมโซมคู่ที่ 15 ซึ่งเป็นโครโมโซมชนิดเทโทเซนทริกขนาดกลาง ทั้งนี้ไม่พบความแตกต่างของรูปร่างโครโมโซมเพศ และอิตีโอแกรมมาตรฐานด้วยเทคนิคการย้อมสีแบบธรรมดา และย้อมแบบบอร์ (ภาพที่ 9) ปลาแรดแม่น้ำโขงมีสูตรแคริโอไทป์ ดังนี้

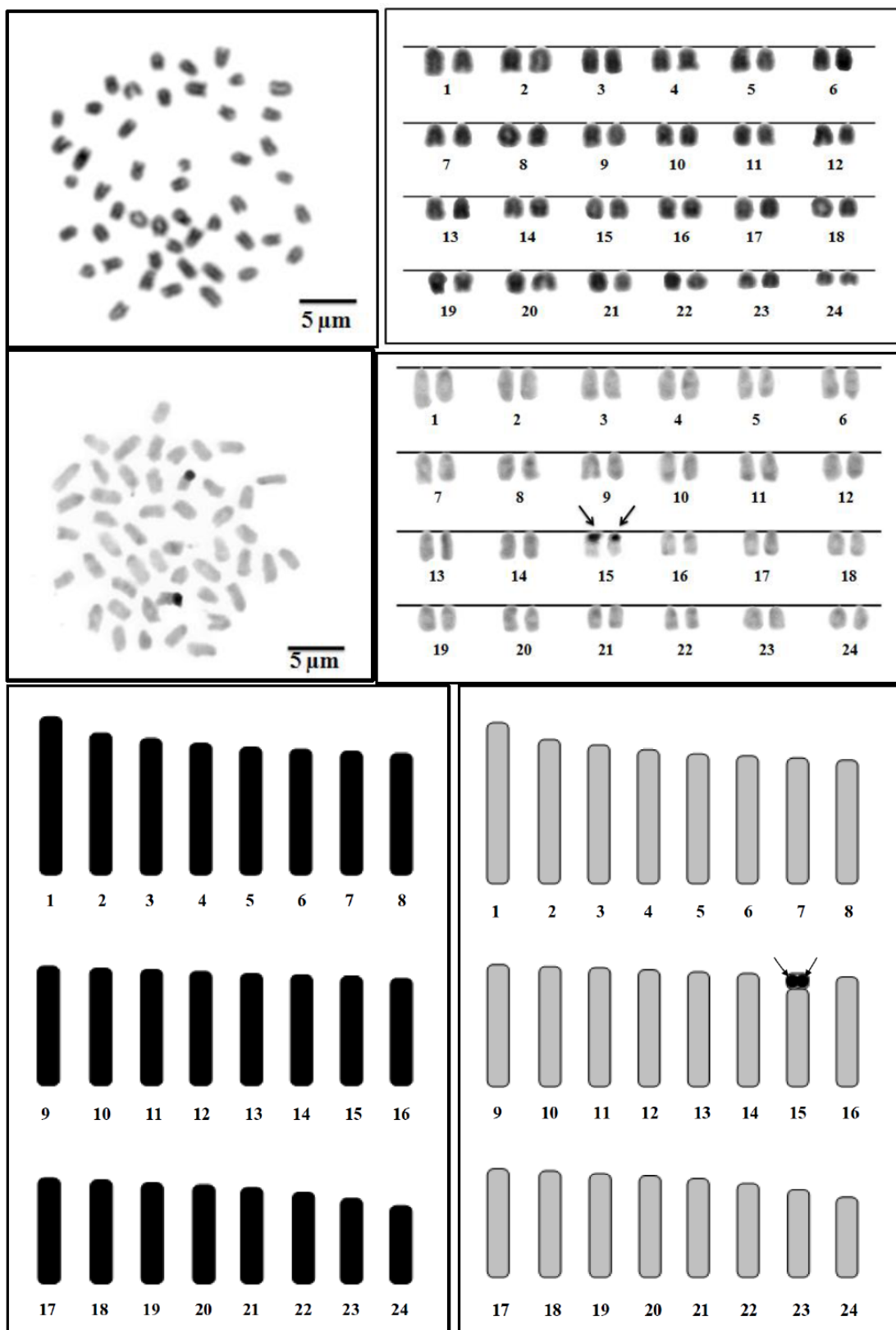
$$2n (48) = L^t_{18} + M^t_{30}$$



ภาพที่ 7 เมทาเฟส แคริโอไทป์ และอิดิโอแกรมมาตรฐานจากการย้อมแบบธรรมดา และแถบสีแบบ นอร์ของปลาแค้ว



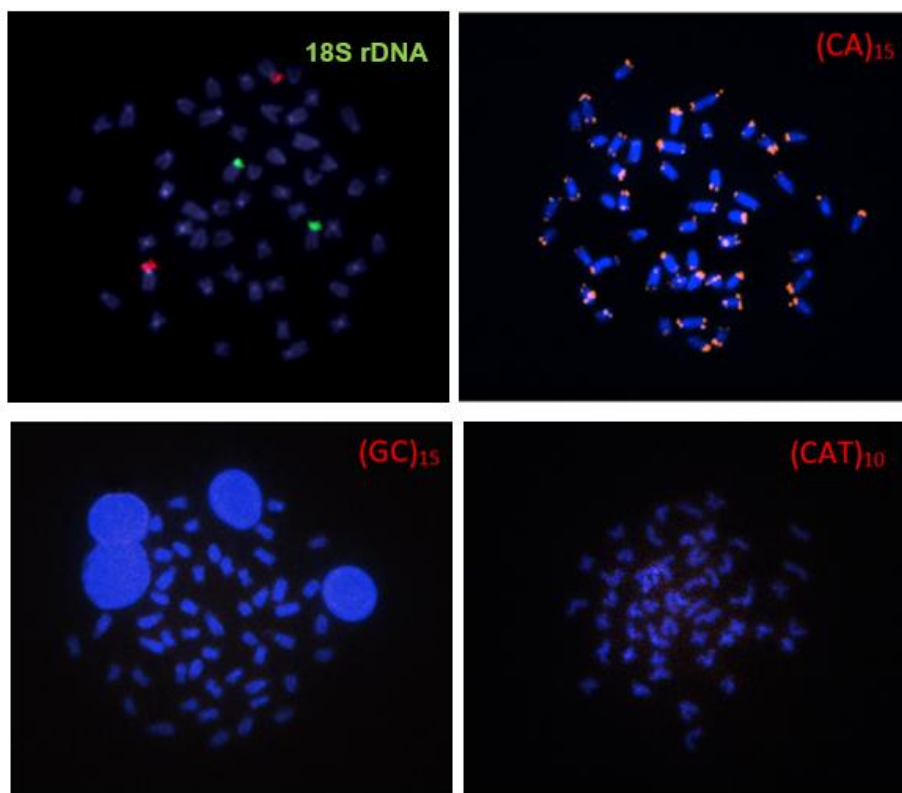
ภาพที่ 8 เมทาเฟส แคริโอไทป์ และอิดิโอแกรมมาตรฐานจากการย้อมแบบธรรมดา และแถบสีแบบ นอร์ของดุมซี



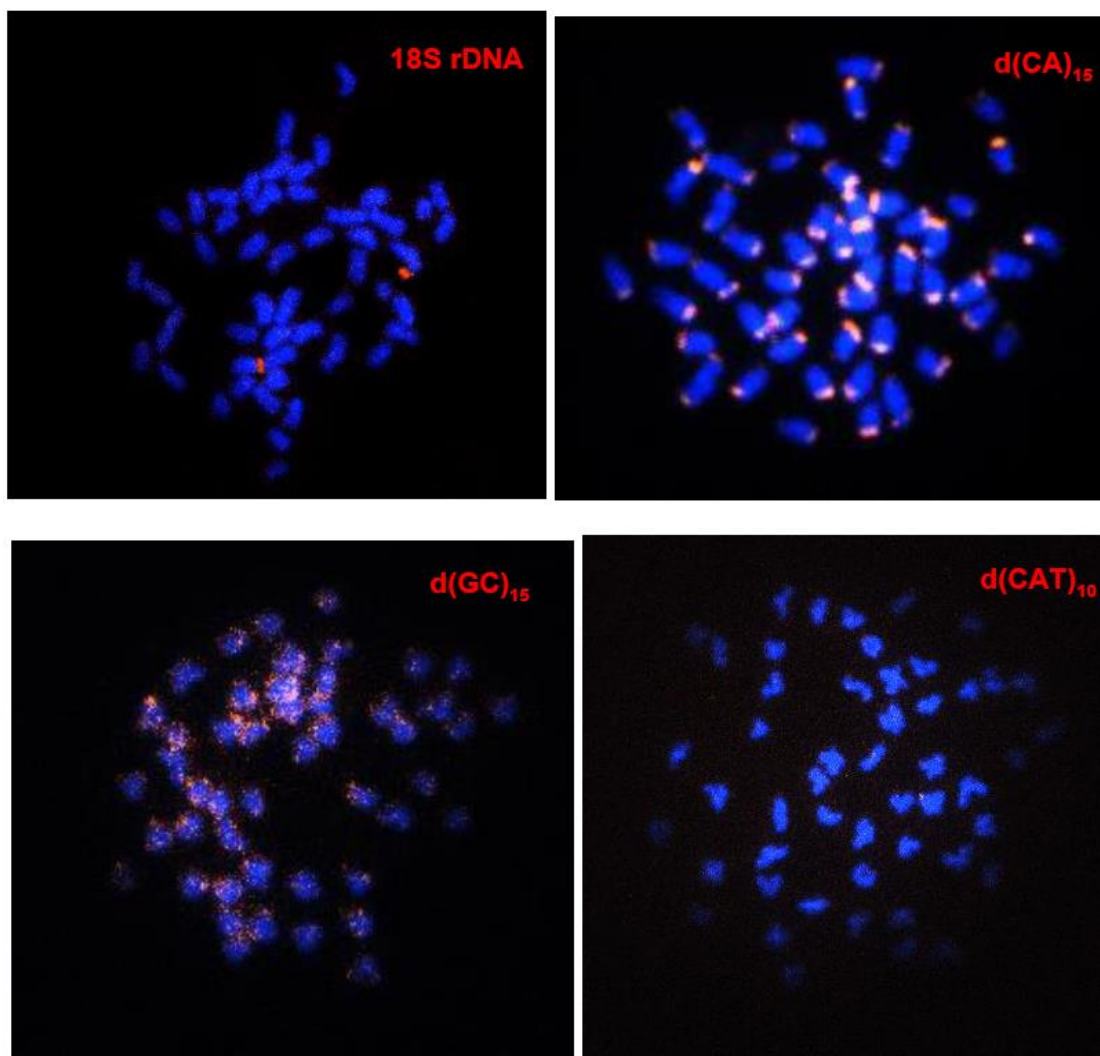
ภาพที่ 9 เมทาเฟส แคริโอไทป์ และอิติโอแกรมมาตรฐานจากการย้อมแบบธรรมดา และแถบสีแบบ
นอร์ซของปลาแรดแม่น้ำโขง

4.2 พันธุศาสตร์เซลล์ระดับโมเลกุล

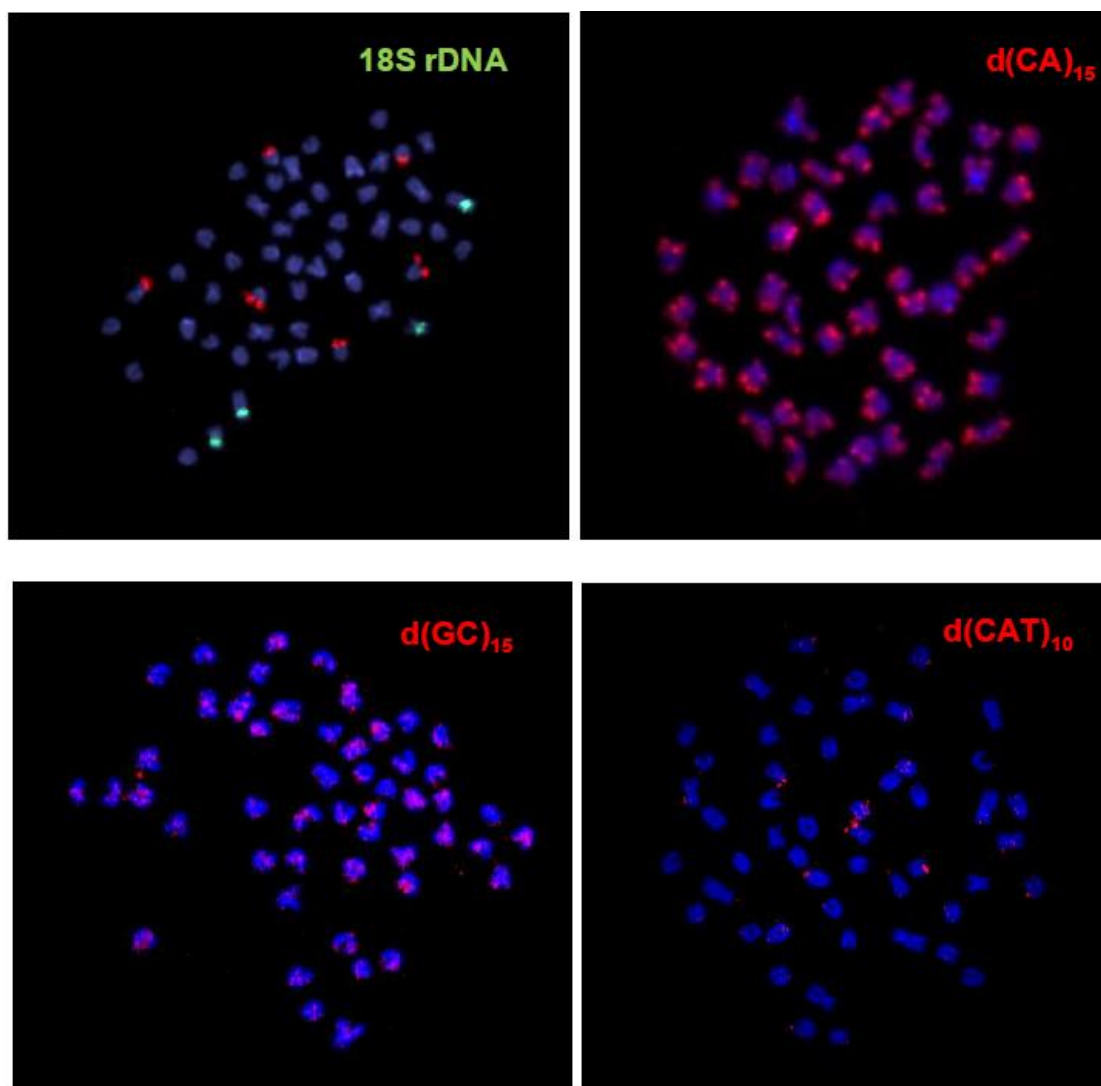
โดยศึกษาด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์ อินซิทู ไฮบริไดเซชัน โดยใช้โพรบไโรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ 18S โพรบไมโครแซทเทลไลต์ จำนวน 3 โพรบ ได้แก่ $d(CA)_{15}$, $d(GC)_{15}$ และ $d(CAT)_{10}$ ผลการศึกษาพบว่าปลากาแดงพบสัญญาณของโพรบไโรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ 18S 1 คู่ตรงตำแหน่งเดียวกับการย้อมแถบสีแบบนอร์ โพรบ $d(CA)_{15}$ พบบริเวณเทโลเมียร์ของโครโมโซมทุกคู่ บางคู่ติดเกือบทั้งแท่ง ซึ่งตรงข้ามกับสัญญาณโพรบ $d(GC)_{15}$ และ $d(CAT)_{10}$ ที่พบบางแท่งของโครโมโซมและไม่สะสมอย่างหนาแน่น (ภาพที่ 10) ปลาเสือข้างลายพบสัญญาณของโพรบไโรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ 18S 1 คู่ตรงตำแหน่งเดียวกับการย้อมแถบสีแบบนอร์ โพรบ $d(CA)_{15}$ พบบริเวณเทโลเมียร์ของโครโมโซมทุกคู่ บางคู่ติดเกือบทั้งแท่ง ส่วนสัญญาณโพรบ $d(CAT)_{10}$ ที่พบหนาแน่นตรงเทโลเมียร์ของโครโมโซมบางแท่ง ส่วนโพรบ $d(GC)_{15}$ พบตรงกระจายทั่วทั้งในบางแท่งและบริเวณเทโลเมียร์ของโครโมโซมบางแท่ง (ภาพที่ 11) ปลาปากเปลี่ยนพบสัญญาณของโพรบไโรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ 18S 4 แท่งตรงตำแหน่งเดียวกับการย้อมแถบสีแบบนอร์ และเพิ่มเติมอีก 2 แท่ง ตรงแขนสั้นของโครโมโซมชนิดซับเมทาเซนทริก โพรบ $d(CA)_{15}$ พบกระจายทั่วทั้งแท่งทุกแท่งและสะสมหนาแน่นบริเวณเทโลเมียร์ของโครโมโซมทุกคู่และทั้งแท่งยกเว้นตรงเซนโทรเมียร์ของบางแท่ง ส่วนสัญญาณโพรบ $d(GC)_{15}$ ที่พบหนาแน่นตรงบริเวณกลางแท่งและเทโลเมียร์ของโครโมโซมบางแท่ง และ $d(CAT)_{10}$ พบมีสัญญาณบริเวณเทโลเมียร์ของบางแท่งเท่านั้น (ภาพที่ 12) ปลาปีกไก่หนวดยาวพบสัญญาณของโพรบไโรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ 18S 1 คู่ตรงตำแหน่งเดียวกับการย้อมแถบสีแบบนอร์ โพรบ $d(CA)_{15}$, $d(GC)_{15}$ และโพรบ $d(CAT)_{10}$ พบบริเวณกลางแท่งและเทโลเมียร์ของโครโมโซมทุกคู่ แต่สะสมหนาแน่นตรงบางบริเวณของเทโลเมียร์ของโครโมโซมบางแท่ง แตกต่างแท่งกันในโพรบแต่ละชนิด (ภาพที่ 13) ปลาเค้าดำพบสัญญาณของโพรบไโรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ 18S 1 คู่ตรงตำแหน่งเดียวกับการย้อมแถบสีแบบนอร์ โพรบ $d(CA)_{15}$ และ $d(GC)_{15}$ พบหนาแน่นทั้งแท่งของโครโมโซมเกือบทุกคู่ บางคู่ไม่ติดเฉพาะตรงเซนโทรเมียร์ แต่โพรบ $d(GC)_{15}$ สัญญาณจะพบสะสมจางกว่าเล็กน้อย ซึ่งแตกต่างกับสัญญาณโพรบ $d(CAT)_{10}$ ที่กระจายบาง ๆ กลางแท่งของโครโมโซมหลายแท่ง และหนาแน่นตรงเทโลเมียร์ของโครโมโซมบางแท่ง (ภาพที่ 14) ปลาแค้วพบสัญญาณของโพรบไโรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ 18S 1 คู่ตรงตำแหน่งเดียวกับการย้อมแถบสีแบบนอร์ และมีสัญญาณ โพรบ $d(CA)_{15}$ พบกระจายทั่วทั้งโครโมโซมของบางคู่ และสะสมหนาแน่นตรงเทโลเมียร์ของโครโมโซมทุกแท่ง ซึ่งแตกต่างกับสัญญาณโพรบ $d(GC)_{15}$ และ $d(CAT)_{10}$ ที่พบหนาแน่นตรงเทโลเมียร์ของโครโมโซมส่วนใหญ่ บางแท่งพบสัญญาณทั้งแท่งโครโมโซม (ภาพที่ 15) ปลาคุมซีพบสัญญาณของโพรบไโรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ 18S 1 แท่ง ตรงกับตำแหน่งนอร์ สัญญาณโพรบ $d(CA)_{15}$ และ $d(CAT)_{10}$ พบกระจายทั่วทั้งแท่งโครโมโซมของบางคู่ และสัญญาณพบกระจายจาง ๆ ส่วนสัญญาณโพรบ $d(GC)_{15}$ ที่พบทุกแท่งและสะสมหนาแน่นทั้งโครโมโซมของโครโมโซมส่วนใหญ่ (ภาพที่ 16) และปลาแรดแม่น้ำโขงพบสัญญาณของโพรบไโรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ 18S 1 คู่ตรงตำแหน่งเดียวกับการย้อมแถบสีแบบนอร์ สัญญาณโพรบ $d(CA)_{15}$, $d(GC)_{15}$ และ $d(CAT)_{10}$ มีลักษณะคล้าย ๆ กัน พบกระจายทั่วโครโมโซมและหนาแน่นบางบริเวณของโครโมโซมทุกคู่ (ภาพที่ 17)



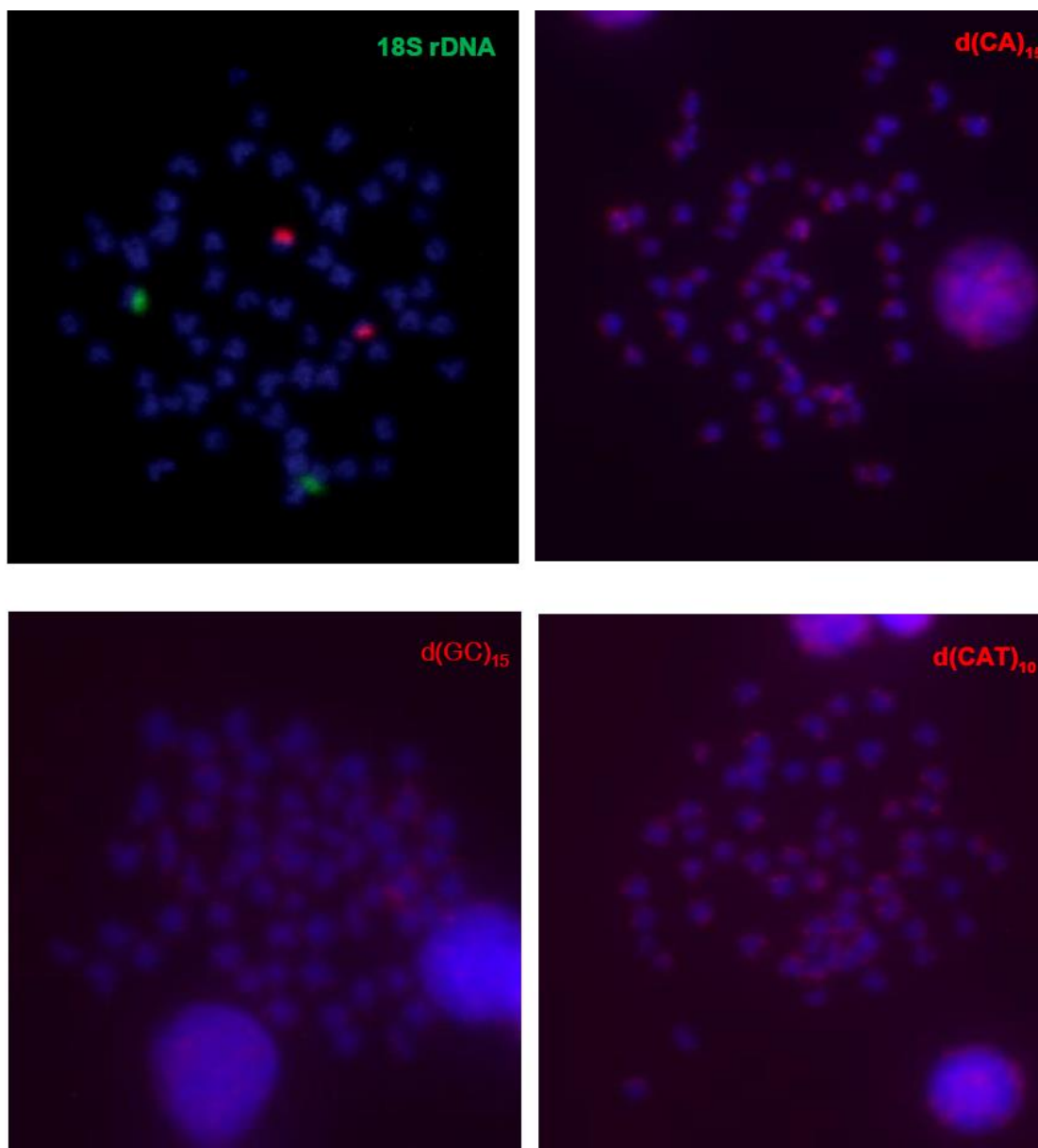
ภาพที่ 10 เมทาเฟสของปลากาแดง ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์ อินซิทู ไฮบริไดเซชัน โดยใช้โพรบไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ 18S โพรบไมโครแซทเทลไลต์ จำนวน 3 โพรบ ได้แก่ d(CA)₁₅, d(GC)₁₅ และ d(CAT)₁₀



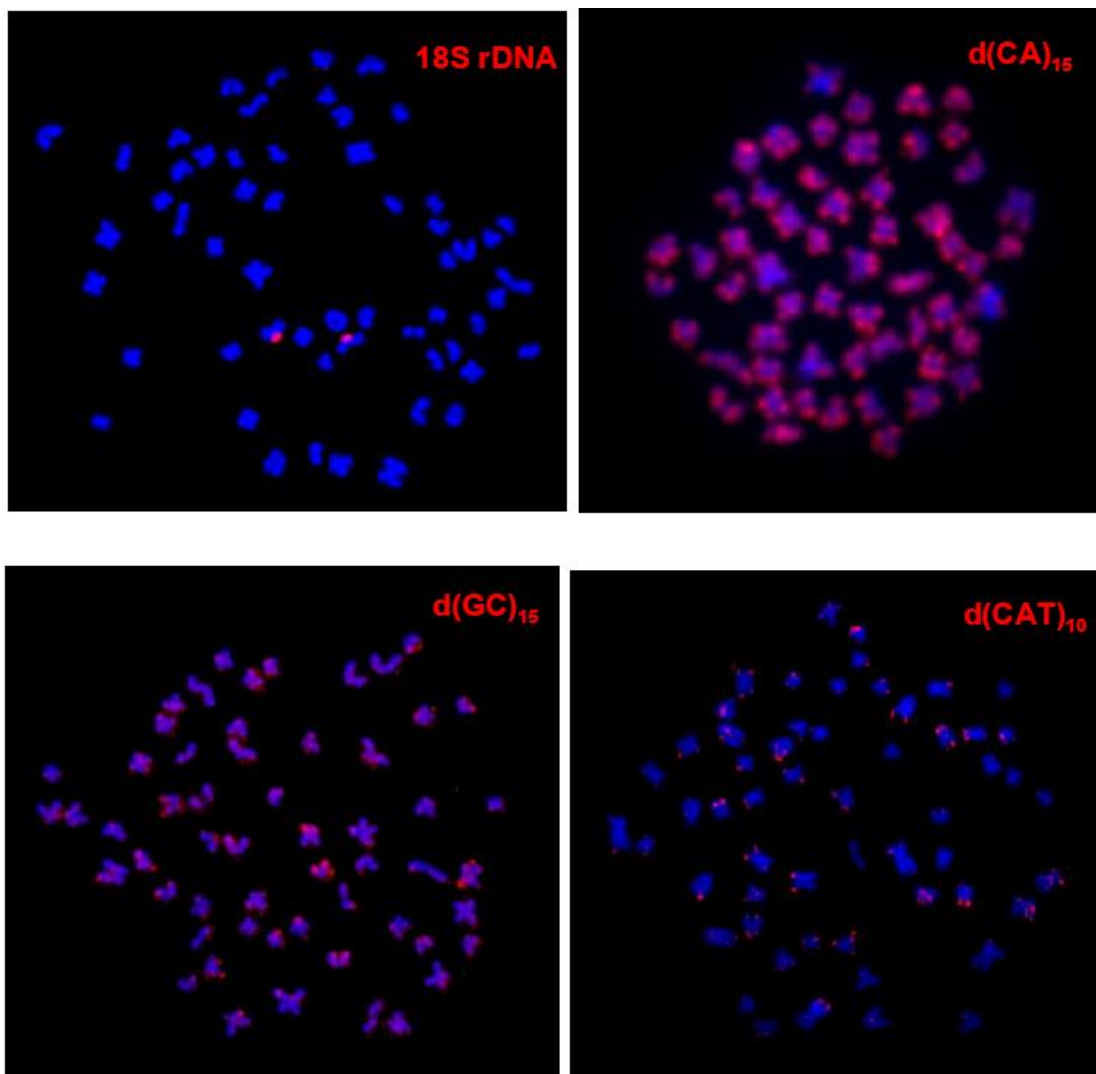
ภาพที่ 11 เมทาเฟสของปลาเสือข้างลาย ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์ อินซิทู ไฮบริไดเซชัน โดยใช้โพรบไรโบโซมอลาร์เอ็นเอ 18S โพรบไมโครแซทเทลไลต์ จำนวน 3 โพรบ ได้แก่ d(CA)₁₅, d(GC)₁₅ และ d(CAT)₁₀



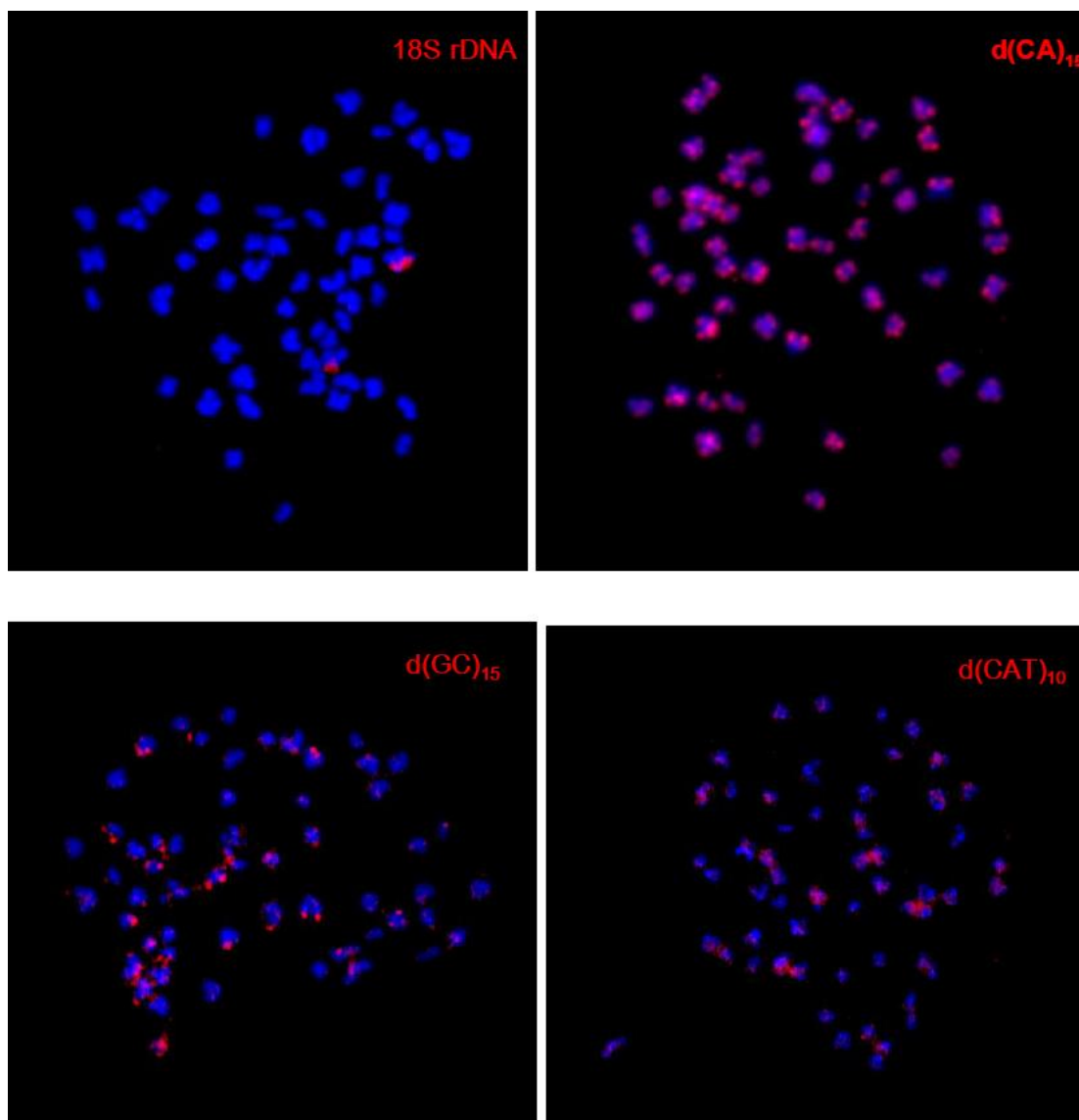
ภาพที่ 12 เมทาเฟสของปลาปากเปลี่ยน ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์ อินซิทู ไฮบริไดเซชัน โดยใช้โพรบไรโบโซมอลาร์เอ็นเอ 18S โพรบไมโครแซทเทลไลต์ จำนวน 3 โพรบ ได้แก่ d(CA)₁₅, d(GC)₁₅ และ d(CAT)₁₀



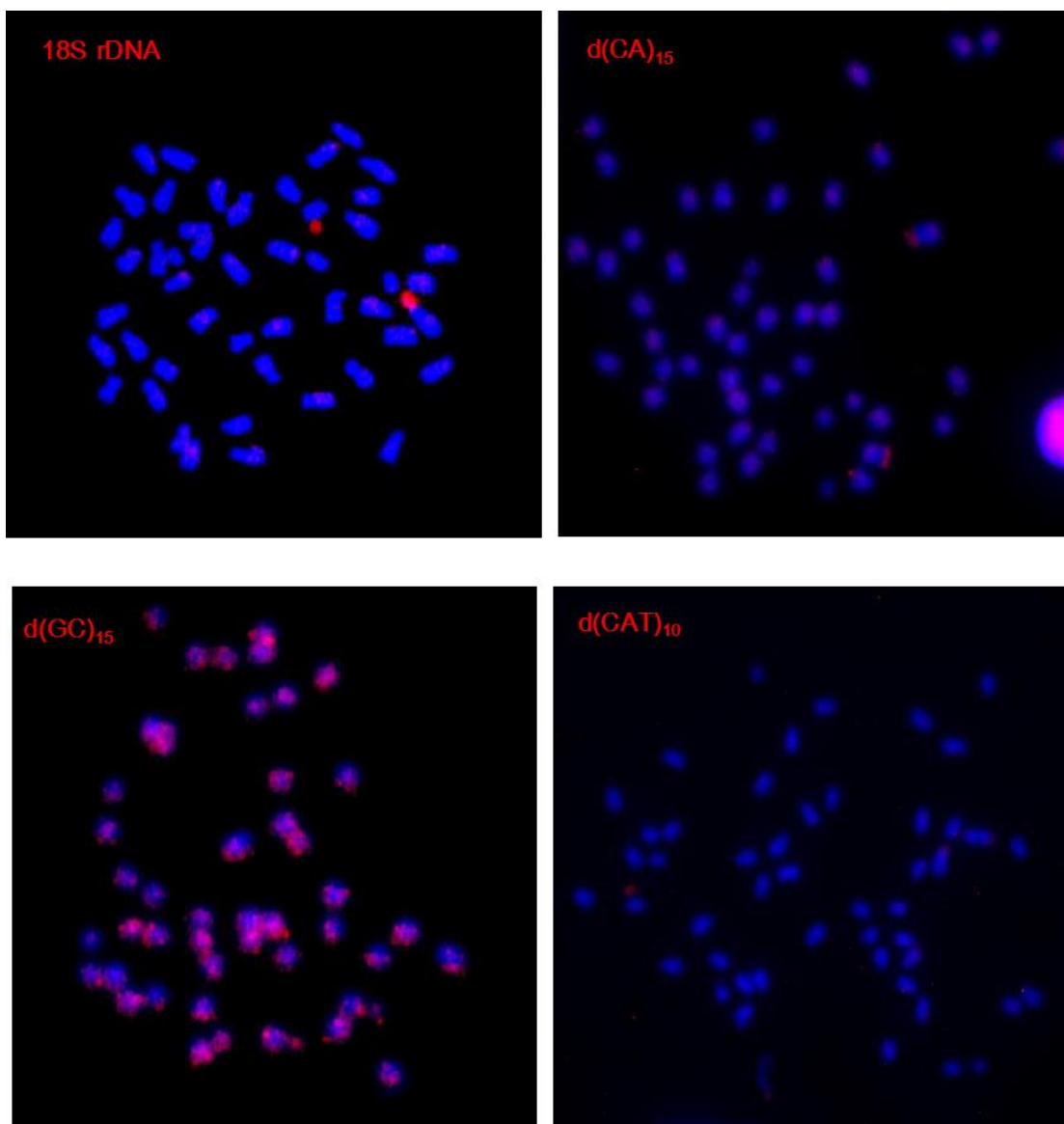
ภาพที่ 13 เมทาเฟสของปลายปีกไก่หนวดยาว ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์ อินซิทู ไฮบริไดเซชัน โดยใช้โพรบไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ 18S โพรบไมโครแซทเทลไลต์ จำนวน 3 โพรบ ได้แก่ d(CA)₁₅, d(GC)₁₅ และ d(CAT)₁₀



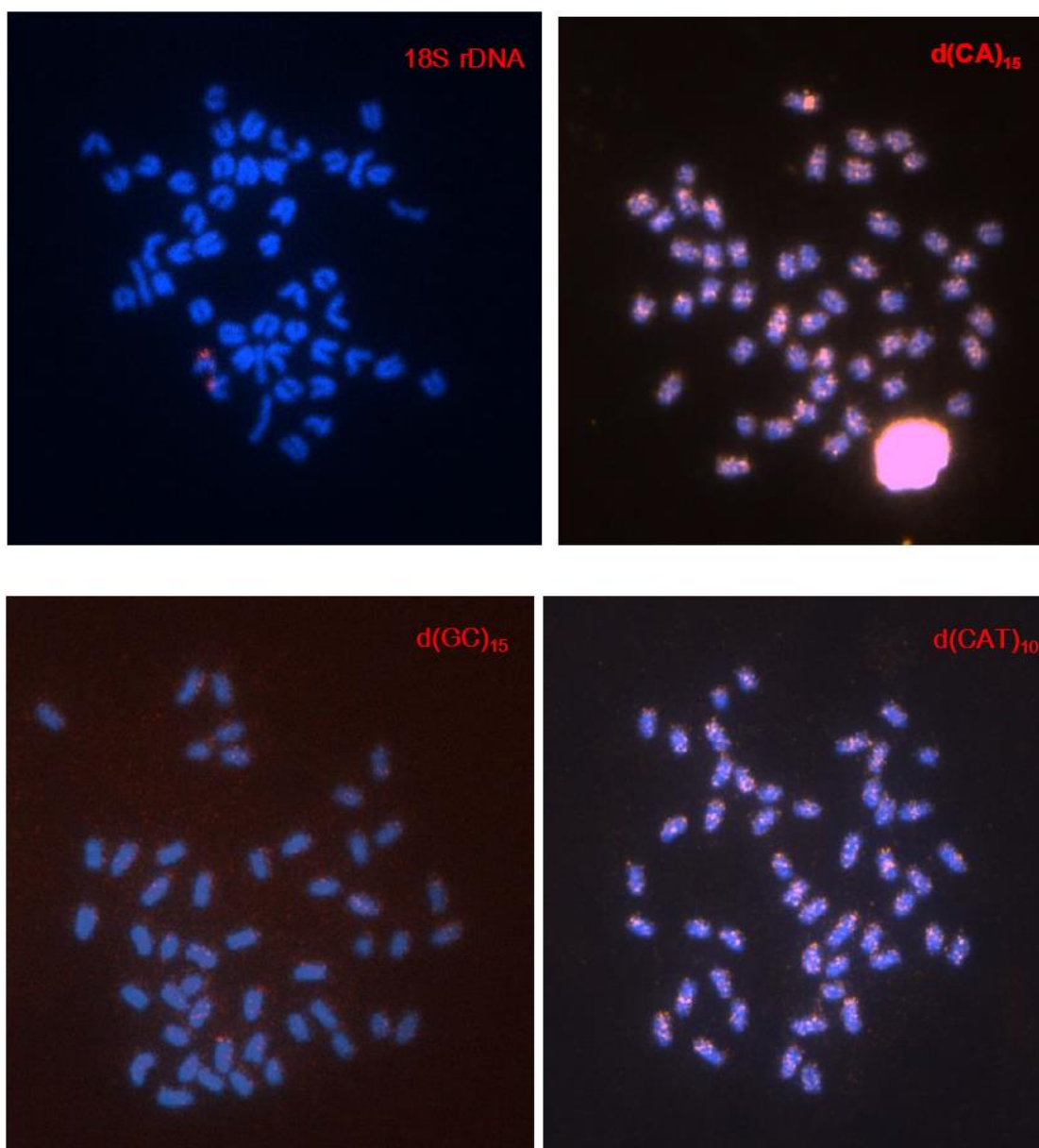
ภาพที่ 14 เมทาเฟสของปลาเค้าดำ ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์ อินซิทู ไฮบริไดเซชัน โดยใช้โพรบไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ 18S โพรบไมโครแซทเทลไลต์ จำนวน 3 โพรบ ได้แก่ d(CA)₁₅, d(GC)₁₅ และ d(CAT)₁₀



ภาพที่ 15 เมทาเฟสของปลาแค้ว ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์ อินซิทู ไฮบริไดเซชัน โดยใช้โพรบไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ 18S โพรบไมโครแซทเทลไลต์ จำนวน 3 โพรบ ได้แก่ d(CA)₁₅, d(GC)₁₅ และ d(CAT)₁₀



ภาพที่ 16 เมทาเฟสของปลาคุ่มซี ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์ อินซิทู ไฮบริไดเซชัน โดยใช้โพรบไรรีโบโซมอลอาร์เอ็นเอ 18S โพรบไมโครแซทเทลไลต์ จำนวน 3 โพรบ ได้แก่ d(CA)₁₅, d(GC)₁₅ และ d(CAT)₁₀



ภาพที่ 17 เมทาเฟสของปลาแรดแม่น้ำโขง ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์ อินซิทู ไฮบริไดเซชัน โดยใช้ โพรบไโรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ 18S โพรบไมโครแซทเทลไลต์ จำนวน 3 โพรบ ได้แก่ d(CA)₁₅, d(GC)₁₅ และ d(CAT)₁₀

บทที่ 5

อภิปราย และสรุปผลการศึกษา

5.1 อภิปรายผลการศึกษา

5.1.1 จำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ จำนวนโครโมโซมพื้นฐาน และแคโรไทป์

จากการศึกษาโครโมโซมของปลากระดี่ ปลาเสือขี้ลาย ปลาปากเปลี่ยน ปลาปักเป้าหนวดเขียว ปลาเค้ด้า ปลาแค้ว ปลาตุ้มซี และปลาแรดแม่น้ำโขง ในครั้งนี้การศึกษาในปลาปักเป้าหนวดเขียว เป็นรายงานครั้งแรก ผลการศึกษาพบว่าปลากระดี่ ปลาเสือขี้ลาย ปลาปากเปลี่ยน มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ ($2n$) เท่ากับ 50 แท่ง สอดคล้องกับรายงานการศึกษาโครโมโซมปลาเสือขี้ลาย และเสือสุมาตรา ของ Taki et al. (1977) ปลาปากเปลี่ยนที่ศึกษาโดยธวัช ดอนสกุล และคณะ (2550) และปลาทรงเครื่องซึ่งเป็นปลาสกุลเดียวกับปลากระดี่ (ธวัช ดอนสกุล และ วิเชียร มากตุ่น, 2536) แต่แตกต่างจากปลากระดี่ที่รายงานโดย ธวัช ดอนสกุล และ วิเชียร มากตุ่น (2536) ที่รายงานว่ามีโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 48 แท่ง ปลาปักเป้าหนวดเขียวมีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ ($2n$) เท่ากับ 60 แท่ง ซึ่งแตกต่างกับปลาทุกชนิดในสกุลเดียวกันดังนี้ ปลาผี มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ ($2n$) เท่ากับ 62 แท่ง (Magtoon and Donsakul, 2009) ปลาข้างพระร่วง มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ ($2n$) เท่ากับ 64 แท่ง (ธวัช ดอนสกุล, 2539) และปลาหางไหม้มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ ($2n$) เท่ากับ 92 แท่ง (Donsakul, 1992) ปลาเค้ด้ามีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ ($2n$) เท่ากับ 56 แท่ง สอดคล้องกับรายงานของธวัช ดอนสกุล (2539) แต่แตกต่างกับปลาเค้ขาวจากอินเดีย ($2n=86$: Rishi and Singh, 1983; Sharma and Tripathi, 1984) และประเทศไทย ($2n=88$: ธวัช ดอนสกุล, 2539) ปลาแค้วมีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ ($2n$) เท่ากับ 56 แท่ง สอดคล้องกับรายงานของอัจฉริยา รังษิธิ และคณะ (2550) และสอดคล้องกับปลาแค้วและปลาแค้ง ปลาตุ้มซีมีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ ($2n$) เท่ากับ 48 แท่ง สอดคล้องกับรายงานของจิราภรณ์ มิ่งขวัญ และ อลงกลด แทนอมทอง (2556) ปลาแรดแม่น้ำโขงมีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ ($2n$) เท่ากับ 48 แท่ง สอดคล้องกับรายงานของ ธวัช ดอนสกุล (2530) และยังสอดคล้องกับปลาแรดธรรมดา และปลาแรดแดง (ธวัช ดอนสกุล, 2530) (ตารางที่ 3)

โครโมโซมพื้นฐานของปลากระดี่ ปลาเสือขี้ลาย ปลาปากเปลี่ยน ปลาปักเป้าหนวดเขียว ปลาเค้ด้า ปลาแค้ว ปลาตุ้มซี และปลาแรดแม่น้ำโขง ในการศึกษาครั้งนี้เมื่อเปรียบเทียบกับรายงานก่อนหน้านี้ พบว่ามีเพียงปลาปากเปลี่ยน (ธวัช ดอนสกุล และคณะ, 2550) และปลาแรดแม่น้ำโขง (ธวัช ดอนสกุล, 2530) เท่านั้นที่มีจำนวนโครโมโซมพื้นฐานเท่ากัน ส่วนปลาอีก 6 ชนิดที่เหลือ ถึงแม้ว่าจะมีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากันแต่จำนวนโครโมโซมพื้นฐานแตกต่างกัน (Taki et al., 1977; ธวัช ดอนสกุล, 2530; Donsakul, 1992; ธวัช ดอนสกุล และ วิเชียร มากตุ่น, 2536; ธวัช ดอนสกุล, 2539; ธวัช ดอนสกุล และคณะ, 2550; อัจฉริยา รังษิธิ และคณะ, 2550; Magtoon and Donsakul, 2009; จิราภรณ์ มิ่งขวัญ และ อลงกลด แทนอมทอง, 2556) ความแตกต่างที่เกิดขึ้นอาจมีสาเหตุที่เป็นไปได้ดังนี้ เกิดความแตกต่างผ่านแปรของลักษณะโครโมโซมระหว่างปลาต่างประชากรภายในชนิดเดียวกัน และหรือเทคนิคการเตรียมโครโมโซมทำให้โครโมโซมหดมากเกินไปทำให้ตรวจสอบชนิดโครโมโซมคลาดเคลื่อนได้ประกอบกับโครโมโซมปลามีขนาดเล็ก หรือสาเหตุของ

ความแตกต่างอาจจะระบุชนิดที่ไม่ตรงกัน นอกจากนี้ยังมีข้อสังเกตกล่าวคือปลาปักไก่หนวดยาว เมื่อเปรียบเทียบกับปลาในสกุลเดียวกันพบว่ามีความโครโมโซมพื้นฐานใกล้เคียงกันแม้ว่าจะมีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ที่แตกต่างกันมากก็ตาม สิ่งนี้ยังคงอนุรักษ์ไว้ในปลาสกุลดังกล่าว

ชนิดโครโมโซมในแคโรไทป์ของปลากระดี่ ปลาเสือข้างลาย ปลาปากเปลี่ยน ปลาปักไก่หนวดยาว ปลาเค้าดำ ปลาแค้ว ปลาตุ้มซี ประกอบด้วยโครโมโซมที่มีสองแขน (เมทาเซนทริก, ซับเมทาเซนทริก และอะโครเซนทริก) และโครโมโซมชนิดที่มีแขนเดียว (เทโลเซนทริก) (ตารางที่ 3) แต่อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบกับรายงานก่อนหน้านี้ พบว่าจำนวนชนิดของโครโมโซมประเภทต่าง ๆ แตกต่างกัน (Taki et al., 1977; ธวัช ดอนสกุล, 2530; Donsakul, 1992; ธวัช ดอนสกุล และ วิเชียร มากตุ่น, 2536; ธวัช ดอนสกุล, 2539; ธวัช ดอนสกุล และคณะ, 2550; อัจฉริยา รังษิธิ และคณะ, 2550; Magtoon and Donsakul, 2009; จีราภรณ์ มิ่งขวัญ และ อลงกลด แทนอมทอง, 2556) ความแตกต่างที่เกิดขึ้นนี้อาจมีสาเหตุมาจาก 1. ความแตกต่างผันแปรภายในชนิดแต่ต่างประชากรกัน (ตัวอย่างจากคนละแหล่งน้ำ) ความผันแปรนั้นเป็นผลมาจากการเกิดวิวัฒนาการของโครโมโซมที่เกิดอิสระแตกต่างกันในแต่ละประชากร นอกจากนี้ อาจเกิดจากการกระตุ้นจากปัจจัยแวดล้อมที่แตกต่างกัน และหรือ 2. ความแตกต่างของชนิดโครโมโซมที่เกิดขึ้นอาจเกิดจากการใช้เกณฑ์ในการจำแนกโครโมโซมแตกต่างกัน ส่วนปลาแรดแม่น้ำโขงประกอบด้วยโครโมโซมชนิดเทโลเซนทริก (แขนเดียว) ทั้งหมด ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของเกรียงไกร สีตะพันธ์ และมลฤดี คำมาอ้าย (2549) และธวัช ดอนสกุล (2530) ปลากระดี่หม้อ (เกรียงไกร สีตะพันธ์ และมลฤดี คำมาอ้าย, 2549; วิเชียร มากตุ่น และคณะ, 2550; Supiwong et al., 2010) ปลากระดี่นาง (เกรียงไกร สีตะพันธ์ และมลฤดี คำมาอ้าย, 2549) ปลาแรดแม่น้ำโขง (ธวัช ดอนสกุล, 2530) แต่แตกต่างจากปลาแรดแดง ซึ่งมีโครโมโซมชนิดซับเมทาเซนทริก 2 แห่ง และเทโลเซนทริก 46 แห่ง (ธวัช ดอนสกุล, 2530) ปลากัดภาคใต้ ซึ่งมีชนิดของเมทาเซนทริก 14 แห่ง ซับเมทาเซนทริก 8 แห่ง อะโครเซนทริก 4 แห่ง และเทโลเซนทริก 16 แห่ง (รัตนพล และอภิรักษ์ สุวรรณรักษ์, 2555) ปลากัดจีนมีโครโมโซมชนิด 4 แห่ง ซับเมทาเซนทริก 8 แห่ง และเทโลเซนทริก 30 แห่ง ปลากัดหัวโหม่ง มีโครโมโซมชนิดเมทาเซนทริก 4 แห่ง ซับเมทาเซนทริก 4 แห่ง อะโครเซนทริก 4 แห่ง และเทโลเซนทริก 22 แห่ง (วิเชียร มากตุ่น และคณะ, 2550)

จากการพิจารณาลักษณะแคโรไทป์ในปลาจำแนกแต่ละวงศ์จะพบว่าวงศ์ปลาตะเพียน วงศ์ปลาแค้ และวงศ์ปลาแรด มีจำนวนโครโมโซมใกล้เคียงกัน แสดงถึงการอนุรักษ์ของจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ในวงศ์ปลาดังกล่าว แต่ในวงศ์ปลาเนื้ออ่อนพบว่ามีความแตกต่างหลากหลายของจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์และแคโรไทป์มากที่สุด ลักษณะดังกล่าวอาจมีความสัมพันธ์กับการกระจายตัวของชนิดพันธุ์ ที่ปลาวงศ์ปลาเนื้ออ่อนกระจายพันธุ์ในแหล่งน้ำที่หลากหลาย บางชนิดอาศัยเพียงแหล่งน้ำเดียวซึ่งเป็นเรื่องมีชีวิตเฉพาะถิ่น (อลงกลด แทนอมทอง, 2554; วีระยุทธ สุภิวงศ์, 2557)

ตารางที่ 3 การศึกษาเปรียบเทียบพันธุศาสตร์เซลล์ในปลาสวายงามสกุล *Epalzeorhynchus*, *Scaphognatops*, *Puntigrus*, *Bagarius*, *Kryptopterus*, *Wallago*, *Nandus* และ *Osphronemus*

Family/ Species	2n	NF	Karyotype	Ag-NORs	แหล่งตัวอย่าง	อ้างอิง
วงศ์ปลาตะเพียน (Cyprinidae)						
ปลาทรงเครื่อง (<i>E. bicolor</i>)	50	74	20m+4sm+2a+24t	-	ไทย	ธวัช ดอนสกุล และ วิเชียร
ปลากาแดง (<i>Epalzeorhynchus frenatum</i>)	48	72	14m+10sm+8a+16t	-	ไทย	มากตุน (2536)
	50	84	18m+10sm+10a+12t	2	ไทย	การศึกษาค้างนี้
ปลาปากเปียน (<i>Scaphognatops bandanensis</i>)	50	66	10m+6sm+34t	-	ไทย	ธวัช ดอนสกุล และคณะ (2550)
	50	66	4m+12sm+34t	2	ไทย	การศึกษาค้างนี้
ปลาเสือสุมาตรา (<i>P. pentazona</i>)	50	98	22m+26sm/a+2t	-	เอเชีย	Taki et al. (1977)
ปลาเสือข้างลาย (<i>Puntigrus partipentazona</i>)	50	90	6m+34sm/a+10t		เอเชีย	
	50	94	6m+24sm+14a+6t	2	ไทย	การศึกษาค้างนี้
วงศ์ปลาแค้ (Sisoridae)						
ปลาแค้ง (<i>Bagarius suchus</i>)	56	88	16m+16sm+4a+20t	-	ไทย	อัจฉริยา รังษิ รุจิ และคณะ (2550)
ปลาแค้ควาย (<i>B. yarrelli</i>)	56	96	14m+20sm+6a+16t	-	ไทย	
ปลาแค้วัว (<i>B. bagarius</i>)	56	82	16m+10sm+2a+28t	-	ไทย	
	56	86	18m+10sm+4a+24t	2	ไทย	การศึกษาค้างนี้
วงศ์ปลาเนื้ออ่อน (Siluridae)						
ปลาก้างพระร่วง (<i>Kryptopterus bicirhis</i>)	64	98	20m+10sm+4a+30t	-	ไทย	ธวัช ดอนสกุล (2539)
ปลาขาคู (K.)	92	100	8m+10sm+74t	-	ไทย	(Donsakul,

<i>cryptopterus</i>)						1992)
ปลาปีกไก่หนวดยาว (<i>K. limpok</i>)	60	100	12m+14sm+14a+20t	2	ไทย	การศึกษาครั้งนี้
ปลาผี (<i>K. macrocephalus</i>)	62	98	24m+12sm+26t	-	ไทย	Magtoon and Donsakul (2009)
ปลาเค้าดำ (<i>Wallago micropogon</i>)	56	86	26m+4sm+26t	-	ไทย	ธวัช ดอนสกุล (2539)
	56	100	18m+20sm+6a+12t	2	ไทย	การศึกษาครั้งนี้
ปลาเค้าขาว (<i>Wallago attu</i>)	86	104	12m+6sm+2a+66t	-	อินเดีย	Rishi and Singh (1983)
	86	108	10m+12sm+8a+56t	-	อินเดีย	Sharma and Tripathi (1984)
	88	110	16m+2sm+4a+66t	-	ไทย	ธวัช ดอนสกุล (2539)
วงศ์ปลาตุ้มซี (Nandidae)						
ปลาตุ้มซี (<i>Nandus oxyrhynchus</i>)	48	90	6m+22sm+14a+6t	-	ไทย	จิราภรณ์ มิ่งขวัญ และ อลงกลด แทนอมทอง (2556)
	48	88	8m+20sm+12a+8t	2	ไทย	การศึกษาครั้งนี้
วงศ์ปลาแรด (Osphronemidae)						
ปลาแรด (<i>O. goramy</i>)	48	48	48t	-	ไทย	ธวัช ดอนสกุล และคณะ (2549)
ปลาแรดแดง (<i>O. laticlavus</i>)	48	50	2sm+46t	-		
ปลาแรดแม่น้ำโขง (<i>Osphronemus exodon</i>)	48	48	48t	-		
	48	48	48t	2	ไทย	การศึกษาครั้งนี้

หมายเหตุ: 2n คือ โครโมโซมดิพลอยด์ NF คือ จำนวนโครโมโซมพื้นฐาน m คือ โครโมโซมชนิดเมทาเซนทริก, sm คือ โครโมโซมชนิดซับเมทาเซนทริก a คือ โครโมโซมชนิดอะโครเซนทริก และ t คือ โครโมโซมชนิดเทโลเซนทริก

5.1.2 โครโมโซมเครื่องหมาย

โครโมโซมเครื่องหมายที่มีตำแหน่งนอร์ของปลาగాแดง ปลาเสือข้างลาย ปลาปากเปลี่ยน ปลาปักโก่หนวดยาว ปลาเค้าดำ ปลาแค้ว ปลาตุ้มซี และปลาแรดแม่น้ำโขงในการศึกษาครั้งนี้เป็นรายงานแรก ที่ศึกษาโครโมโซมโดยเทคนิคการย้อมแถบสีแบบนอร์ โดยพบปลาగాแดงมีโครโมโซมที่มีตำแหน่งนอร์ 1 คู่ อยู่บนโครโมโซมชนิดซับเมทาเซนทริกคู่ที่ 12 โดยตำแหน่งนอร์จะอยู่บนบริเวณที่เป็นแขนข้างสั้น ปลาเสือข้างลายมีโครโมโซมที่มีตำแหน่งนอร์ 1 คู่ อยู่บนโครโมโซมชนิดเมทาเซนทริกคู่ที่ 1 โดยตำแหน่งนอร์จะอยู่บนบริเวณที่เป็นแขนข้างสั้น ปลาปากเปลี่ยนมีโครโมโซมที่มีตำแหน่งนอร์ 1 คู่ อยู่บนโครโมโซมชนิดเทโลเซนทริกคู่ที่ 9 โดยตำแหน่งนอร์จะอยู่บนบริเวณที่เป็นแขนข้างยาว ปลาปักโก่หนวดยาวมีโครโมโซมที่มีตำแหน่งนอร์ 1 คู่ อยู่บนโครโมโซมชนิดซับเมทาเซนทริกคู่ที่ 8 ปลาเค้าดำมีโครโมโซมที่มีตำแหน่งนอร์ 1 คู่ อยู่บนโครโมโซมชนิดซับเมทาเซนทริกคู่ที่ 10 โดยตำแหน่งนอร์จะอยู่บนบริเวณที่เป็นแขนข้างสั้น ปลาแค้วมีโครโมโซมที่มีตำแหน่งนอร์ 1 คู่ อยู่บนโครโมโซมชนิดซับเมทาเซนทริกคู่ที่ 12 โดยตำแหน่งนอร์จะอยู่บนบริเวณที่เป็นแขนข้างสั้น ปลาตุ้มซีมีโครโมโซมที่มีตำแหน่งนอร์ 1 คู่ อยู่บนโครโมโซมชนิดเมทาเซนทริกคู่ที่ 1 โดยตำแหน่งนอร์จะอยู่บนบริเวณที่เป็นแขนข้างสั้น และปลาแรดแม่น้ำโขงมีโครโมโซมเครื่องหมายบริเวณเซนโทรเมียร์ของโครโมโซมคู่ที่ 15 ซึ่งเป็นโครโมโซมชนิดเทโทเซนทริกขนาดกลาง จากผลการศึกษาจะพบว่าโครโมโซมเครื่องหมายที่มีตำแหน่งนอร์ในปลาทั้ง 8 ชนิด แม้จะมีจำนวน 1 คู่เท่ากันแต่แตกต่างกันตรงชนิดและคู่ในแต่ละชนิด เมื่อเปรียบเทียบกับรายงานก่อนหน้านี้ในปลาชนิดอื่นในวงศ์เดียวกัน ซึ่งพบมีรายงานเพียง 3 วงศ์เท่านั้นที่ศึกษาโดยเทคนิคการย้อมสีแบบนอร์ ได้แก่ วงศ์ปลาตะเพียน มีจำนวนแตกต่างกันตั้งแต่ 2-8 แห่ง (Arai, 2011, Supiwong et al., 2012a; Chaiyasan et al., 2018) วงศ์ปลาเนื้ออ่อน มีรายงานการศึกษาในปลาสุ่มพร (Gomonteir et al., 2023) และปลาน้ำเงิน (Supiwong et al., 2012b) พบว่ามีจำนวนนอร์ 1 คู่ ทั้งสองชนิดซึ่งสอดคล้องกับปลาปักโก่และปลาเค้าดำ และวงศ์ปลาแรดซึ่งมีรายงานเพียง 1 ชนิด คือ ปลากระดี่หม้อ โดย Supiwong et al. (2010) พบว่ามีตำแหน่งของนอร์ 2 ตำแหน่ง อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 2 โดยพบที่ตำแหน่งแขนด้านปลายสุดใกล้กับเทโลเมียร์ของโครโมโซมชนิดเทโลเซนทริกขนาดใหญ่ 2 แห่ง ซึ่งแตกต่างกับการศึกษาครั้งนี้

5.1.3 พันธุศาสตร์เซลล์ระดับโมเลกุล

การศึกษานี้เป็นรายงานครั้งแรกที่ศึกษาในปลาగాแดง ปลาเสือข้างลาย ปลาปากเปลี่ยน ปลาปักโก่หนวดยาว ปลาเค้าดำ ปลาแค้ว ปลาตุ้มซี และปลาแรดแม่น้ำโขง โดยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์ อินซิทู ไฮบริดเซชัน โดยใช้โพรบโรโบโซมอล 18S โพรบไมโครแซทเทลไลต์ (CA)₁₅, (GC)₁₅ และ (CAT)₁₀ ผลการศึกษาพบว่าสัญญาณโพรบโรโบโซมอล 18S ในปลาทั้ง 8 ชนิด ยกเว้นปลาปากเปลี่ยน พบสัญญาณ 2 แห่ง ตรงตำแหน่งเดียวกับแห่งที่มินอร์ ผลการศึกษาสอดคล้องกับวงศ์ปลากด ปลาแขยง (Supiwong et al., 2014) วงศ์ปลาดุก (Maneechot et al., 2015) ปลาเสือพ่นน้ำ (Supiwong et al., 2017) ในปลาปากเปลี่ยนที่พบ 4 ตำแหน่ง นั้นอาจเกิดจากที่ปกติปลาชนิดนี้มีถิ่นสำหรับสร้างโรโบโซมจำนวน 4 แห่ง แต่ยังไม่ทำงานพร้อมกันทุกแห่งทำให้เมื่อตรวจสอบโดยการย้อมแถบสีแบบนอร์ตรวจสอบไม่พบ การกระจายตัวของไมโครแซทเทลไลต์บนโครโมโซมในปลาแต่ละชนิดมีลักษณะแตกต่างกันเป็นลักษณะเฉพาะกับชนิด โพรบไมโครแซทเทลไลต์ (CA)₁₅ มี

รูปแบบการกระจายตัวที่สามารถจัดกลุ่มได้ดังนี้ 1. ในปลากาแดงและปลาเสือข้างลาย ที่พบกระจายตัวสะสมหนาแน่นตรงเทโลเมียร์ของทุกแห่ง 2. ปลาปากเปลี่ยน ปลาเค้ดำ และปลาเค้ขาว ที่พบกระจายตัวหนาแน่นเกือบทั้งแห่งและเทโลเมียร์ของทุกแห่ง 3. ปลาปักโก๋หนวดยาว และปลาดุมซี พบกระจายบาง ๆ และสะสมหนาแน่นในบางแห่งตรงเทโลเมียร์ 4. ปลาแรดแม่น้ำโขง พบกระจายหนาแน่นเกือบทุกแห่ง และสะสมมากตรงกลางแห่งหลายๆ โครโมโซม สำหรับโพรบไมโครแซทเทลไลต์ (GC)₁₅ มีรูปแบบการกระจายตัวที่สามารถจัดกลุ่มได้ดังนี้ 1. ในปลากาแดง ปลาปักโก๋หนวดยาว และปลาแรดแม่น้ำโขง ที่พบกระจายตัวจางๆ ไม่มีสะสมที่แห่งใดแห่งหนึ่งโดยเฉพาะ 2. ปลาเสือข้างลาย ปลาปากเปลี่ยน ปลาเค้ดำ ปลาเค้ขาว และปลาดุมซี พบสัญญาณกระจายหนาแน่นและสะสมในบางแห่งเด่นชัด โพรบไมโครแซทเทลไลต์ (CAT)₁₀ มีรูปแบบการกระจายตัวที่สามารถจัดกลุ่มได้ดังนี้ 1. ปลากาแดง ปลาเสือข้างลาย และปลาดุมซี พบสัญญาณจาง ๆ 2. ปลาปากเปลี่ยน ปลาเค้ดำ และปลาเค้ขาว พบสัญญาณสะสมหนาแน่นในบางแห่งอย่างเด่นชัด 3. ปลาปักโก๋หนวดยาว พบสัญญาณกระจายเกือบทุกแห่งและหนาแน่นมากตรงเทโลเมียร์ 4. ปลาแรดแม่น้ำโขง มีการกระจายตัวหนาแน่นเกือบทุกแห่งและสะสมอย่างมากตรงกลางแห่งของโครโมโซม รูปแบบการกระจายตัวของไมโครแซทเทลไลต์บนโครโมโซมของปลากระจายทั่วทั้งจีโนมและหนาแน่นสะสมบริเวณเฮเทอโรโครมาทินบริเวณเทโลเมียร์ และเซนโทรเมียร์ คล้ายๆ กับปลาหลายชนิด กล่าวคือ บริเวณเซนโทรเมียร์ (Lanfredi et al., 2001; Martins, 2007; Canapa et al., 2002; Oliveira and Wright, 1998; Mazzuchelli and Martins, 2009; Sola and Gornung, 2001; Reed and Phillips, 1995; Garrido-Ramos et al., 1994; Elgar et al., 1999) บางชนิดถูกพบที่บริเวณเทโลเมียร์ (Vanzela et al., 2002; Hatanaka et al., 2002) บางชนิดถูกพบบริเวณโครโมโซมเพศในปลา (Cioffi and Bertollo, 2012)

5.2 สรุปผลการศึกษา

การศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ระดับโมเลกุลของปลาสวยงามชนิดพันธุ์หายากจากกลุ่มน้ำโขงในประเทศไทยจำนวน 8 ชนิด ได้แก่ ปลากาแดง ปลาเสือข้างลาย ปลาปากเปลี่ยน ปลาปักโก๋หนวดยาว ปลาเค้ดำ ปลาเค้ขาว ปลาดุมซี และปลาแรดแม่น้ำโขง โดยศึกษาด้วยเทคนิคการย้อมแบบธรรมดาและแถบสีแบบนอร์และศึกษาด้วยเทคนิค FISH โดยใช้โพรบ ไรโบโซมอล 18S ไมโครแซทเทลไลต์ d(CA)₁₅, d(GC)₁₅, และ d(CAT)₁₀ บนโครโมโซมในปลาที่ศึกษา ผลการศึกษาพบว่าปลา 8 ชนิด ได้แก่ ปลากาแดง ปลาเสือข้างลาย ปลาปากเปลี่ยน ปลาปักโก๋หนวดยาว ปลาเค้ดำ ปลาเค้ขาว ปลาดุมซี และปลาแรดแม่น้ำโขง มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 50, 50, 50, 60, 56, 56, 48 และ 48 แห่ง ตามลำดับ จำนวนโครโมโซมพื้นฐานเท่ากับ 84, 94, 66, 100, 100, 88, 88 และ 48 ตามลำดับ สูตรแคริโอไทป์ในปลาทั้ง 8 ชนิดมีดังนี้ ปลากาแดงคือ $2n$ (diploid) $50 = L^m_2 + L^{sm}_6 + L^a_6 + M^{m}_{12} + M^{sm}_2 + M^a_6 + M^t_{16}$ หรือ $18m + 10sm + 10a + 12t$ ปลาเสือข้างลายคือ $2n$ (diploid) $50 = L^m_6 + L^{sm}_{22} + L^a_4 + M^{sm}_2 + M^a_6 + S^a_4 + S^t_6$ หรือ $6m + 24sm + 14a + 6t$ ปลาปากเปลี่ยนคือ $2n$ (diploid) $50 = L^m_4 + L^{sm}_8 + L^t_2 + M^{sm}_4 + M^t_{30} + S^t_2$ หรือ $4m + 12sm + 34t$ ปลาปักโก๋หนวดยาวคือ $2n$ (diploid) $60 = L^m_8 + L^{sm}_8 + L^a_6 + M^m_4 + M^{sm}_6 + M^a_8 + M^t_{10} + S^t_{10}$ หรือ $12m + 14sm + 14a + 20t$ ปลาเค้ดำคือ $2n$ (diploid) $56 = L^m_8 + M^{m}_{10} + L^{sm}_8 +$

$M^{sm}_{12} + M^a_6 + S^t_{12}$ หรือ $18m + 20sm + 6a + 12t$ ปลา วัว คือ $2n$ (diploid) $56 = L^{m_{10}} + L^{sm_6} + L^a_2 + L^t_2 + M^m_8 + M^{sm}_4 + M^a_2 + M^t_{16} + S^t_6$ หรือ $18m + 10sm + 4a + 24t$ ปลา ดุมซี่ คือ $2n$ (diploid) $48 = L^m_2 + L^{sm}_8 + L^a_2 + M^m_6 + M^{sm}_{12} + M^a_{10} + M^t_6 + S^t_2$ หรือ $8m + 20sm + 12a + 8t$ และปลา แรดแม่น้ำโขง คือ $2n$ (diploid) $48 = L^t_{18} + M^t_{30}$ หรือ $48t$

โครโมโซมเครื่องหมายที่มีตำแหน่งนอร์มัลในปลาทั้ง 8 ชนิด พบจำนวน 1 คู่แตกต่างกันในแต่ละชนิด ดังนี้ ปลา กาดัง มีโครโมโซมที่มีตำแหน่งนอร์มัล 1 คู่ อยู่บนโครโมโซมชนิดซับเมทาเซนทริกคู่ที่ 12 โดยตำแหน่งนอร์มัลจะอยู่บนบริเวณที่เป็นแขนข้างสั้น ปลา เสือข้างลาย มีโครโมโซมที่มีตำแหน่งนอร์มัล 1 คู่ อยู่บนโครโมโซมชนิดเมทาเซนทริกคู่ที่ 1 โดยตำแหน่งนอร์มัลจะอยู่บนบริเวณที่เป็นแขนข้างสั้น ปลา ปากเปลี่ยน มีโครโมโซมที่มีตำแหน่งนอร์มัล 1 คู่ อยู่บนโครโมโซมชนิดเทโลเซนทริกคู่ที่ 9 โดยตำแหน่งนอร์มัลจะอยู่บนบริเวณที่เป็นแขนข้างยาว ปลา ปีกไก่หนวดยาว มีโครโมโซมที่มีตำแหน่งนอร์มัล 1 คู่ อยู่บนโครโมโซมชนิดซับเมทาเซนทริกคู่ที่ 8 ปลา แคดำ มีโครโมโซมที่มีตำแหน่งนอร์มัล 1 คู่ อยู่บนโครโมโซมชนิดซับเมทาเซนทริกคู่ที่ 10 โดยตำแหน่งนอร์มัลจะอยู่บนบริเวณที่เป็นแขนข้างสั้น ปลา แค้ว มีโครโมโซมที่มีตำแหน่งนอร์มัล 1 คู่ อยู่บนโครโมโซมชนิดซับเมทาเซนทริกคู่ที่ 12 โดยตำแหน่งนอร์มัลจะอยู่บนบริเวณที่เป็นแขนข้างสั้น ปลา ดุมซี่ มีโครโมโซมที่มีตำแหน่งนอร์มัล 1 คู่ อยู่บนโครโมโซมชนิดเมทาเซนทริกคู่ที่ 1 โดยตำแหน่งนอร์มัลจะอยู่บนบริเวณที่เป็นแขนข้างสั้น และปลา แรดแม่น้ำโขงมีโครโมโซมเครื่องหมายบริเวณเซนโทรเมียร์ของโครโมโซมคู่ที่ 15 ซึ่งเป็นโครโมโซมชนิดเทโทเซนทริกขนาดกลาง และผลจากการศึกษาด้วยเทคนิค FISH ด้วยโพรบไรโบโซมอล 18S ไมโครแซทเทลไลต์ $d(CA)_{15}$, $d(GC)_{15}$, และ $d(CAT)_{10}$ บนโครโมโซม พบสัญญาณโพรบไรโบโซมอล 18S พบ 2 ตำแหน่ง ยกเว้นในปลาปากเปลี่ยนพบ 4 ตำแหน่ง สัญญาณโพรบไมโครแซทเทลไลต์ ในปลาทั้ง 8 ชนิดพบกระจายหนาแน่นตรงบริเวณเฮเทอโรโครมาทินและมีเอกลักษณ์เฉพาะตัวในแต่ละชนิด ปลา สวายงาม ชนิดพันธุ์หายากจากลุ่มน้ำโขงจำนวน 8 ชนิด ได้ถูกพิจารณาแล้วว่าเป็นชนิดที่มีศักยภาพในการพัฒนาต่อยอดในอนาคตเพื่อพัฒนาเป็นปลาสวยงามที่มีความสำคัญชนิดใหม่ของประเทศไทย งานวิจัยในอนาคตในการศึกษาต่อยอด ได้แก่ ศึกษาเปรียบเทียบระดับประชากรจากหลายๆ แหล่ง ศึกษาเชิงลึกโดยใช้โพรบไมโครแซทเทลไลต์ชนิดอื่น ๆ เพิ่มเติม และศึกษาในระดับดีเอ็นเอของปลาทั้ง 8 ชนิด และศึกษาปลาชนิดอื่น ๆ เพิ่มเติมในวงศ์เดียวกับปลาทั้ง 8 ชนิด

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
การเตรียมสารเคมี

1. การเตรียมสารเคมีสำหรับทำ Pretreatment

ในการตรวจสอบจำนวนและรูปร่างของโครโมโซมจะเลือกเซลล์ในระยะเมทาเฟสเนื่องจากระยะนี้ โครโมโซมหดสั้นมากที่สุดและเห็นลักษณะได้ชัดเจน เพื่อสามารถเก็บเกี่ยวเซลล์ในระยะเมทาเฟสได้ กล่าวจึงต้องนำสารเคมีมาใช้เพื่อยับยั้งการสร้างสายใยสปินเดิลซึ่งเป็นขั้นตอนการทำ pretreatment ทำให้เซลล์ที่กำลังการแบ่งตัวหยุดอยู่ในระยะเมทาเฟสที่ต้องการ สารเคมีที่ใช้มีหลายชนิด เช่น ฟรอน ไฮดรอกซีควิโนลีน, พาราไดคลอโรเบนซีนและโคลชิซิน

1.1 โคลชิซิน ความเข้มข้น 0.01 % โดยมวล/ปริมาตร (w/v) จำนวน 10 ml

วิธีเตรียม เตรียมได้โดยการชั่งโคลชิซิน 0.001 g ละลายในน้ำแล้วปรับปริมาตรให้ได้ 10 ml เก็บไว้ในหลอดหุ้มฟอยล์ป้องกันแสง

2. การเตรียมสารเคมีสำหรับตรึงเซลล์ (fixation)

น้ำยาตรึงสภาพเซลล์ใช้เพื่อให้เซลล์คงสภาพเดิมและเพื่อประสิทธิภาพที่ดีควรเตรียมใหม่และเย็น จัด ในการทดลองนี้เลือกใช้ Carnoy's solution ซึ่งมีส่วนผสมระหว่างเมทานอลเข้มข้น: กรดอะซิติกเข้มข้นในอัตราส่วน 3:1 การเตรียมควรทำในตู้ดูดควันเพื่อความปลอดภัย เนื่องจากกรดอะซิติกมีกลิ่น ฉุนอาจเป็นอันตรายต่อระบบทางเดินหายใจได้

2.1 น้ำยาตรึงเซลล์ (fixative) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร (ml)

วิธีเตรียม เตรียมได้โดยผสมระหว่างเมทานอลปริมาตร 75 ml และกรดอะซิติกปริมาตร 25 ml ปิด ฝาจากนั้นนำไปแช่ในตู้ทำความเย็น

3. การเตรียม Sorensen buffer

สารเคมีที่ใช้เตรียม

- Stock solution B ใช้ NaHPO_4 9.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร

วิธีเตรียม

ตวง stock solution A 50.8 มิลลิลิตร และ stock solution B 49.2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ปรับ pH ด้วย 1 N HCl และ 1 N NaOH ให้ได้ pH 6.8

4. การเตรียม Hypotonic solution

สารละลาย Hypotonic solution 0.075 M KCl

สารเคมีที่ใช้เตรียม

- KCl crystal

- น้ำกลั่น

วิธีเตรียม

ชั่งผลึก KCl 0.5588 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร เขย่าจนผลึกละลายหมด เก็บใส่ขวดไว้ที่อุณหภูมิห้อง

หมายเหตุ น้ำยานี้มีอายุการใช้งาน 1-2 สัปดาห์

5. การเตรียมสีย้อมโครโมโซม (stain)

5.1 การย้อมสีแบบธรรมดาเตรียมสีจิมซ่า 20% ปริมาตร 80 ml

วิธีเตรียม

5.1.1 เตรียมสีจิมซ่าจาก stock solution 16 ml

5.1.2 เตรียม phosphate buffer 64 ml โดยผสม stock A (KH_2PO_4) 32.5 ml และ stock B (NaH_2PO_4) 31.5 ml นำไปปรับให้ได้ค่า PH ประมาณ 6.8 ด้วย NaOH

5.2 การย้อมแถบสีแบบบอร์เตรียมซิลเวอร์ไนเตรท 50% และเจลาติน 2%

วิธีเตรียม

5.2.1. เตรียมซิลเวอร์ไนเตรท 50% โดยการชั่งมา 10 g ละลายในน้ำกลั่น 20 ml กรอง ผ่านตัวกรอง (filter) บรรจุในหลอดหุ้มฟอยล์และสามารถเก็บไว้ในตู้เย็นได้นาน 1 สัปดาห์

5.2.2 เตรียมเจลาติน 2% โดยการชั่งมา 1 g ละลายน้ำกลั่น 50 ml นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ใช้magnetic stirrer ช่วยในการละลาย ประมาณ 15 นาที เมื่อละลายแล้วพักไว้ให้เย็น จากนั้นเติมกรดฟอร์มิก 1% 0.5 ml เก็บไว้ในหลอด หลอดที่หุ้มฟอยล์ไว้ในตู้เย็นได้นาน 2 สัปดาห์

ภาคผนวก ข
ผลงานการเผยแพร่งานวิจัย

งานตีพิมพ์

1. งานวิจัยในฐานข้อมูล ISI impact factor

1. Ditcharoen, S., Bertollo, L. A. C., Ráb, P., Hnátková, E., Molina, W. F., Liehr, T., Tanomtong, A., Triantaphyllidis, C., Ozouf-Costaz, C., Tongnunui, S., Pengseng, P., **Supiwong, W.**, Aroutiounian, R. and Cioffi, M. B. 2019. Genomic Organization of Repetitive DNA Elements and Extensive Karyotype Diversity of Silurid Catfishes (Teleostei: Siluriformes): A Comparative Cytogenetic Approach. International Journal of Molecular Sciences. 2019, 20, 3545; doi:10.3390/ijms20143545

2. Phimphan, S., Chaiyasan, P., Suwannapoom, C., Reungsing, M., Juntaree, S., Tanomtong, A. and **Supiwong, W.** 2020. Comparative Study of Cytogenetics and Microsatellites Distributions in the Genomes of the Three Cyprinids (*Epalzeorhynchus frenatum*, *Puntigrus partipentazona*, *Scaphognatops bandanensis*; Cyprinidae) in Thailand. Comparative Cytogenetics. submitted.

2. การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ

1. **Supiwong, W.** and Tanomtong, A. 2562. Comparative Cytogenetics between *Osphronemus exodon* and *O. goramy* by Classical and Molecular Methods. ใน: การประชุมวิชาการพันธุศาสตร์แห่งชาติ ครั้งที่ 21 (NGC2019) “พันธุศาสตร์เพื่อการพัฒนาอย่างยั่งยืน”. วันที่ 20-22 มิถุนายน พ.ศ. 2562 ณ โรงแรมเดอะชาयน์ จ. ชลบุรี หน้า 52-60.



Article

Genomic Organization of Repetitive DNA Elements and Extensive Karyotype Diversity of Silurid Catfishes (Teleostei: Siluriformes): A Comparative Cytogenetic Approach

Sukhonthip Ditcharoen ¹, Luiz Antonio Carlos Bertollo ², Petr Ráb ³, Eva Hnátková ⁴, Wagner Franco Molina ⁵, Thomas Liehr ⁶, Alongklod Tanomtong ¹, Costas Triantaphyllidis ⁷, Catherine Ozouf-Costaz ⁸, Sampan Tongnunui ⁹, Puan Pengseng ¹⁰, Weerayuth Supiwong ¹¹, Rouben Aroutiounian ¹² and Marcelo de Bello Cioffi ^{2,*}

- ¹ Toxic Substances in Livestock and Aquatic Animals Research Group, Department of Biology, Faculty of Science, Khon Kaen University, Muang, Khon Kaen 40002, Thailand
 - ² Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), Rodovia Washington Luiz Km. 235, C.P. 676, São Carlos, SP 13565-905, Brazil
 - ³ Laboratory of Fish Genetics, Institute of Animal Physiology and Genetics, Czech Academy of Sciences, Rumburská 89, Liběchov 277 21, Czech Republic
 - ⁴ Department of Zoology and Fisheries, Faculty of Agrobiological Sciences, Food and Natural Resources, Czech University of Life Sciences, Kamýcká 129, Prague 165 00, Czech Republic
 - ⁵ Departamento de Biologia Celular e Genética, Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Natal, RN 59078970, Brazil
 - ⁶ Institute of Human Genetics, University Hospital Jena, Jena 07747, Germany
 - ⁷ Department of Genetics, Development and Molecular Biology, Faculty of Sciences, School of Biology, Aristotle University of Thessaloniki, University Campus, Thessaloniki 54124, Greece
 - ⁸ Laboratoire Evolution Paris Seine, Institut de Biologie Paris Seine (IBPS), Sorbonne Universités, Case 5, 7 Quai St Bernard, Paris, 75952 Paris CEDEX 05, France
 - ⁹ Department of Conservation Biology, Mahidol University, Kanchanaburi Campus, Sai Yok, Kanchanaburi Province 71150, Thailand
 - ¹⁰ School of Agricultural of Technology, Walailak University, Thasala, Nakhon Si Thammarat 80160, Thailand
 - ¹¹ Faculty of Applied Science and Engineering, Khon Kaen University, Nong Khai Campus, Muang, Nong Khai 43000, Thailand
 - ¹² Department of Genetics and Cytology, Yerevan State University, Yerevan 0025, Armenia
- * Correspondence: mbcioffi@ufscar.br; Tel.: +55-016 3306-6885

Received: 8 June 2019; Accepted: 16 July 2019; Published: 19 July 2019



Abstract: The catfish family Siluridae contains 107 described species distributed in Asia, but with some distributed in Europe. In this study, karyotypes and other chromosomal characteristics of 15 species from eight genera were examined using conventional and molecular cytogenetic protocols. Our results showed the diploid number ($2n$) to be highly divergent among species, ranging from $2n = 40$ to 92 , with the modal frequency comprising 56 to 64 chromosomes. Accordingly, the ratio of uni- and bi-armed chromosomes is also highly variable, thus suggesting extensive chromosomal rearrangements. Only one chromosome pair bearing major rDNA sites occurs in most species, except for *Wallago micropogon*, *Ompok siluroides*, and *Kryptoterus giminus* with two; and *Silurichthys phaiosoma* with five such pairs. In contrast, chromosomes bearing 5S rDNA sites range from one to as high as nine pairs among the species. Comparative genomic hybridization (CGH) experiments evidenced large genomic divergence, even between congeneric species. As a whole, we conclude that karyotype features and chromosomal diversity of the silurid catfishes are unusually extensive, but parallel some other catfish lineages and primary freshwater fish groups, thus making silurids an important model for investigating the evolutionary dynamics of fish chromosomes.

Keywords: fish cytotaxonomy; chromosome banding; FISH; rDNA classes; CGH

1. Introduction

The family Siluridae is a lineage of freshwater catfishes widely distributed through Eurasia, but with the highest diversity in South and Southeast Asia [1]. It comprises 107 recognized species [2], some of them also distributed in temperate regions, such as *Silurus glanis*, *S. aristotelis*, *S. soldatovi*, and *S. asotus* [3–7]. The phylogenetic position of this family remains not well resolved [8–13], although morphological and molecular data have confirmed its monophyletic status within Siluriformes [3,8,9].

Siluridae catfishes represent one of the most interesting fish groups from a $2n$ evolutionary point of view, owing to their wide distribution, unique ecological niche, and known evolutionary trajectory [7]. Siluridae includes one of the largest freshwater fish species—*Silurus glanis*—which commonly reaches 2 m in size and over 300 kg in weight [14], and is highly valued in the food market [15]. Several other species, such as *Micronema cheveyi*, *Phalacronotus apogon*, *P. bleekeri*, *Wallago attu*, and *W. micropogon*, also comprise important food sources [16] or are ornamental fishes, like the glass catfish *Kryptopterus bicirrhilis* [17].

Cytogenetic studies have proven useful to discover and explore cryptic biodiversity in a number of fish groups [18]. Particularly, in complex and ecologically diverse fish groups, cytogenetic studies have made important contributions to elucidate the evolutionary pathways of distinct fish groups, owing to their particular chromosomal and genomic characteristics [19]. In fact, these approaches can reveal a set of characters usually not accessible by other research methods, thus refining evolutionary investigations [19,20]. Particularly, repetitive DNA sequences, which constitute the major component of the eukaryotic genome, have enormous potential for expanding the knowledge of karyotype differentiation [21]. In addition, the recent use of the comparative genomic hybridization (CGH) has allowed deeper analyses of fish genome organization at the chromosomal level by comparing closely related species [22–25].

Among the silurid catfishes, chromosomal studies are often restricted to conventional protocols to determine the diploid number ($2n$) and karyotype composition. Molecular cytogenetic approaches (e.g., chromosomal mapping of rDNA sequences) have been done in only two species of the genus *Ompok* [26]. Up to date, only 24 species from 8 of the 13 recognized genera had been cytogenetically examined (Table 1). The overall data show that the chromosome number varies from $2n = 28$ in *Silurus microdorsalis* [27] to $2n = 92$ in *Kryptopterus cryptopterus* [28].

Here, we add new chromosomal data for several silurid species from different genera, some of them analyzed for the first time, as well as others re-analyzed by different procedures (Table 1). We aimed to assess their karyotype structure, rDNA distribution, and interspecific genomic divergences through CGH experiments. The results added new informative characters useful in comparative genomics at the chromosomal level and highlighted extensive karyotype diversity among the analyzed species.

Table 1. Review of cytogenetic data in the family Siluridae. The species now analyzed are highlighted.

Species	Locality	$2n$	NF	Karyotype	NORs/18S rDNA	Reference
<i>Belodontichthys truncatus</i>	Thailand	62	100	20m+10sm+8st+24a	-	[29]
<i>B. truncatus</i>	Thailand	62	112	14m+30sm+6a+12t	2	[30]
<i>B. truncatus</i>	Thailand	62	106	14m+30sm+18st/a	2	Present work
<i>Kryptopterus bicirrhilis</i>	SE Asia	60	-	-	-	[31]
<i>K. bicirrhilis</i>	Thailand	64	98	20m+10sm+4st+30a	-	[29]
<i>K. bicirrhilis</i>	Thailand	64	96	14m+18sm+32st/a	2	Present work
<i>K. cryptopterus</i>	Thailand	92	110	8m+10st+74a	-	[28]
<i>K. geminus</i>	Thailand	92	102	6m+4sm+82st/a	4	Present work
<i>K. limpok</i>	Thailand	60	86	12m+14sm+34st/a	2	Present work
<i>K. macrocephalus</i>	Thailand	62	98	24m+12sm+26a	-	[32]
<i>K. macrocephalus</i>	Thailand	62	72	4m+6sm+52st/a	2	Present work
<i>Micronema cheveyi</i>	Thailand	78	96	4m+6sm+10a+58t	2	[30]

Table 1. Cont.

Species	Locality	2n	NF	Karyotype	NORs/18S rDNA	Reference
<i>M. cheveyi</i>	Thailand	78	96	4m+6sm+10a+58t	2	[33]
<i>M. cheveyi</i>	Thailand	78	88	4m+6sm+68st/a	2	Present work
<i>Ompok bimaculatus</i>	India	42	72	18m+12sm+12a (F) XX	-	[34]
<i>O. bimaculatus</i>	India	41	70	17m+12sm+12a (M) XY	-	[34]
<i>O. bimaculatus</i>	India	42	72	6m+24sm+12a (F)	2	[35]
<i>O. bimaculatus</i>	India	41	70	5m+24sm+12a (M)	2	[35]
<i>O. bimaculatus</i>	India	42	68	12m+14sm+16a/t	-	[36]
<i>O. bimaculatus</i>	India	54	102	16m+26sm+6a+6t	2	[26]
<i>O. bimaculatus</i>	Thailand	50	90	14m+20sm+6a+10t	2	[37]
<i>O. fumidus</i>	Thailand	60	82	20m+2sm+2st+36a	-	[32]
<i>O. fumidus</i>	Thailand	64	88	10m+10sm+44st/a	2	Present work
<i>O. pabda</i>	India	54	100	28m+10sm+8st+8a	-	[38]
<i>O. pabda</i>	India	42	-	-	-	[39]
<i>O. pabda</i>	India	42	68	12m+14sm+16a/t	-	[36]
<i>O. pabda</i>	India	42	84	26m+10sm+6a	2	[26]
<i>O. pabo</i>	India	54	102	36m+12sm+6a	-	[40]
<i>O. siluriodes</i>	Thailand	50	88	34m+2sm+2st+12a	-	[28]
<i>O. siluriodes</i>	Thailand	50	96	20m+22sm+4a+4t	2	[30]
<i>O. siluriodes</i>	Thailand	50	92	20m+22sm+8st/a	4	Present work
<i>Phalacrodonotus apogon</i>	Thailand	64	108	18m+20sm+6a+20t	2	[41]
<i>P. apogon</i>	Thailand	64	102	18m+20sm+26st/a	2	Present work
<i>P. bleekeri</i>	Thailand	64	92	20m+6sm+2st+36a	-	[28]
<i>P. bleekeri</i>	Thailand	64	106	14m+22sm+6a+22t	2	[33]
<i>P. bleekeri</i>	Thailand	64	102	18m+20sm+26st/a	2	Present work
<i>Silurichthys phaiosoma</i>	Thailand	40	46	2m+4sm+8st+26a	-	[32]
<i>S. phaiosoma</i>	Thailand	40	42	2m+38st/a	10	Present work
<i>S. schneideri</i>	Thailand	40	50	6m+4sm+4st+26a	-	[32]
<i>Silurus aristotelis</i>	Greece	58	116	30m+20sm+8st	-	[42]
<i>Si. aristotelis</i>	Greece	58	102	20m+24sm+14st/a	2	[43]
<i>Si. aristotelis</i>	Czech	58	104	22m+24sm+12st/a	2	Present work
<i>Si. asotus</i>	-	58	-	58t	-	[44]
<i>Si. asotus</i>	Japan	58	104	38m/sm+8st+12a	-	[45]
<i>Si. asotus</i>	Japan	58	104	46m/sm+12st/a	2	[46]
<i>Si. asotus</i>	Japan	58	102	44m/sm+14st/a	-	[47,48]
<i>Si. asotus</i>	Korea	58	106	24m+24sm+10st/a	-	[49]
<i>Si. asotus</i>	China	58	102	20m+24sm+10st+4a	-	[50–52]
<i>Si. asotus</i>	China	58	98	20m+14sm+6st+18a	2	[53,54]
<i>Si. asotus</i>	Mongolia	58	-	42m/sm+16st/a	-	[27]
<i>Si. asotus</i>	Korea	58	106	-	-	[55]
<i>Si. asotus</i>	China	58	112	20m+24sm+10st+4a	-	[56]
<i>Si. biwaensis</i>	Japan	58	102	44m/sm+14st/a	-	[47]
<i>Si. glanis</i>	-	60	100	40m/sm/st+20a	-	[57]
<i>Si. glanis</i>	-	60	100	40m/sm+20a	-	[58]
<i>Si. glanis</i>	Czech	60	120	28m+26sm+6st	-	[59]
<i>Si. glanis</i>	-	60	98	38m/sm+22a	-	[60]
<i>Si. glanis</i>	Serbia	60	94	16m+18sm+14st+12a	-	[61]
<i>Si. glanis</i>	Russia	60	110	18m+32sm/st+10a	-	[62]
<i>Si. glanis</i>	Serbia	48	78	30m/sm+18st/a	-	[63]
<i>Si. glanis</i>	Czech	60	120	22m+38sm/st	2	[64]
<i>Si. glanis</i>	Czech	60	106	22m+24sm+14st/a	2	Present work
<i>Si. lithophilus</i>	Japan	58	102	44m/sm+14st/a	-	[47]
<i>Si. lithophilus</i>	China	58	98	20m+20sm+18st/a	-	[50]
<i>Si. meridionalis</i>	China	58	112	20m+20sm+14st+4a	-	[50–52]
<i>Si. meridionalis</i>	Korea	60	106	22m+24sm+12st/a+2 microchromosomes	-	[49]
<i>Si. microdorsalis</i>	Korea	28	56	12m+14sm+2st	-	[27]
<i>Si. soldatovi</i>	China	58	112	24m+16sm+14st+4a	-	[65]
<i>Wallago attu</i>	India	86	106	12m+6sm+2st+66a	-	[66]
<i>W. attu</i>	India	86	116	10m+12sm+8st+56a	-	[67]
<i>W. attu</i>	Thailand	88	110	16m+2sm+4st+66a	-	[29]
<i>W. attu</i>	Thailand	88	108	6m+6sm+8a+68t	2	[30]
<i>W. attu</i>	Thailand	88	100	6m+6sm+76st/a	2	Present work
<i>W. micropogon</i>	Thailand	56	86	26m+4sm+26a	-	[29]
<i>W. micropogon</i>	Thailand	56	100	18m+20sm+6a+12t	2	[30]
<i>W. micropogon</i>	Thailand	56	94	18m+20sm+18st/a	4	Present work

NF = fundamental number; 2n = diploid number; M = male; F = female; and NOR = nucleolar organizer region.

2. Results

2.1. Standard Karyotypes

The diploid number of the 15 species analyzed varied from 40 (*Silurichthys phaiosoma*) to 92 chromosomes (*Kryptopterus giminus*). Substantial $2n$ variation occurs even among congeneric species. The only exception was observed for both *Phalacrodon* species, *P. apogon*, and *P. bleekeri*, which shared the same $2n$ and karyotype structures (i.e., $2n = 64$, $9m+10sm+13st/a$). In all species, no numerical or structural polymorphism between the sexes was observed, thus there was no evidence of differentiated sex chromosomes (Figures 1 and 2).

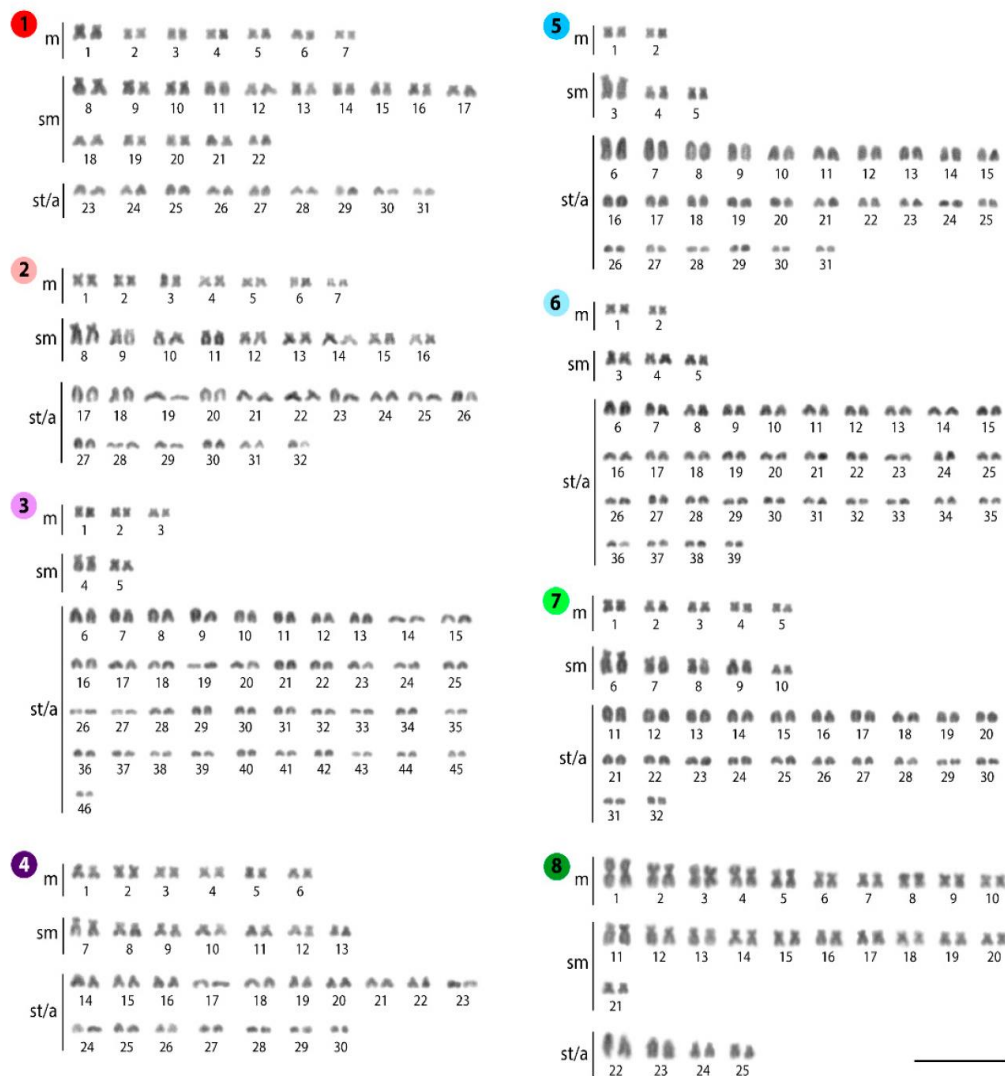


Figure 1. Karyotypes of *Belodontichthys truncates* (1); *Kryptopterus bicirrhus* (2); *Kryptopterus geminus* (3); *Kryptopterus limpok* (4); *Kryptopterus macrocephalus* (5); *Micronema cheveyi* (6); *Ompok fumidus* (7); and *Ompok siluroides* (8) arranged following Giemsa-staining. Bar = 5 μm.

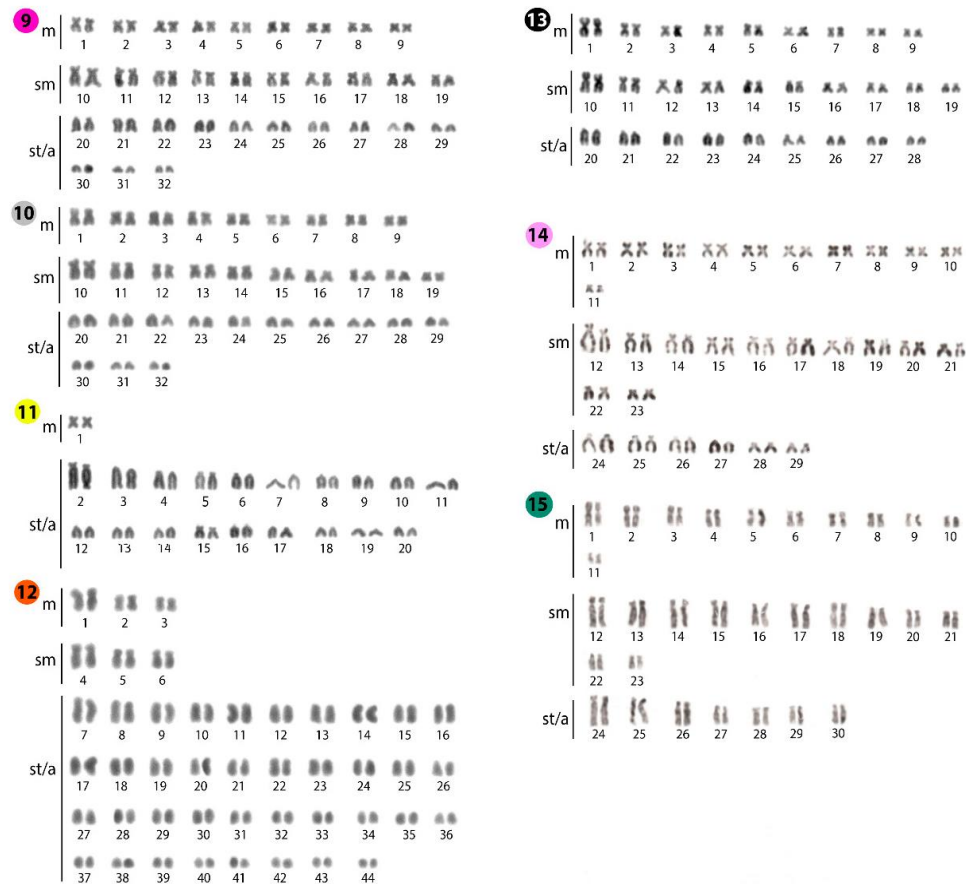


Figure 2. Karyotypes of *Phalacronotus apogon* (9); *Phalacronotus bleekeri* (10); *Silurichthys phaiosoma* (11); *Wallago attu* (12); *Wallago micropogon* (13); *Silurus aristotelis* (14); and *Silurus glanis* (15) arranged following Giemsa-staining. Bar = 5 μ m.

2.2. Fluorescence In Situ Hybridization (FISH)-Mapping

The 18S rDNA probe hybridized to only one chromosomal pair in most species, namely *B. truncates*, *K. limpok*, *K. macrocephalus*, *M. cheveyi*, *O. fumidus*, *P. apogon*, *P. bleekeri*, and *W. attu*. This site is located in the subtelomeric/telomeric region of the short arms of that chromosome pair in all species, except for *K. bicirrhys*, in which it is located in the telomeric region of the long arms. Exceptions for this frequent pattern are *K. geminus*, *O. siluroides*, and *W. micropogon*, in which two chromosome pairs bear 18S rDNA genes and *S. phaiosoma* with five chromosome pairs (Figures 3–5).

In contrast, the 5S rDNA sites showed a large variation in distribution, ranging from one chromosome pair in *K. limpok*, *O. fumidus*, *O. siluroides*, *W. attu*, and *W. micropogon*, up to six pairs in *K. geminus*, *B. truncates*, *M. cheveyi*, and *S. phaiosoma*. In addition, four other species had remarkably increased numbers of chromosomes displaying such sites, namely *K. bicirrhys* and *K. macrocephalus* with eight, and *P. apogon* and *P. bleekeri* with nine chromosome pairs (Figures 3–5). Fluorescence in situ hybridization (FISH) using the (TTAGGG)_n telomeric probe revealed hybridization signals on telomeres of all chromosomes of *S. phaiosoma* (Figure S1).

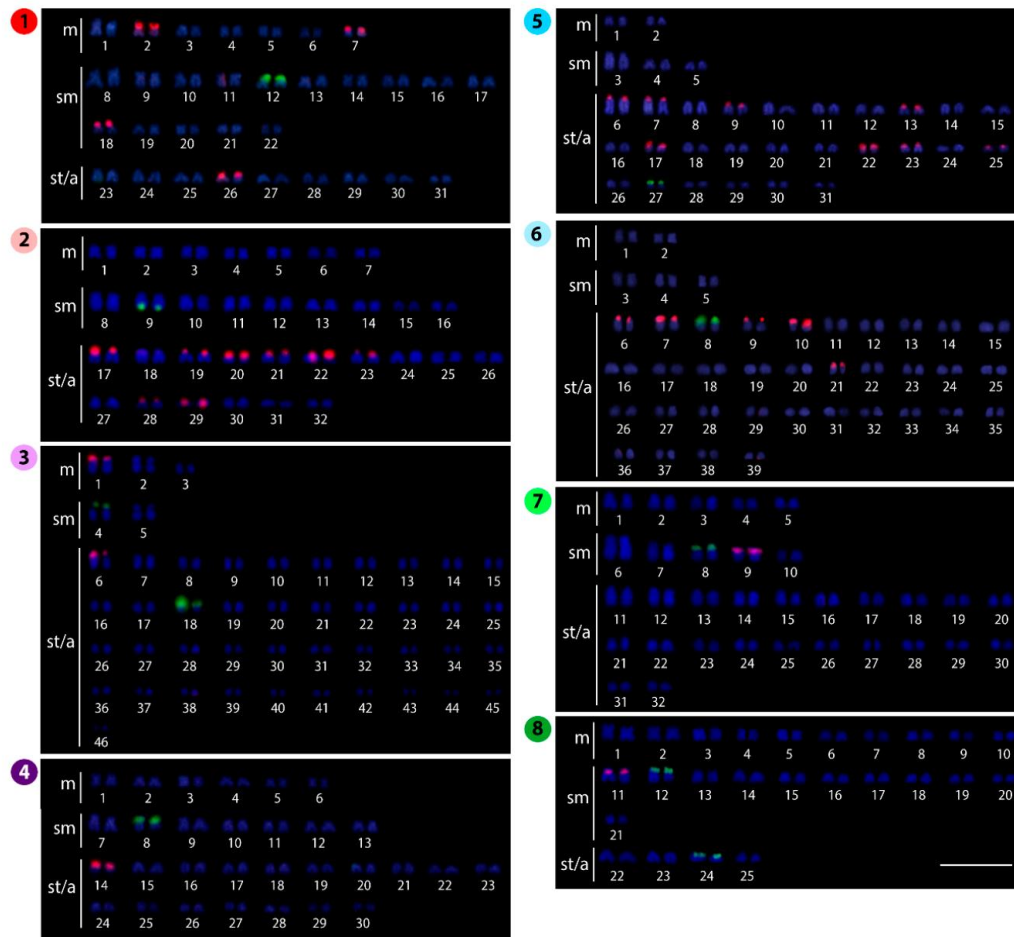


Figure 3. Karyotypes of *Belodontichthys truncates* (1); *Kryptopterus bicirrhis* (2); *Kryptopterus geminus* (3); *Kryptopterus limpok* (4); *Kryptopterus macrocephalus* (5); *Micronema cheveyi* (6); *Ompok fumidus* (7); and *Ompok siluroides* (8) arranged from chromosomes after double-fluorescence in situ hybridization (FISH) with 5S rDNA (red) and 18S rDNA (green) probes. Bar = 5 µm.

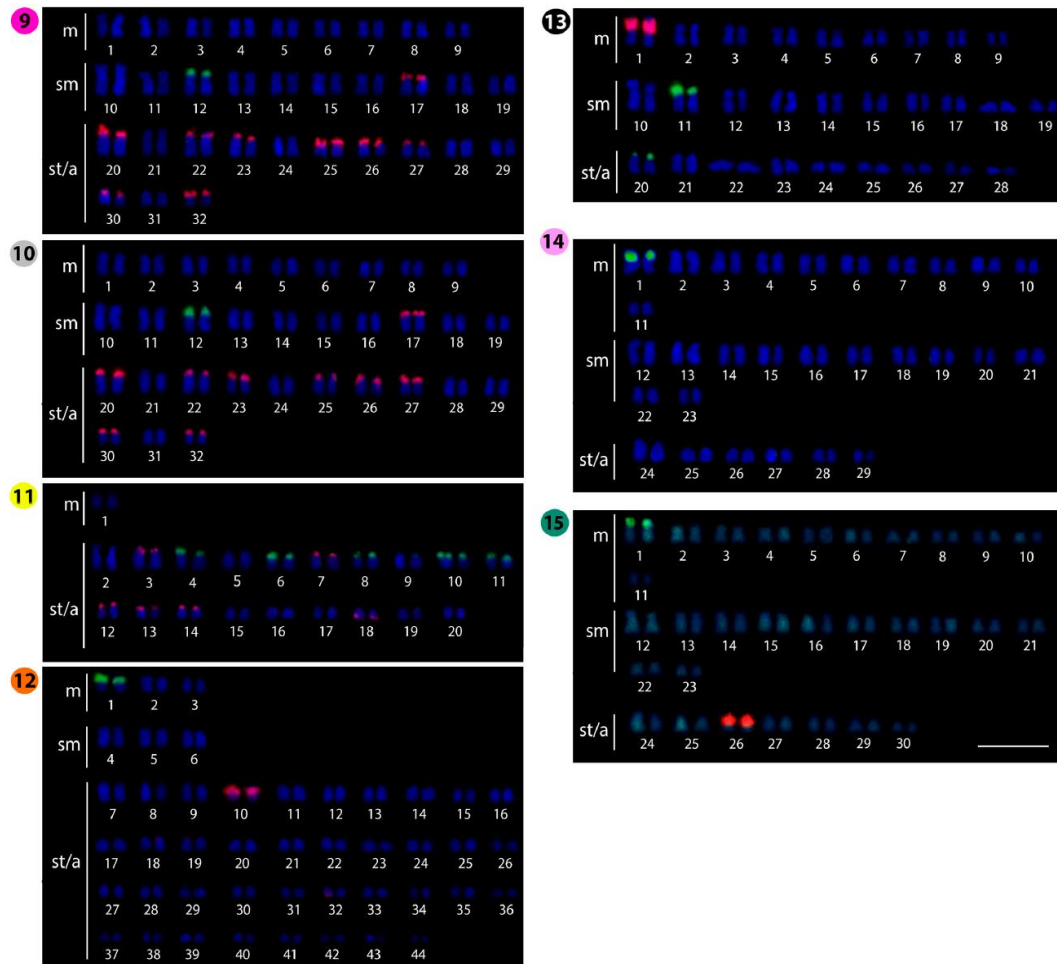


Figure 4. Karyotypes of *Phalacronotus apogon* (9); *Phalacronotus bleekeri* (10); *Silurichthys phaiosoma* (11); *Wallago attu* (12); *Wallago micropogon* (13); *Silurus aristotelis* (14); and *Silurus glanis* (15) arranged from chromosomes after double-FISH with 5S rDNA (red) and 18S rDNA (green) probes (except for *S. aristotelis*, where only 18S rDNA is indicated). Bar = 5 μ m.



Figure 5. Representative idiograms of *Belodontichthys truncatus* (1); *Kryptopterus bicirrhys* (2); *Kryptopterus giminus* (3); *Kryptopterus limpok* (4); *Kryptopterus microcephalus* (5); *Micronema cheveyi* (6); *Ompok fumidus* (7); *Ompok siluroides* (8); *Phalacronotus apogon* (9); *Phalacronotus bleekeri* (10); *Silurichthys phaiosoma* (11); *Wallago attu* (12); *Wallago micropogon* (13); *Silurus aristotelis* (14); and *Silurus glanis* (15), showing the distribution of the 5S (red) and 18S (green) rDNA sites on the respective chromosomes (except for *S. aristotelis*, where only 18S rDNA is indicated).

2.3. Comparative Genomic Hybridization (CGH)

CGH experiments employing the gDNA of *Kryptopterus* (*K. geminus* x *K. limpok*) and *Wallago* (*W. attu* x *W. micropogon*) indicated a large genomic divergence between the congeneric species. Specifically, *K. geminus* and *W. attu* exhibited many hybridization sites in the centromeric and terminal chromosomal regions when their own gDNA probes were hybridized against their chromosomal background. However, the *K. limpok* and *W. micropogon* gDNA probes produced only some weak terminal signals when hybridized against the *K. geminus* and *W. attu* chromosomes, respectively. In contrast, the *Phalacrodon* species (*P. bleekeri* and *P. apogon*) showed a significant shared repetitive content (Figure 6).

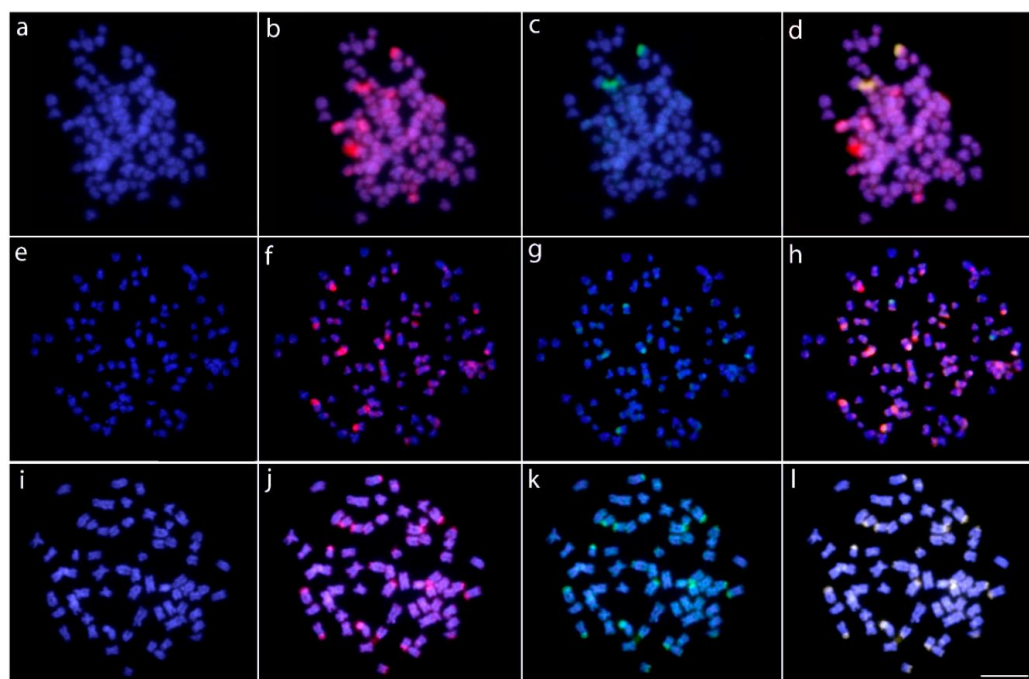


Figure 6. Metaphase chromosome spreads of *Kryptopterus geminus* (a–d), *Wallago attu* (e–h), and *Phalacrodon bleekeri* (i–l) after comparative genomic hybridization (CGH) procedures. Male-derived genomic probes from *K. geminus* and *K. limpok* were hybridized together against male chromosomes of *K. geminus* (a–d). Male-derived genomic probes from *W. attu* and *W. micropogon* were hybridized together against male chromosomes of *W. attu* (e–h). Male-derived genomic probes from *P. bleekeri* and *P. apogon* were hybridized together against male chromosomes of *P. bleekeri* (i–l). First column (a,e,i): DAPI images (blue). Second column (b,f,j): hybridization pattern using *K. geminus* (b), *W. attu* (f), and *P. bleekeri* (j) gDNA probes (red). Third column (c,g,k): hybridization pattern using *K. limpok* (c), *W. micropogon* (g), and *P. apogon* (k) gDNA probes (green). Fourth column (d,h,l): merged images of both genomic probes and DAPI staining. The shared genomic regions are depicted in yellow. Bar = 5 μ m.

3. Discussion

The comparison of cytogenetic data for silurid species uncovered a large genomic diversification. This has been highlighted by some published data (Table 1), as well as here by highly diversified $2n$, karyotype structures, numbers, and positions of ribosomal genes, and likely also by genomic differentiation, as preliminarily demonstrated by CGH experiments. The review of available cytogenomic data indicated a remarkable karyotype diversity, where the $2n$ number ranges from 28 in *S. microdon* to 92 in *Kryptopterus cryptopterus* and *K. geminus* (Table 1). Oliveira and Gosztonyi [68]

suggested that $2n = 56$ corresponds to the typical number of chromosomes for Siluriformes, as this same number is found in *Diplomystes*, a sister group of all extant Siluriformes [69], in addition to $2n = 54$ –58 being the most frequent pattern among siluriform catfishes. The extensive numerical variation of the chromosome number, both below and far above the supposedly basal $2n$, as well as the rate of bi-armed chromosomes in the karyotypes, indicate that a diversified number of rearrangements including fissions, fusions, and inversions may have acted to give rise to karyotypic diversity noticed in this family.

What could have driven the extensive karyotype diversification among silurid species?

It is widely known that karyotype diversification relates to speciation processes [70–72], sometimes with repetitive DNAs acting as primary driving forces (reviewed in the work of [73]). The mapping of repetitive sequences, especially ribosomal genes, has proven useful for estimating evolutionary karyotype changes [74]. Although rDNAs represent conservative elements of the eukaryotic genomes, recent studies have shown that the dynamism of the rDNA clusters is strongly related to significant intragenomic diversification [21,75–81]. Accordingly, rDNA elements showed remarkable differences among silurid species, especially regarding the high variability in the number and position of the 5S rDNA sites as compared with the more stable pattern of the 18S rDNA sites.

Extensive chromosomal variability of 5S rDNA loci also has been described for several other fish groups ([21,22,79,82]; for review, see the work of [74]). A question that arises is whether the dispersion of this rDNA class would be a byproduct of genomic/chromosomal changes. However, the absence of a direct correlation between higher $2n$ numbers and amplification and dispersion of the 5S rDNA clusters is an indication that this rDNA class was not the unique trigger for the chromosomal rearrangements occurring among the respective silurid species. In this sense, an alternative and attractive hypothesis refers to the action of transposable elements. Indeed, in several species, a significant fraction of the rDNA units is interrupted by transposable elements (TEs) highly specialized for insertions [82–86]. In some cases, TEs have been postulated to play a decisive role in spreading rDNA sequences over the genome [22,23,82]. Remarkably, structural changes in the location of rDNAs also could be linked with speciation events. In the sister salmonid species, *Coregonus albula* and *C. fontanae*, ecological speciation was directly associated with the spreading of rDNA sites, affecting recombination rates in both genomes [22]. It is known that multiple rDNA insertions in new genomic regions may create “hot spots” that promote chromosome rearrangements, representing a pathway for rapid genome reorganization during speciation (reviewed in the work of [84]). Nevertheless, up to now, we have no data concerning TEs among silurid species, which will be the goal of further investigations to assess this hypothesis. Besides, it is known that a variety of teleost lineages have undergone one or more rounds of independent whole-genome duplications (WGDs), which are among the most important evolutionary events occurring in fish species [18]. Although there is no direct indicative that silurids analyzed here have experienced WGD events, we cannot exclude the potential role of this process in the high genomic/chromosomal divergence observed.

The available data for silurids allow us to recognize three particular patterns in relation to the $2n$ numbers and karyotype structures that they present: (i) congeneric species that are highly divergent, as observed in *Kryptopterus* and *Wallago* species; (ii) congeneric species that share similar features, as represented by the two *Phalacrotonotus* species, *P. apogon*, and *P. bleekeri*; and (iii) particular species displaying a significantly lower chromosome number compared with the other species, as observed in *S. phaiosoma*. For the latter, although multiple chromosomal fusions would be expected to be related, no interstitial telomeric sequences (ITS) were observed (Figure S1). However, this does not definitely refute the possibility that fusion events occurred during karyotypic diversification, as losses of telomeric sequences can occur after such rearrangements, leading to gradual shortening of non-functional telomeric arrays [87–89].

Regarding the first two above-mentioned scenarios, we performed CGH experiments in order to assess whether they are linked with the repetitive DNA content. The remarkable chromosomal dynamism in both *Kryptopterus* and *Wallago* species corresponds with an extensive variation of their

repetitive DNA content, as demonstrated by a range of non-overlapping species-specific signals revealing an advanced stage of sequence divergence among their genomes (Figure 7). In fact, such repetitive DNA differentiations occurred concomitantly with $2n$ and structural changes in karyotypes. In contrast, no substantial variation of repetitive DNA content was found among the *Phalacrodonotus* species, where the hybridization of both gDNAs produced no species-specific signal amplifications (Figure 6). In these species, karyotypic changes were markedly reduced. As repetitive DNAs are highly abundant in eukaryotic genomes and display faster evolutionary rates [19,90,91], their role as the main factor in promoting karyotype rearrangements has been extensively investigated. Several reports have evidenced huge inter-population variations of this genomic fraction, promoting biodiversity and possibly linked with ongoing speciation and differentiation of sex-specific regions [24,92–95].

Other siluriform groups also experienced massive karyotype differentiation. *Clarias* species (Clariidae), for example, display a large range of $2n$ number, from 48 to 104 [79,96], in some cases also including polyploidization and interspecific hybridization events. In *C. batrachus* ($2n = 104$), a surprising spread of the 5S rDNA sequences over 27 chromosomal pairs occurs, directly linked with multiple centric fissions [79]. In addition, some other siluriform lineages experienced large karyotypic differentiation such as Callichthyidae, Loricariidae, and Trichomycteridae. In contrast, in families Amybicipitidae, Ictaluridae, and Sisoridae, only few species possess a reduced $2n$ number (reviewed in the work of [97]). However, it is evident that siluriform catfishes have, in general, much higher karyotypic diversity than their sister lineage Characiformes. With caution, in view of the fact that only about 15% of the siluriform fishes have been cytogenetically examined to date, it is noteworthy that the largest chromosomal diversity was observed for Siluridae.

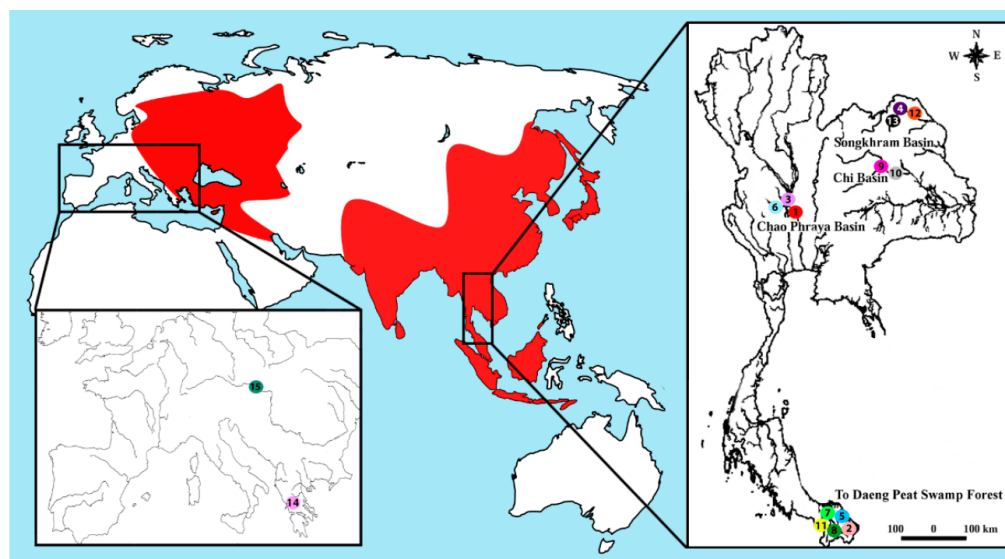


Figure 7. The current distribution of the fish family Siluridae (red color). Inset: Thailand map indicating the collection sites of the 13 species studied herein. 1. *Belodontichthys truncates* (red circle); 2. *Kryptopterus bicirrhys* (light pink circle); 3. *Kryptopterus giminus* (violet circle); 4. *Kryptopterus limpok* (purple circle); 5. *Kryptopterus microcephalus* (blue circle); 6. *Micronema cheveyi* (light blue circle); 7. *Ompok fumidus* (light green circle); 8. *Ompok siluroides* (green circle); 9. *Phalacrodonotus apogon* (pink circle); 10. *Phalacrodonotus bleekeri* (grey circle); 11. *Silurichthys phaiosoma* (yellow circle); 12. *Wallago attu* (orange circle); 13. *Wallago micropogon* (black circle); 14. *Silurus aristotelis* (pink circle); and 15. *Silurus glanis* (dark green circle). The maps were created using QGIS 3.4.3, Inkscape 0.92 and Photoshop 7.0.

4. Materials and Methods

4.1. Individuals and Mitotic Chromosome Preparation

Fifteen silurid species were collected from distinct natural ecosystems of Thailand and Europe (Figure 7). The numbers and sexes of the individuals are presented in Table 2. The specimens were deposited in the fish collections of the Cytogenetic Laboratory, Department of Biology, Faculty of Science (Khon Kaen University) and National Museum of Natural History, Paris (MNHN 1997–0481, MNHN 1996–1382). Mitotic chromosomes were obtained by the protocol described in the work of [98]. All the experiments followed ethical protocols, and anesthesia was conducted with clove oil prior to the sacrifice of the animals. The process was approved by the Animal Ethics Committee of Khon Kaen University based on the Ethics of Animal Experimentation of the National Research Council of Thailand AEKKU23/2558. Samples of *S. glanis* and *S. aristotelis* were obtained under state fisheries permits and research was conducted with approval from the University of Thessaloniki Ethics Committee.

Table 2. Collection sites for the analyzed species with the respective sample sizes.

Species	Locality	No. of Individuals
<i>Belodontichthys truncatus</i>	Chao Phraya Basin (Thailand) (site 1)	(04 ♀; 04 ♂)
<i>Kryptopterus bicirrhus</i>	To Daeng peat swamp forest (Thailand) (site 2)	(07 ♀; 08 ♂)
<i>Kryptopterus geminus</i>	Chao Phraya Basin (Thailand) (site 3)	(08 ♀; 11 ♂)
<i>Kryptopterus limpok</i>	Songkhram Basin (Thailand) (site 4)	(07 ♀; 10 ♂)
<i>Kryptopterus macrocephalus</i>	To Daeng peat swamp forest (Thailand) (site 5)	(06 ♀; 06 ♂)
<i>Micronema cheveyi</i>	Chao Phraya Basin (Thailand) (site 6)	(09 ♀; 10 ♂)
<i>Ompok fumidus</i>	To Daeng peat swamp forest (Thailand) (site 7)	(05 ♀; 07 ♂)
<i>Ompok siluroides</i>	To Daeng peat swamp forest (Thailand) (site 8)	(04 ♀; 05 ♂)
<i>Phalacronotus apogon</i>	Chi Basin (Thailand) (site 9)	(06 ♀; 05 ♂)
<i>Phalacronotus bleekeri</i>	Chi Basin (Thailand) (site 10)	(07 ♀; 04 ♂)
<i>Silurichthys phaiosoma</i>	To Daeng peat swamp forest (Thailand) (site 11)	(04 ♀; 06 ♂)
<i>Wallago attu</i>	Songkhram Basin (Thailand) (site 12)	(03 ♀; 04 ♂)
<i>Wallago micropogon</i>	Songkhram Basin (Thailand) (site 13)	(04 ♀; 04 ♂)
<i>Silurus aristotelis</i>	Trichonida Lake (Greece) (site 14)	(03 ♀; 05 ♂)
<i>Silurus glanis</i>	Dyje River, Danube basin (Czech republic) (site 15)	(08 ♀; 06 ♂)

Sites 1 to 15 correspond to the localization of each collection region shown in Figure 7.

4.2. Fluorescence In Situ Hybridization (FISH)

FISH was done under high-stringency conditions on metaphase chromosome spreads [99], with specific probes for 5S and 18S rDNA and telomeric sequences. The 5S rDNA probe included the transcriptional segment of the 5S rRNA gene, with 120 base pairs (bp), and the 200-base pair non-transcribed spacer (NTS) [100]. The 18S rDNA probe corresponded to a 1400 base-pair segment of the 18S rDNA gene [101]. Both rDNA probes were directly labeled with the Nick-translation Labeling Kit (Jena Bioscience, Jena, Germany) by the fluorescent labels Atto488 (18S rDNA) and Atto550 (5S rDNA), according to the manufacturer's manual. We applied both rDNA probes in all analyzed species, with the exception of *S. aristotelis*, where only 18S rDNA mapping was performed.

In order to check the presence of ITS (interstitial telomeric sequences), telomeric (TTAGGG)_n sequences were mapped in the species with the lowest 2n (*S. phaiosoma*) using the DAKO Telomere PNA FISH Kit/Cy3 (DAKO, Glostrup, Denmark).

4.3. Comparative Genome Hybridization (CGH)

Total genomic DNA (gDNAs) of the *K. geminus*, *K. limpok*, *P. apogon*, *P. bleekeri*, *W. attu*, and *W. micropogon* were extracted from liver tissue by the standard phenol-chloroform-isoamyl alcohol method [102]. As substantial variation in both $2n$ number and karyotype formula were observed among species of the genus *Kryptopterus* and *Wallago*, the gDNA of *K. geminus* was compared with that of *K. limpok* in metaphase chromosomes of *K. geminus*. Similarly, the gDNAs of *W. attu* and *W. micropogon* were hybridized in metaphase chromosomes of *W. attu*. For these purposes, gDNAs of *K. geminus* and *W. attu* were directly labeled with Atto550 using the Nick-translation Labeling Kit (Jena Bioscience, Jena, Germany), while the gDNAs of *K. limpok* and *W. micropogon* were labeled with Atto488. To block common genomic repetitive sequences, C0t-1 DNA (i.e., a fraction of genomic DNA enriched for highly and moderately repetitive sequences), prepared according to Zwick et al. [103], was used in all experiments. The final hybridization mixture for each experiment was composed of 500 ng labeled DNA of each compared species, plus 15 µg of male-derived C0t-1 DNA from the respective species and the hybridization buffer (50% formamide, 2× SSC, 10% SDSC 10% dextran sulfate and Denhardt's solution, pH 7.0). The gDNA of *Phalacrotonotus apogon* (Atto488) was also compared with that of *P. bleekeri* (Atto550) against metaphase chromosomes of *P. apogon*. The CGH experiments were performed according to Symonová et al. [22].

4.4. Cytogenetic Analyses

At least 30 metaphase spreads per individual were analyzed to confirm the $2n$, karyotype structure, and FISH results. Images were captured using an Axioplan II microscope (Carl Zeiss Jena GmbH, Germany) with CoolSNAP and the images were processed using Image Pro Plus 4.1 software (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA). Chromosomes were classified as metacentric (m), submetacentric (sm), subtelocentric (st), or acrocentric (a), according to the arm length ratios [104].

5. Conclusions

Chromosomal characteristics, including the mapping of repetitive DNA sequences and CGH procedures, clarified the evolutionary dynamism among silurid species. In this sense, the known extensive diversification of their karyotypic macrostructure could be better characterized. Our data provide evidence for a direct correlation between the genomic repetitive content and the notable karyotypic divergence in silurids. Thus, it is likely that repetitive DNAs played a direct role in promoting the chromosomal differentiation and biodiversity within this fish family.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/1422-0067/20/14/3545/s1>, Figure S1: Metaphase plates of *Silurichthys phaiosoma* showing the location of telomeric (TTAGGG) $_n$ repeats. Bar = 5 µm.

Author Contributions: Conceptualization, P.R., W.F.M., and M.d.B.C.; Data curation, E.H.; Formal analysis, S.D., L.A.C.B., A.T., C.O.-C., and M.d.B.C.; Funding acquisition, M.B.C.; Investigation, E.H., S.T., R.A., and M.d.B.C.; Methodology, S.D., E.H., W.F.M., C.T., S.T., P.P. and W.S.; Project administration, T.L., L.A.C.B., P.R., W.S., A.T. and M.d.B.C.; Software, S.D.; Validation, T.L., W.F.M., A.T., C.T., C.O.-C., S.T., P.P., and W.S.; Visualization, S.D., P.R., W.F.M., W.S., A.T., C.O.-C., S.T., P.P., W.S., and R.A.; Writing—original draft, T.L., S.D., L.A.C.B., P.R., W.F.M., W.S., A.T., P.P., W.S., R.A., and M.d.B.C.; Writing—review and editing, T.L., S.D., L.A.C.B., P.R., E.H., W.F.M., W.S., A.T., C.T., C.O.-C., S.T., P.P., W.S., R.A., and M.d.B.C.

Funding: This work was supported by the Thailand Research Fund (TRF) through the Royal Golden Jubilee (RGJ) Ph.D. Programme Grant No. PHD/0165/2559 and the office of the Higher Education Commission and the Thailand Research Fund (TRF) MRG6080020. MBC was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Proc. Nos. 401962/2016-4 and 302449/2018-3), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Proc. Nos. 2018/22033-1), and CAPES/Alexander von Humboldt (Proc. No. 88881.136128/2017-01). P.R. was supported by the project EXCELLENCE CZ.02.1.01/0.0/0.0/15_003/0000460 OP RDE.

Acknowledgments: The authors are grateful for FAPESP, CNPQ, CAPES, and Alexander von Humboldt foundation for the support.

Conflicts of Interest: None of the authors have any conflicts of interest in the manuscript.

References

1. Kottelat, M. The fishes of the inland waters of Southeast Asia: A catalogue and core bibliography of the fishes known to occur in freshwaters, mangroves and estuaries. *Raffles Bull Zool.* **2013**, *27*, 1–663.
2. Fricke, R.; Eschmeyer, W.; van der Laan, R. *Eschmeyer's Catalog of Fishes: Genera, Species, References*; California Academy of Sciences: San Francisco, CA, USA, 2019.
3. Bornbusch, A.H. Phylogenetic relationships within the Eurasian catfish family Siluridae (Pisces: Siluriformes), with comments on generic validities and biogeography. *Zool. J. Linn. Soc.* **1995**, *115*, 1–46. [[CrossRef](#)]
4. Kobayakawa, M. Systematic revision of the catfish genus *Silurus*, with description of a new species from Thailand and Burma. *Jpn. J. Ichthyol.* **1989**, *36*, 155–186. [[CrossRef](#)]
5. Kottelat, M.; Freyhof, J. *Handbook of European Freshwater Fishes*; Publications Kottelat: Berlin, Germany, 2007.
6. Bogutskaya, N.G.; Naseka, A.M.; Shedko, S.V.; Vasileva, E.D.; Chereschnev, I.A. The fishes of the Amur River: Updated check-list and zoogeography. *Ichthyological Explor. Freshw.* **2008**, *19*, 301–366.
7. Nelson, J.S.; Grande, T.C.; Wilson, M.V.H. *Fishes of the World*, 5th ed.; John Wiley & Sons: Hoboken, NJ, USA, 2016.
8. Bornbusch, A.H. Monophyly of the catfish family Siluridae (Teleostei: Siluriformes), with a critique of previous hypotheses of the family's relationships. *Zool. J. Linn. Soc.* **1991**, *101*, 105–120. [[CrossRef](#)]
9. Hardman, M. The phylogenetic relationships among non-diplomystid catfishes as inferred from mitochondrial cytochrome *b* sequences; the search for the ictalurid sister taxon (Otophysi: Siluriformes). *Mol. Phylogenet. Evol.* **2005**, *37*, 700–720. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Mo, T. Anatomy, relationships and systematics of the Bagridae (Teleostei: Siluroidei) with a hypothesis of siluroid phylogeny. *Theses Zool.* **1991**, *17*, 1–216.
11. Pinna, M.C.C. Higher-level phylogeny of Siluriformes (Teleostei, Ostariophysi), with a new classification of the order. Ph.D. dissertation, City University of New York, New York, NY, USA, 1993.
12. Diogo, R. Higher-level phylogeny of Siluriformes: An overview. In *Catfishes Science*; Arratia, G., Kapoor, B.G., Eds.; Science Publishers: Enfield, UK, 2003; pp. 353–384.
13. Sullivan, J.P.; Lundberg, J.G.; Hardman, M. A phylogenetic analysis of the major groups of catfishes (Teleostei: Siluriformes) using *rag1* and *rag2* nuclear gene sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* **2006**, *41*, 636–662. [[CrossRef](#)]
14. Stone, R. The last of the Leviathans. *Science* **2007**, *316*, 1684–1688. [[CrossRef](#)]
15. Linhart, O.; Šetch, L.; Švarc, J.; Rodina, M.; Audebert, J.P.; Grecu, J.; Billard, R. The culture of the European catfish, *Silurus glanis*, in the Czech Republic and in France. *Aquat. Living Resour.* **2002**, *15*, 139–144. [[CrossRef](#)]
16. Saenjundaeng, P. *Encyclopedia of Freshwater Fishes in Thailand*; Klungnana Vitthaya Press: Khon Kaen, Thailand, 2014.
17. Chapman, F.A.; Fitz-Coy, S.A.; Thunberg, E.M.; Adams, C.M. United States of America trade in ornamental fish. *J. World Aquac. Soc.* **1997**, *28*, 1–10. [[CrossRef](#)]
18. Oliveira, C.; Almeida-Toledo, L.F.; Foresti, F. Karyotypic evolution in Neotropical fishes. In *Fish Cytogenetics*; Pisano, E., Ozouf-Costaz, C., Foresti, F., Kapoor, B.G., Eds.; Science Publishers: Enfield, UK, 2007; pp. 111–164.
19. Cioffi, M.B.; Bertollo, L.A.C. Chromosomal distribution and evolution of repetitive DNAs in fish. In *Repetitive DNA*; Garrido-Ramos, M.A., Ed.; Karger Publishers: Basel, Switzerland, 2012; Volume 7, pp. 197–221.
20. Cioffi, M.B.; Moreira-Filho, O.; Ráb, P.; Sember, A.; Molina, W.F.; Bertollo, L.A.C. Conventional cytogenetic approaches—useful and indispensable tools in discovering fish biodiversity. *Curr. Genet. Med. Rep.* **2018**, *6*, 176–186. [[CrossRef](#)]
21. Cioffi, M.B.; Bertollo, L.A.C.; Villa, M.A.; de Oliveira, E.A.; Tanomtong, A.; Yano, C.F.; Supiwong, W.; Chaveerach, A. Genomic organization of repetitive DNA elements and its implications for the chromosomal evolution of channid fishes (Actinopterygii, Perciformes). *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0130199. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Symonová, R.; Majtánová, Z.; Sember, A.; Staaks, G.B.O.; Bohlen, J.; Freyhof, J. Genome differentiation in a species pair of coregonine fishes: An extremely rapid speciation driven by stress-activated retrotransposons mediating extensive ribosomal DNA multiplications. *BMC Evol. Biol.* **2013**, *13*, 42–52. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Moraes, R.L.R.; Bertollo, L.A.C.; Marinho, M.M.F.; Yano, C.F.; Hatanaka, T.; Barby, F.F.; Troy, W.P.; Cioffi, M.B. Evolutionary relationships and cytotaxonomy considerations in the genus *Pyrrhulina* (Characiformes, Lebiasinidae). *Zebrafish* **2017**, *14*, 536–546. [[CrossRef](#)]

24. Sember, A.; Bertollo, L.A.C.; Ráb, P.; Yano, C.F.; Hatanaka, T.; de Oliveira, E.A.; Cioffi, M.B. Sex chromosome evolution and genomic divergence in the fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae). *Front. Genet.* **2018**, *9*, 1–12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Barby, F.F.; Bertollo, L.A.C.; de Oliveira, E.A.; Yano, C.F.; Hatanaka, T.; Ráb, P.; Sember, A.; Ezaz, T.; Artioni, R.F.; Liehr, T.; et al. Emerging patterns of genome organization in Notopteridae species (Teleostei, Osteoglossiformes) as revealed by zoo-FISH and comparative genomic hybridization (CGH). *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 1112. [[CrossRef](#)]
26. Verma, J.; Lakra, W.S.; Kushwaha, B.; Sirajuddin, M.; Nagpure, N.S.; Kumar, R. Characterization of two freshwater silurid catfish using conventional and molecular cytogenetic techniques. *J. Genet.* **2011**, *90*, 319–322. [[CrossRef](#)]
27. Lee, H.Y.; Yu, C.H.; Jeon, S.K.; Lee, H.S. The karyotype analysis on 29 species of freshwater fish in Korea. *Bull. Inst. Basic Sci. Inha Univ* **1983**, *79*–86.
28. Donsakul, T. Chromosome study on three species of silurid fishes, *Kryptopterus cryptopterus*, *K. bleekeri* and *Ompok bimaculatus*, of Thailand. In Proceedings of the 18th Congress on Science and Technology of Thailand, Bangkok, Thailand, 1992; pp. 398–399.
29. Donsakul, T. A study of chromosome in freshwater shark (*Wallago attu*), helicopter catfish (*W. leerii*), twisted-jaw sheatfish (*Belodontichthys dinema*) and glass catfish (*Kryptopterus bicirrhis*) from Thailand. In Proceedings of the 34th Kasetsart University Annual Conference (Fishery Section), Bangkok, Thailand, 1996; pp. 367–377.
30. Simporn, B. Cytogenetic of Sheatfish (Family Siluridae) in Thailand. Ph.D Dissertation, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand, 2015.
31. Hinegardner, R.; Rosen, D.E. Cellular DNA content and the evolution of teleostean fishes. *Amer. Natur.* **1972**, *106*, 621–644. [[CrossRef](#)]
32. Magtoon, W.; Donsakul, T. Karyotypes of *Silurichthys phaiosoma*, *S. schneideri*, *Ompok fumidus* and *Kryptopterus macrocephalus* (Family Siluridae) from Thailand. In Proceedings of the 35th Congress on Science and Technology of Thailand, Bangkok, Thailand, 2009; p. B0084.
33. Pinthong, K.; Supiwong, W.; Simporn, B.; Choocheangjaew, S.; Kakampuy, W.; Tanomtong, A. A First chromosomal and nucleolar organizer regions (NORs) Analyses of Chevey's sheatfish, *Micronema cheveyi* (Siluriformes, Siluridae). *Cytologia (Tokyo)* **2017**, *82*, 435–441. [[CrossRef](#)]
34. Rishi, K.K. Mitotic and meiotic chromosomes of a teleost, *Callichrous bimaculatus* (Bloch) with indications of male heterogamety. *Cienc. Cult.* **1976**, *28*, 1171–1173.
35. Khuda-Bukhsh, A.R. Cytogenetic analyses in eight species of teleostean fishes (Pisces): Karyotypes, multiple Ag-NORs, sex chromosomes. *Res. Rev. BioSci.* **2007**, *1*, 47–52.
36. Sharma, R. Chromosomal studies on two endangered catfishes *Ompok bimaculatus* (Bloch) and *Ompok pabda* (Hamilton-Buchanan). *Indian J. Anim. Sci.* **2008**.
37. Gomonteir, B.; Tanomtong, A.; Supiwong, W.; Sikhruadong, S.; Neeratanaphan, L.; Sanoamuang, L. Standardized karyotype and idiogram of two-spot glass catfish, *Ompok bimaculatus* (Siluriformes, Siluridae) in Thailand by conventional and Ag-NOR staining techniques. *Cytologia (Tokyo)*. **2012**, *77*, 459–464. [[CrossRef](#)]
38. Das, R.K.; Kar, R.N. Somatic chromosome analysis of a siluroid fish, *Rita chrysea* Day. *Caryologia* **1977**, *30*, 247–253. [[CrossRef](#)]
39. Datta, S.; Rahman, M.M.; Haque, M.A. Chromosomal studies on *Ompok pabda* (Hamilton). *Online J. Biol. Sci.* **2003**, *3*, 460–465.
40. Khuda Bukhsh, A.R.; Chanda, T. Somatic chromosomes of three species of hill stream fishes from Assam. In *Fish Genetics in India*; Das, P., Jhingran, A.G., Eds.; Today Tomorrow's Printers and Publishers: New Delhi, India, 1989; pp. 69–73.
41. Supiwong, W.; Tanomtong, A.; Jumrusthanasan, S.; Khakhong, S.; Leelarasamee, K.; Sanoamuang, L. A First karyotype analysis and chromosomal characteristic of nucleolar organizer regions (NORs) of common sheatfish, *Micronema apogon* (Siluriformes, Siluridae) in Thailand. *Cytologia (Tokyo)*. **2012**, *77*, 53–58. [[CrossRef](#)]
42. Iliadou, K.; Rackham, B.D. The chromosomes of a catfish *Parasilurus aristotelis* from Greece. *Jpn. J. Ichthyol.* **1990**, *37*, 144–148.
43. Rab, P.; Karakousis, Y.; Peios, C. Karyotype of *Silurus aristotelis* with reference to the cytotaxonomy of the genus *Silurus* (Pisces, Siluridae). *Folia Zool. (Czech Republic)* **1994**, *43*, 75–81.

44. Nogusa, S. Chromosome studies in Pisces, II. On the chromosomes of *Sillago sihama* (Sillaginidae) and *Parasilurus asotus* (Siluridae). *Jpn. J. Genet.* **1951**, *26*, 153–155. [[CrossRef](#)]
45. Muramoto, J. On the chromosomes of *Parasilurus asotus* (Linne). *Chrom. Inf. Serv.* **1969**, *10*, 18–19.
46. Fujioka, Y. A comparative study of the chromosomes in Japanese freshwater fishes I. A study of the somatic chromosome of common catfish *Parasilurus asotus* (Linne) and forktailed bullhead *Paleobagrus nudiceps* (Sauvage). *Bull. Fac. Educ. Yamaguchi Univ.* **1973**, *23*, 191–195.
47. Arai, R.; Katsuyama, I. A chromosome study on four species of Japanese catfishes (Pisces, Siluriformes). *Bull. Nat. Sci. Museum* **1974**, 187–192.
48. Ojima, Y. Cellular DNA contents of fishes determined by flow cytometry. *La Kromosomo II* **1990**, *57*, 1871–1888.
49. Kim, D.S. Karyotypes of nine species of the Korean catfishes (Teleostomi: Siluriformes). *Korean J. Genet.* **1982**, *4*, 57–68.
50. Yunhan, H.; Tun, Z. Karyotypic study of two species of Chinese catfishes (Siluridae). *J. Wuhan Univ. Nat. Sci. Ed.* **1983**, *3*.
51. Yu, X.J.; Zhou, T.; Li, Y.C.; Li, K.; Zhou, M. *Chromosomes of Chinese Freshwater Fishes*; Science Press: Beijing, China, 1989.
52. Cui, J.X.; Ren, X.H.; Yu, Q.X. Nuclear DNA content variation in fishes. *Cytologia* **1991**, *56*, 425–429.
53. Zhang, S.M. Nucleolar organizer regions in four species of fishes. *Chromosom. Inf. Serv.* **1992**, *53*, 6–8.
54. Li, Y.; Li, K.; Zhou, T. Cellular DNA content of fourteen species of freshwater fishes. *Acta Genet. Sin.* **1983**, *10*, 384–389.
55. Kim, D.S.; Kim, I.B.; Huh, H.T.; Park, I. Cytogenetic analysis of catfish, *Silurus asotus* (Teleostomi: Siluriformes). *Ocean Polar Res.* **1988**, *10*, 33–37.
56. Yin, H.B.; Sun, Z.W.; Pan, W. The karyotype study on triploid catfish (*Silurus asotus*). *J. Fish. China* **1996**, *20*, 178–182.
57. Meszáros, B.; Bozhko, S.; Marian, T.; Krasznai, Z. About karyotype of *Silurus glanis*. *Halászat* **1975**, *21*, 110–111.
58. Krasznai, Z. *Silurus glanis* kariológiai és szerológiai vizsgálatának eredményei. Results of karyological and serological studies in catfish *Silurus glanis*. *Halászat* **1978**, *24*, 2–4.
59. Ráb, P. Karyotype of European catfish *Silurus glanis* (Siluridae, Pisces), with remarks on cytogenetics of siluroid fishes. *Folia Zool.* **1981**, *32*, 271–286.
60. Sofradzija, A. Chromosomes of the species *Silurus glanis* L. 1758 (Siluridae, Pisces). *Genetics* **1982**, *14*, 103–110.
61. Vujosevic, M.; Zivkovic, C.; Desanka, R.; Jurisic, S.; Cacic, P. The chromosomes of 9 fish species from Dunav basin in Yugoslavia. *Ichthyologia* **1983**, *15*, 29–40.
62. Vasilev, V.P. *Evolutionary Karyology of Fishes*; Nauka Publishers: Moscow, Russia, 1985.
63. Al-Sabti, K. Cytogenetic studies on five species of Pisces from Yugoslavia. *Cytobios* **1987**, *49*, 175–188.
64. Ráb, P.; Mayr, B.; Roth, P. Chromosome banding study of European catfish, *Silurus glanis* (Pisces, Siluridae). *Genetica* **1991**, *83*, 153–157.
65. Hu, G.; Sun, G.; Zhang, Y.; Gu, Q.; Li, G.; Tang, H.; Fan, L. Karyotype analyses of northern sheatfish (*Silurus soldatovi*). *J. Dalian Fish. Coll.* **2005**, *20*, 318–321.
66. Rishi, K.K.; Singh, J. Chromosomal analysis of the Indian silurid, *Wallago attu* (Schneider) (Family: Siluridae). *Chrom. Inf. Serv.* **1983**, *34*, 10–11.
67. Sharma, O.P.; Tripathi, N.K. Somatic chromosome analysis of *Wallago attu*, a siluroid fish from Jammu (J & K), India. *Perspect. Cytol. Genet.* **1984**, *4*, 437–439.
68. Oliveira, C.; Gosztonyi, A.E. A cytogenetic study of *Diplomystes mesembrinus* (Teleostei, Siluriformes, Diplomystidae) with a discussion of chromosome evolution in Siluriforms. *Caryologia* **2000**, *53*, 31–37. [[CrossRef](#)]
69. Kappas, I.; Vitas, S.; Pantartzis, C.N.; Drosopoulou, E.; Scouras, Z.G. A time-calibrated mitogenome phylogeny of catfish (Teleostei: Siluriformes). *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0166988. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. White, M.J.D. Chain processes in chromosomal speciation. *Syst. Zool.* **1978**, *27*, 285–298. [[CrossRef](#)]
71. King, M. *Species Evolution: The Role of Chromosome Change*; Cambridge University Press: Cambridge, UK, 1995; ISBN 0521484545.
72. Potter, S.; Bragg, J.G.; Blom, M.P.K.; Deakin, J.E.; Kirkpatrick, M.; Eldridge, M.D.B.; Moritz, C. Chromosomal speciation in the genomics era: Disentangling phylogenetic evolution of rock-wallabies. *Front. Genet.* **2017**, *8*, 1–18. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Biémont, C.; Vieira, C. Genetics: Junk DNA as an evolutionary force. *Nature* **2006**, *443*, 521–524. [[CrossRef](#)]

74. Sochorová, J.; Garcia, S.; Gálvez, F.; Symonová, R.; Kovařík, A. Evolutionary trends in animal ribosomal DNA loci: Introduction to a new online database. *Chromosoma* **2018**, *127*, 141–150. [\[CrossRef\]](#)
75. Gornung, E. Twenty years of physical mapping of major ribosomal RNA genes across the teleosts: A review of research. *Cytogenet. Genome Res.* **2013**, *141*, 90–102. [\[CrossRef\]](#)
76. Rebordinos, L.; Cross, I.; Merlo, A. High evolutionary dynamism in 5S rDNA of fish: State of the art. *Cytogenet. Genome Res.* **2013**, *141*, 103–113. [\[CrossRef\]](#)
77. Pereira, C.S.A.; Aboim, M.A.; Ráb, P.; Collares-Pereira, M.J. Introgressive hybridization as a promoter of genome reshuffling in natural homoploid fish hybrids (Cyprinidae, Leuciscinae). *Heredity* **2014**, *112*, 343–350. [\[CrossRef\]](#)
78. Sember, A.; Bohlen, J.; Šlechtová, V.; Altmanová, M.; Symonová, R.; Ráb, P. Karyotype differentiation in 19 species of river loach fishes (Nemacheilidae, Teleostei): Extensive variability associated with rDNA and heterochromatin distribution and its phylogenetic and ecological interpretation. *BMC Evol. Biol.* **2015**, *15*, 251–272. [\[CrossRef\]](#)
79. Maneechot, N.; Yano, C.F.; Bertollo, L.A.C.; Geflekha, N.; Molina, W.F.; Ditcharoen, S.; Tengjaroenkul, B.; Supiwong, W.; Tanomtong, A.; De Bello Cioffi, M. Genomic organization of repetitive DNAs highlights chromosomal evolution in the genus *Clarias* (Clariidae, Siluriformes). *Mol. Cytogenet.* **2016**. [\[CrossRef\]](#)
80. Symonová, R.; Howell, W. Vertebrate genome evolution in the light of fish cytogenomics and rDNAomics. *Genes* **2018**, *9*, 96. [\[CrossRef\]](#)
81. Boron, A.; Porycka, K.; Ito, D.; Abe, S.; Kirtiklis, L. Comparative molecular cytogenetic analysis of three *Leuciscus* species (Pisces, Cyprinidae) using chromosome banding and FISH with rDNA. *Genetica* **2009**, *135*, 199. [\[CrossRef\]](#)
82. Cioffi, M.B.; Martins, C.; Bertollo, L.A. Chromosome spreading of associated transposable elements and ribosomal DNA in the fish *Erythrinus erythrinus*. Implications for genome change and karyoevolution in fish. *BMC Evol. Biol.* **2010**, *10*, 271–279. [\[CrossRef\]](#)
83. Raskina, O.; Belyayev, A.; Nevo, E. Activity of the En/Spm-like transposons in meiosis as a base for chromosome repatterning in a small, isolated, peripheral population of *Aegilops speltoides* Tausch. *Chromosom. Res.* **2004**, *12*, 153–161. [\[CrossRef\]](#)
84. Raskina, O.; Barber, J.C.; Nevo, E.; Belyayev, A. Repetitive DNA and chromosomal rearrangements: Speciation-related events in plant genomes. *Cytogenet. Genome Res.* **2008**, *120*, 351–357. [\[CrossRef\]](#)
85. Eickbush, T.H.; Eickbush, D.G. Finely orchestrated movements: Evolution of the ribosomal RNA genes. *Genetics* **2007**, *175*, 477–485. [\[CrossRef\]](#)
86. Glugoski, L.; Giuliano-Caetano, L.; Moreira-Filho, O.; Vicari, M.R.; Nogaroto, V. Co-located hAT transposable element and 5S rDNA in an interstitial telomeric sequence suggest the formation of Robertsonian fusion in armored catfish. *Gene* **2018**, *650*, 49–54. [\[CrossRef\]](#)
87. Slijepcevic, P. Telomeres and mechanisms of Robertsonian fusion. *Chromosoma* **1998**, *107*, 136–140. [\[CrossRef\]](#)
88. Ruiz-Herrera, A.; Nergadze, S.G.; Santagostino, M.; Giulotto, E. Telomeric repeats far from the ends: Mechanisms of origin and role in evolution. *Cytogenet. Genome Res.* **2008**, *122*, 219–228. [\[CrossRef\]](#)
89. Ocalewicz, K. Telomeres in fishes. *Cytogenet. Genome Res.* **2013**, *141*, 114–125. [\[CrossRef\]](#)
90. Charlesworth, B.; Snlegowski, P.; Stephan, W. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature* **1994**, *371*. [\[CrossRef\]](#)
91. López-Flores, I.; Garrido-Ramos, M.A. The repetitive DNA content of eukaryotic genomes. In *Repetitive DNA*; Garrido-Ramos, M.A., Ed.; Karger Publishers: Basel, Switzerland, 2012; Volume 7, pp. 1–28.
92. Vicari, M.R.; Artoni, R.F.; Bertollo, L.A.C. Comparative cytogenetics of *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae). A population analysis in adjacent hydrographic basins. *Genet. Mol. Biol.* **2005**, *28*, 103–110. [\[CrossRef\]](#)
93. Da Rosa, R.; Laforga Vanzela, A.L.; Rubert, M.; Martins-Santos, I.C.; Giuliano-Caetano, L. Differentiation of Y chromosome in the X1 × 1X 2 × 2/X1 × 2Y sex chromosome system of *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae). *Cytogenet. Genome Res.* **2010**, *127*, 54–60. [\[CrossRef\]](#)
94. Cioffi, M.B.; Martins, C.; Bertollo, L.A.C. Comparative chromosome mapping of repetitive sequences. Implications for genomic evolution in the fish, *Hoplias malabaricus*. *BMC Genet.* **2009**, *10*, 34.

95. De Oliveira, E.A.; Sember, A.; Bertollo, L.A.C.; Yano, C.F.; Ezaz, T.; Moreira-Filho, O.; Hatanaka, T.; Trifonov, V.; Liehr, T.; Al-Rikabi, A.B.H.; et al. Tracking the evolutionary pathway of sex chromosomes among fishes: Characterizing the unique XX/XY1Y2 system in *Hoplias malabaricus* (Teleostei, Characiformes). *Chromosoma* **2018**, *127*, 115–128. [[CrossRef](#)]
96. Eyo, J.E. Cytogenetic variations in *Clarias* species (Clariidae: Siluriformes) of the Anambra river using leucocytes culture techniques. *Anim. Res. Int.* **2005**, *2*, 275–286.
97. Arai, R. *Fish Karyotype A Check List*; Springer Japan: Tokio, Japan, 2011.
98. Bertollo, L.A.C.; Cioffi, M.B.; Moreira-Filho, O. Direct chromosome preparation from freshwater teleost fishes. In *Fish Cytogenetic Techniques (Chondrichthyans and Teleosts)*; Ozouf-Costaz, C., Pisano, E., Foresti, F., Almeida Toledo, L.F., Eds.; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2015; pp. 21–26.
99. Yano, C.F.; Bertollo, L.A.C.; Cioffi, M.B. Fish-FISH: Molecular cytogenetics in fish species. In *Fluorescence in Situ Hybridization (FISH)—Application Guide*; Liehr, T., Ed.; Springer: Berlin, Germany, 2017; pp. 429–444.
100. Pendás, A.M.; Mórán, P.; Freije, J.P.; Garcia-Vásquez, E. Chromosomal location and nucleotide sequence of two tandem repeats of the Atlantic salmon 5S rDNA. *Cytogenet. Cell. Genet.* **1994**, *67*, 31–36. [[CrossRef](#)]
101. Cioffi, M.B.; Martins, C.; Centofante, L.; Jacobina, U.; Bertollo, L.A.C. Chromosomal variability among allopatric populations of Erythrinidae fish *Hoplias malabaricus*: Mapping of three classes of repetitive DNAs. *Cytogenet. Genome Res.* **2009**, *125*, 132–141. [[CrossRef](#)]
102. Sambrook, J.; Russell, D.W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*; Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York, NY, USA, 2001.
103. Zwick, M.S.; Hanson, R.E.; Mcknight, T.D.; Islam-Faridi, M.H.; Stelly, D.M.; Wing, R.A.; Price, H.J. A rapid procedure for the isolation of C 0 t-1 DNA from plants. *Genome* **1997**, *40*, 138–142. [[CrossRef](#)]
104. Levan, A.; Fredga, K.; Sandberg, A.A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* **1964**, *52*, 201–220. [[CrossRef](#)]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Comparative karyotype study of three Cyprinids (Cyprinidae, Cyprininae) in Thailand by classical cytogenetic and FISH techniques

Sumalee Phimphan¹, Patcharaporn Chaiyasan², Chatmongkon Suwannapoom³, Montri Reungsing⁴, Sippakorn Juntaree⁵, Alongklod Tanomtong² and Weerayuth Supiwong⁵¹

¹ Biology program, Faculty of Science and Technology, Phetchabun Rajabhat University, Phetchabun 67000, Thailand

² Toxic Substances in Livestock and Aquatic Animals Research Group, Department of Biology, Faculty of Science, Khon Kaen University, Muang, Khon Kaen 40002, Thailand

³ Department of Fishery, School of Agriculture and Natural Resources, University of Phayao, Muang, Phayao 56000, Thailand

⁴ Department of Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Rajamangala University of Technology Tawan-ok, Sri Racha, Chon Buri 20110, Thailand

⁵ Faculty of Applied Science and Engineering, Nong Khai Campus, Khon Kaen University, Muang, Nong Khai 43000, Thailand

Abstract

Three species of ornamental fishes in the subfamily Cyprininae (family Cyprinidae) namely, *Epalzeorhynchus frenatum*, *Puntigrus partipentazona*, *Scaphognathops bandanensis* were studied by classical cytogenetic and fluorescent in situ hybridization (FISH) techniques. Chromosomes were directly prepared from kidney tissues and stained by using conventional and Ag-NOR banding techniques. Microsatellite d(CA)₁₅ and d(CGG)₁₀ probes were hybridized to the chromosomes of three cyprinids. Results shown that the three cyprinid species share the same diploid number as $2n=50$ but there are differences in the fundamental number (NF) and karyotypes i.e. *E. frenatum*: NF=84, 18m+10sm+10a+12t; *P. partipentazona*: NF=94, 6m+24sm+14a+6t; *S. bandanensis*: NF=66, 4m+12sm+34t. NOR positive masks were observed at the regions adjacent to the telomere of the short arm of the chromosome pairs 10(submetacentric) and 1(metacentric) in *E. frenatum* and *P. partipentazona*, respectively whereas those were revealed at telomeric regions of the long arm of the chromosome pair 9(telocentric) in *S. bandanensis*. The mapping of d(CA)₁₅ and d(CGG)₁₀ microsatellites shown that hybridization signals are abundantly distributed in telomeric regions of several pairs except d(CA)₁₅ repeats in *S. bandanensis*, which are distributed throughout all

¹ Corresponding author, e-mail : supiwong@hotmail.com

chromosomes and d(CGG)₁₀ repeats in *P. partipentazona* display the high accumulation only in the first chromosome pair.

Key words: Chromosome, *Epalzeorhynchus frenatum*, *Puntigrus partipentazona*, *Scaphognathops bandanensis*, FISH

Introduction

There are about 200 species of freshwater fishes to use as ornamental fish in Thailand. The most popular species include *Betta splendens*, *Gyrinocheilus aymonieri*, *Epalzeorhynchus bicolor*, *E. frenatum*, *Puntigrus tetrazona*, *Channa micropeltes*, *Barbonyrus alter*, *B. schwanenfeldii* and *Balantiocheilus melanopterus* (Sermwatanakul, 2005). Ornamental fish industry is one developed base on the species diversity of Thailand due to high potential culture. Data from the export value of ornamental fishes in the world during 2006-2010 revealed that Thailand has the 6th highest export value whereas the global export market data has an average value as 326 million US\$. The exported ornamental fish value at 13,968,611 US\$ in 2006 rose to 18,928,773 US\$ in 2010, with a growth rate increased by an average rate of 6.53 percent per year (Bureau of Agricultural Economics Research, 2011). This indicates that at present, the export of ornamental fish industry is another sector where the growth rate is increased steadily and generating revenue for the country is enormous resulting to generate income for farmers in each year. The average family income is more than 170,000 baht per year (Department of Fisheries, 2010). Thus, ornamental fishes play an important role in national economy of Thailand. More than half of all ornamental fishes in Thailand belong to the Cyprinidae family.

Family Cyprinidae is the most abundant and globally widespread family of freshwater fish, comprising 3,000 species, living and extinct species in about 370 genera (Eschmeyer et al., 2015). The subfamily Cyprininae is one of the largest groups of this family. The essential large tribes such as Labeonini, Poropuntiini and Smiliogastrini have many species that are economically important ornamental fish of Thailand, namely *Epalzeorhynchus frenatum*, *Puntigrus partipentazona*, *Scaphognathops bandanensis* (Fig. 1A, D, G). However, the study of cytogenetics of these ornamental fishes is quite scarce. To date, there are most conventional techniques reported to determine chromosome number and karyotype composition and some NOR banding reported. The 2n ranged from 48-50 in the tribes Labeonini and Smiliogastrini while the tribe Poropuntiini is more conserved as 2n=50 (Arai 2011) (Table 1). To know the basic information on cytogenetics, it can apply for the development of the potentially commercial strains/species in the future. The studies of the karyotypes help to investigate the aquatic structure of the species population in each habitat, so it can determine what species are related to each other in an accurate manner. This may help to facilitate the hybridization between them in the future for strain improvement (Sofy et al., 2008), breeding practices of organisms by using chromosome set management (Na-Nakhon et al., 1980), brood stock selection (Meng ampan et al., 2004).

For some species, the simple characterization of the karyotype may be sufficient to identify intra- and inter-specific variants. However, in most cases, just the karyotype description appears to be

inconclusive when not coupled with other methods capable of generating more accurate chromosomal markers. In this sense, the use of molecular cytogenetic analyses has played an important role in the precise characterization of the structure of genomes (Cioffi and Bertollo, 2012). Multiple DNA copies or repetitive DNAs are a large substantial portion of the genome of eukaryotes that can be generally classified into two main classes: tandem repeats, such as the multigene families and the satellite DNAs; and the dispersed elements, such as transposons and retrotransposons, known as Transposable elements (TEs) (Jurka et al., 2005). Among the tandem repeats we can find the highly-repeated satellite DNAs and "moderate repeats", like mini- and microsatellite DNA (Charlesworth et al., 1994). These non-coding DNA sequences are organized as long arrays of head-to-tail linked repeats (Plohl et al., 2008).

Recently, the molecular cytogenetic studies using fluorescence *in situ* hybridization (FISH) for mapping repetitive DNA sequences have provided important contributions to the characterization of the biodiversity and the evolution of divergent fish groups (Cioffi and Bertollo, 2012). Most molecular cytogenetic studies in cypinid fishes were performed by FISH technique using rDNA probes (Inafuku et al. 2000, Kikuma et al. 2000, Ocalewicz et al. 2004, Zhu et al. 2006, Singh et al. 2009, Rossi et al. 2012, Nabais et al. 2013, Kirtiklis et al. 2014, Spoz et al. 2014, Han et al. 2015, Kumar et al. 2016, Han et al. 2017). However, NOR banding including fluorescence *in situ* hybridization (FISH) techniques to investigate chromosomal distribution of repetitive DNA sequences on the chromosomes of *E. frenatum*, *P. partipentazona*, *S. bandanensis* have not been performed.

In present study carried out an analysis of chromosomal structure and genetic markers on *E. frenatum*, *Puntigrus partipentazona*, and *Scaphognatops bandanensis* using cytogenetics, and molecular cytogenetics techniques. The knowledge revealed will provide a powerful tool for the next generation of genome research in Thai freshwater fishes and discovering biodiversity, with useful applications in fish breeding for conservation and commercials of ornamental species. Moreover, it is useful applications in evolution, systematics, phylogenetics, fish fauna management and suitable conservation of river basin.

Methods

Ten males and ten females of *E. frenatum*, *P. partipentazona*, *S. bandanensis*, were collected from the Song Kham, Chi and Mekong Basins, respectively. Preparation of fish chromosomes was from kidney cells (Pinthong *et al.* 2015, Supiwong *et al.* 2015). The chromosomes were stained with 10% Giemsa's for 30 minutes and identified for NORs by Ag-NOR staining (Howell and Black 1980). Metaphase figures were analyzed according to the chromosome classification of Turpin and Lejeune (1965). The centromeric index (CI) between 0.50-0.59, 0.60-0.69, 0.70-0.89 and 0.90-1.00 were described as metacentric, submetacentric, acrocentric and telocentric chromosomes, respectively. Fundamental number, NF (number of chromosome arm) is obtained by assigning a value of two to metacentric, submetacentric and acrocentric chromosomes and one to telocentric chromosomes.

The use of microsatellite d(CA)₁₅ and d(CGG)₁₀ probes described by Kubat et al. (2008) followed here with slight modifications. These sequences were directly labeled with Cy3 at 5' terminal

during synthesis by Sigma (St. Louis, MO, USA). Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) was performed under high stringency conditions on mitotic chromosome spreads (Pinkel *et al.* 1986). After denaturation of chromosomal DNA in 70% formamide/ 2×SSC at 70 °C, spreads were incubated in 2×SSC for 4 min at 70 °C. The hybridization mixture (2.5 ng/μL probes, 2 μg/μL salmon sperm DNA, 50% deionized formamide, 10% dextran sulphate) was dropped on the slides, and the hybridization was performed overnight at 37 °C in a moist chamber containing 2×SSC. The post hybridization wash was carried out with 1×SSC for 5 min at 65 °C. A final wash was performed at room temperature in 4×SSC for 5 min. Finally, the slides were counterstained with DAPI and mounted in an antifade solution (Vectashield from Vector laboratories) and analyzed in an epifluorescence microscope Olympus BX50 (Olympus Corporation, Ishikawa, Japan).

Results and discussion

Diploid number, fundamental number and karyotype of Epalzeorhynchus frenatum, Puntigrus partipentazona and Scaphognathops bandanensis

Results shown that the three cyprinid species have the same diploid number as $2n=50$. They are same as found in *P. tetrazona partipentazona* (Taki *et al.* 1977) and *S. bandanensis* (Donskul *et al.* 2007) but there is difference in *E. frenatum* ($2n=48$) reported by Magtoon and Donsakul (1993). The $2n$ in three cyprinids studied have the same $2n=50$ as in several species in the subfamily Cyprininae (Arai, 2011; Table 1). This indicates that this subfamily has highly conserved for the $2n$. Although three species analyzed share the same $2n$, there are differences in the fundamental number (NF) and karyotypes i.e. *E. frenatum*: NF=84, 18 metacentric (m), 10 submetacentric (sm), 10 acrocentric (a) and 12 telocentric (t) chromosomes; *P. partipentazona*: NF=94, 6m, 24sm, 14a, and 6t chromosomes; *S. bandanensis*: NF=66, 4m, 12sm, and 34t chromosomes (Fig. 1). To compare with the previous studies, the NFs of *E. frenatum*, *P. partipentazona* and *S. bandanensis* differ from the reports of Magtoon and Donsakul (1993), Taki *et al.* (1977) and Donskul *et al.* (2007), respectively. These differences may be caused from the species-specific variations among populations, and/or misidentification of species or different species due to complex species. Three studied species cannot be observed heteromorphic sex chromosomes between male and female specimens. This phenomenon is same as many species in this family (Arai, 2011).

Chromosome marker of Epalzeorhynchus frenatum, Puntigrus partipentazona and Scaphognathops bandanensis

The determination of nucleolar organizer regions (NORs) for these species was firstly proposed. If these loci are active during the interphase before to mitosis, they can be detected by silver nitrate staining (Howell and Black 1980) since they specifically stain a set of acidic proteins related to ribosomal synthesis process. NOR positive masks were observed at the regions adjacent to the telomere of the short arm of the chromosome pairs 10(submetacentric) and 1(metacentric) in *E. frenatum* and *P. partipentazona*, respectively whereas those were revealed at telomeric regions of the long arm of the chromosome pair 9(telocentric) in *S. bandanensis* (Fig. 2A, D, G and Table 2). The single NOR-

bearing chromosome pair in the present result is consistency to *Barbonymus gonionotus* (Khuda-Bukhsh and Das 2007), *Hypsibarbus wetmorei* (Piyapong 1999), *Osteochilus waandersi* (Magtoon and Arai 1993) and *Puntius brevis* (Nitikulworawong and Khruanet 2014). This character is common characteristic found in many fish groups as well as vertebrates (Supiwong et al., 2012, 2013). However, some species had two pairs (*Cyclocheilos enoplos*: Magtoon and Arai 1993), three pairs (*Cyclocheilichthys apogon*: Chantapan 2015) and four pairs (*Puntius denisonii*, *P. semifasciolatus*: Nagpure et al. 2004; *P. filamentosus*: Nagpure et al. 2003). NOR is frequently used to compare variations, as well as to identify and explain specifications. Changes in chromosome number and structure can alter the number, and structure of NOR. Structure, number, and morphology of a NOR may be specific to populations, species, and subspecies. Robertsonian translocations (centric fusion) may cause losses of NOR. Species, which have limited gene exchange due to geographical isolation, have elevated karyotype numbers and NOR variation. The use of NORs in explaining kinships depends on a large extent on the uniformity of this characteristic and on the degree of variety within a taxon (Yüksel and Gaffaroğlu, 2008). Normally, most fishes have only one pair of small NORs in a chromosome complement. If some fishes have more than two NORs, it may be caused by the translocation between NOR and another chromosome (Sharma et al. 2002).

Patterns of microsatellite repeats on the genome of Epalzeorhynchus frenatum, Puntigrus partipentazona and Scaphognathops bandanensis

The mapping of d(CA)₁₅ and d(CGG)₁₀ microsatellites shown that hybridization signals are abundantly distributed in telomeric regions of several pairs except d(CA)₁₅ repeats in *S. bandanensis*, which are distributed throughout all chromosomes and d(CGG)₁₀ repeats in *P. partipentazona* display the high accumulation only in the first chromosome pair (Fig. 2 and Table 2). The Figure 3 shows the idiograms representing the patterns of d(CA)₁₅ and d(CGG)₁₀ microsatellites distributions on the chromosomes of three studied species. Microsatellite d(CGG)₁₀ sequences were detected disperse hybridization signals with high accumulation of them at telomeric regions of several chromosomes in *E. frenatum* and *S. bandanensis*. However, it is interesting that the microsatellite d(CGG)₁₀ repeats coincide with the NOR positions in *P. partipentazona*. The patterns of microsatellites d(CA)₁₅ in three species in the present study except in *S. bandanensis* are different from the nine species of the Bagridae family including *Hemibagrus filamentus*, *H. spilopterus*, *H. wyckii*, *H. wyckioides*, *Mystus atrifasciatus*, *M. multiradiatus*, *M. mysticetus*, *M. bocourti*, and *Pseudomystus siamensis* (Supiwong et al., 2013, 2014), *Toxotes chatareus* (Supiwong et al., 2017). From the previous and current studies, it is believed that microsatellites have specific zones as heterochromatin (telomeres, centromeres and in the sex chromosomes) of fish genomes (Cioffi and Bertollo, 2012). However, microsatellites have also been found in noncentromeric regions, many of them were located either near or within genes (Rao et al., 2010).

The present research is the first report on the NOR -banding and FISH techniques in *E. frenatum*, *P. partipentazona*, *S. bandanensis*. Although both species have the same the diploid

chromosome number ($2n=50$) and two NOR-bearing chromosomes, there are differences in the fundamental number and the number of each chromosome sizes, pairs having NOR and the patterns of microsatellites distributions on chromosomes. The NORs can be observed at the regions adjacent to the telomeres of pairs 10, 1 and 9, respectively. The microsatellites are distributed throughout the chromosomes with high accumulations at some positions or all chromosomes which are species-specific characteristics. This result indicated that cytogenetic data can be used for classification in related fish species which have similar morphology.

Acknowledgments

This work was financially supported by the research grant of the Office of the Higher Education Commission and the Thailand Research Fund (MRG6080020), and the Post-Doctoral Training Program from Research Affairs and Graduate School (Grant no 59255), Khon Kaen University, and Unit of Excellence 2019 on Biodiversity and Natural Resources Management, University of Phayao (UoE62005), Thailand.

References

- Almeida-Toledo, L. F., Ozouf-Costaz, C., Foresti, F., Bonillo, C., Porto-Foresti, F. and Daniel-Silva, M. F. Z. 2002. Conservation of the 5S-bearing chromosome pair and co-localization with major rDNA clusters in five species of *Astyanax* (Pisces, Characidae). **Cytogenet Genome Res** 97: 229–233.
- Amemiya, C.T. and Gold, J.R. 1988. Chromosomal NORs as taxonomic and systematic characters in North American cyprinid fishes **Genetica** 76: 81-90.
- Arai, R. 2011. Fish Karyotypes: A Check List. Springer Japan, Tokyo.
- Arunachalan, M. and Murugan, M. 2007. Cytogenetics and cytotaxonomic consideration of two endangered ornamental fishes *Puntius arulius* and *P. tambraparniei* (Cypriniformes: Cyprinidae) from Western Ghats, India. **Zoo' Print journal** 22(7): 2739–2741.
- Bureau of Agricultural Economics Research. 2011. **Study on Economy, Production, and Marketing of Ornamental fishes**. Office of Agricultural Economics, Ministry of Agriculture and Cooperatives, Agricultural Economics Research No. September 2011. Bangkok. [in Thai]
- Chantapan, T. 2015. **Standardized karyotype and ideogram of cyprinid fishes (Subfamily: Cyprininae) in Thailand**. M.Sc. Thesis. Khon Kaen University.
- Charlesworth, B., Sniegowski, P., Stephan, W. 1994. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. **Nature** 371: 215-220. doi:10.1038/371215a0.
- Cioffi, M.B. and Bertollo, L.A.C. 2012. Distribution and evolution of repetitive DNAs in fish. In: Garrido- Ramos, M.A., (Ed), Repetitive DNA. **Karger, Genome Dyn.** 2012, vol 7, Basel, pp. 197-221.
- Cioffi, M.B., Bertollo, L.A.C., Villa, M.A., Oliveira, E, A. Tanomtong, A., Yano, C.F., Supiwong, W. and Chaveerach, A. 2015. Genomic organization of repetitive DNA elements and its

- implications for the chromosomal evolution of channid fishes (Actinopterygii, Perciformes). **PLOS ONE** 12: 1-13.
- Cioffi, M. B., Martins, C. and Bertollo, L. A. C. 2009. Comparative chromosome mapping of repetitive sequences. Implications for genomic evolution in the fish, *Hoplias malabaricus*. **BMC Genetics** 10: 34.
- Department of Fisheries. 1992. **Fish and Aquatic Animals of Thailand**. 2nd ed. Business Organization of the Teachers' Council of Thailand, Bangkok. [in Thai]
- Department of Fisheries. 2010. **Ornamental fish Strategy in 2555-2559 prepared by a working group of the Ornamental Fish Strategy Preparation under the Committee of Ornamental Fish Strategy Preparation**. Ministry of Agriculture and Cooperatives, Bangkok. [in Thai]
- Donsakul, T. and Magtoon, W. 1995a. Karyological studies of *Puntius brevis* (Bleeker, 1850) and *Cyclocheilichthys enoplos* in Thailand. In: **Proceeding of the 21st Congress on Science and Technology of Thailand**. pp. 292–293. Queen Sirikit National Convention Centre, Bangkok.
- Donsakul, T. and Magtoon, W. 1995b. Karyotypes of four cyprinid fishes, *Osteochilus melanopleura*, *Puntioplites proctozysron*, *Paralauca riveroi* and *Rasbora sumatrana*, from Thailand. In: **Proceedings of the 33rd Kasetsart University Annual Conference: Fisheries**. pp. 128–138. Kasetsart University, Bangkok. [in Thai]
- Donsakul, T. and Magtoon, W. 1997. A chromosome study of five species of cyprinid fishes, *Cirrhinia microlepis*, *Leptobarbus hoevenii*, *Labiobarbus spiroleura*, *Barbodes schwanenfeldii* and *Barbodes gonionotus* from Thailand. **Srinakharinwirot Science Journal** 2: 30–42.
- Donsakul, T. and Magtoon, W. 2001. Karyological studies of *Hypsibarbus lagler* and *H. vernay* in Thailand. In: **Proceedings of the 27th National Science and Technology Development Agency**. p. 434.
- Donsakul, T. and Magtoon, W. 2002. Karyotypes of two cyprinid fishes, *Hypsibarbus wetmorei* and *Morulus chrysophekadion*, from Thailand. In: **Proceedings of the 28th Congress on Science and Technology of Thailand**. p. 92. Queen Sirikit National Convention Centre, Bangkok.
- Donsakul, T. and Magtoon, W. 2008. Karyotypes of seven cyprinid fishes: *Systemus binotatus*, *Puntius brevis*, *Poropuntius laoensis*, *Labiobarbus siamensis*, *Catlocarpio siamensis*, *Tor tambroides* and *Probarbus jullieni* from Thailand. **Srinakharinwirot Science Journal** 24: 80–92.
- Donsakul, T., Magtoon, W. and Rangsiruji, A. 2005. Karyotypes of four Cyprinid fishes: *Cyclocheilichthys repasson*, *Cosmochilus harmandi*, *Poropuntius deauratus* and *Sikukia gudgeri* from Thailand. In: **Proceedings of the 43rd Kasetsart University Annual Conference: Fisheries**. pp. 344–351. Kasetsart University, Bangkok. [in Thai]
- Donsakul, T., Magtoon, W. and Rangsiruji, A. 2006. Karyological studies of four Cyprinid fishes: *Barbichthys nitidus*, *Mystacoleucus argenteus*, *Cychocheilichthys lagleri* and *Systemus* sp.1 from Thailand. In: **Proceedings of the 44rd Kasetsart University Annual Conference: Fisheries**. pp. 469–476. Kasetsart University, Bangkok. [in Thai]

- Donsakul, T. and Poopitayasathaporn, A. 2002. **Karyotype of Fifteen Species of Cyprinid Fishes (Family Cyprinidae) from Thailand**. Research Project. Srinakharinwirot University, Bangkok.
- Donsakul, T., Rangsiruji, A. and Magtoon, W. 2007. Karyotypes of four cyprinid fishes: *Poropuntius normani*, *Hypsibarbus malcolmi*, *Scaphognathops bandanensis* and *Henicorhynchus caudiguttatus* from Thailand. In: **The Proceedings of 45th Kasetsart University Annual Conference : Fisheries**. Bangkok. pp. 740-748. [in Thai]
- Donsakul, T., Rangsiruji, A. and Magtoon, W. 2011. Karyotypes of five cyprinid fishes (Family Cyprinidae) : *Bangana devdevi*, *Osteobrama alfrediana*, *Systomus stoliczkanus*, *Oxygaster anomalura* and *Aspidoparia morar* in Thailand. In: **Proceedings of the 49th Kasetsart University Annual Conference: Fisheries** pp. 169–177. Kasetsart University, Bangkok. [in Thai]
- Eschmeyer, W. N. (ed). 2015. **Catalog of Fishes: Genera, Species, References**. <http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>. Electronic version accessed 28 June 2016.
- Gold, J. R., Amemiya, C. T. and Ellison, J. R. 1986. Chromosomal heterochromatin differentiation in North American cyprinid fishes. **Cytologia** 51: 557–566.
- Gui, J.F., Li, Y.C., Li, K. and Zhou, T. 1986. Studies on the karyotypes of Chinese cyprinid fishes. (VIII) Karyotypic analyses of fifteen species of Barbinae with consideration for their phyletic evolution. **Transactions of the Chinese Ichthyological Society** 5: 119–127.
- Hatanaka, T. and Galetti, Jr. P. M. 2004. Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1829 (Characiformes, Prochilodontidae). **Genetica** 122: 239–244.
- Hinegardner, R. and Rosen, D.E. 1972. Cellular DNA content and the evolution of teleostean fishes. **The American Naturalist** 106: 621–644.
- 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: 1014–1015.
- Hsu, T. C., Patak, S. and Chen, T. R. 1975. The possibility of latent centromeres and a proposed nomenclature system for total chromosome and whole arm translocations. **Cytogenet Cell Genet** 15: 41–49.
- Jurka, J., Kapitonov, V.V., Pavlicek, A., Klonowski, P., Kohany, O. and Walichiewicz, J. 2005. Repbase update, a database of eukaryotic repetitive elements. **Cytogenet. Genome Res.** 110: 462-467. doi: 10.1159/000084979
- Khuda-Bukhsh, A.R. 1975. Somatic chromosomes of an exotic fish *Puntius japonicus*. **The Journal of Cytology and Genetics (India)** 118–120.
- Khuda-Bukhsh, A.R. and Barat, A. 1987. Chromosomes in fifteen species of Indian teleosts (Pisces). **Caryologia** 40: 131–144.

- Khuda-Bukhsh, A.R. and Das, J.K. 2007. Cytogenetic analyses in eight species of teleostean fishes (Pisces): karyotypes, multiple Ag-NORs, sex chromosomes. **Research and Reviews in BioSciences (India)** 1: 47–52.
- Krishnaja, A.P. and Rege, M.S. 1980. Some observations on the chromosomes of certain teleosts using a simple method. **Indian Journal of Experimental Biology** 18: 268–270.
- Kubat, Z., Hobza, R., Vyskot, B. and Kejnovsky, E. 2008. Microsatellite accumulation in the Y chromosome of *Silene latifolia*. **Genome** 51: 350–356.
- Liehr, T. (ed). 2009. **Fluorescence In Situ Hybridization (FISH)-Application Guide**. Springer, Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Magtoon, W. and Arai, R. 1989. Karyotypes of five *Puntius* species and one *Cyclocheilichthys* species (Pisces, Cyprinidae) from Thailand. **Bulletin of the National Science Museum, Tokyo. Series A (Zoology)** 15(3): 167–175.
- Magtoon, W. and Arai, R. 1993. Karyotypes and distribution of nucleolus organizer regions in cyprinid fishes from Thailand. **Japanese Journal of Ichthyology** 40(1): 77–85.
- Magtoon, W. and Donsakul, T. 1993. A chromosome study on three Cyprinid fishes, *Labeo erythrurus*, *L. bicolor* and *L. rohita*. In: **Proceedings of 31st Kasetsart University Annual Conference: Animal, Fisheries and Veterinary Medicine**. Kasetsart University, Bangkok. pp. 543–551. [in Thai]
- Maneechot, N., Yano, C.F., Bertollo, L.A.C., Getlekha, N., Molina, W.F., Ditcharoen, S., Tengjaroenkul, B., Supiwong, W., Tanomtong, A. and Cioffi, M.B. 2016. Genomic organization of repetitive DNAs highlights chromosomal evolution in the genus *Clarias* (Clariidae, Siluriformes). **Molecular Cytogenetics** (2016) 9: 4. doi 10.1186/s13039-016-0215-2.
- Mantovani, M., Abel, L.D.S., Mestriner, C.A. and Moreira-Filho, O. 2004. Evidence of the differentiated structural arrangement of constitutive heterochromatin between two populations of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). **Genetics and Molecular Biology** 27: 536–542.
- Martins, C. 2007. Chromosomes and Repetitive DNAs: A Contribution to the Knowledge of the Fish Genome. In: Pisano, E., Ozouf-Costaz, C. and Foresti, F. (Editors). **Fish Cytogenetics**. Science Publishers pp 421–453.
- Mengampan, K., Manosoy, J., Meevetee, A. and Manosoy, A. 2004. Chromosomal Karyotyping from Peripheral Blood Lymphocytes of the Mekong Giant Catfish (*Pangasianodon gigas*, Chevey). **Thai Fisheries Gazette** 57(4): 349–351. [in Thai]
- Nagpure, N.S., Kumar, R., Srivastava, S.K., Gopalakrishnan, A., Verma, M.S. and Baseer, V.S. 2004. Cytogenetic studies of fish species *Horabagrus nigricollaris*, *Puntius denisonii* and *Puntius sarana subnasutus* endemic to the Western Ghats. **The Nucleus** 47: 143–148.
- Nagpure, N.S., Kushwaha, B., Srivastava, S.K., Kumar, R., Gopalakrishnan, A., Baseer, V.S. and Verma, M.S. 2003. Characterization of three endemic fish species from Western Ghats using cytogenetic markers. **The Nucleus** 46: 110–114.

- Na-Nakorn, U., Tarnchalanukit, W. and Taptippawan, P. 1980. Induction of triploidy in *Clarias batrachus* by cold shock. **Kasetsart Journal** 22: 116-121. [in Thai]
- Nelson, J. S. 2006. Fishes of the World, 4th ed. John Wiley & Sons, New York.
- Nitikulworawong, N. and Khrueanet, W. 2014. Karyotypic of golden little barb, *Puntius brevis* Bleeker, 1850 (Pisces: Cyprinidae) from Khon Kaen Province. **KKU Science Journal** 42(1): 106–118.
- Ohno, S., Muramoto, J., Christian, L. and Atkin, N.B. 1967. Diploid-tetraploid relationship among Old-World members of the fish family Cyprinidae. **Chromosoma** 23: 1–9.
- Ojima, Y. and Yamamoto, K. 1990. Cellular DNA contents of fishes determined by flow cytometry. **La Kromosomo, Series II** 57: 1871–1888.
- Pinkel, D., Straume, T. and Gray, J. 1986. Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Nat Acad Scie United* **83**: 2934–2938.
- Plohl, M., Luchetti, A., Meštrović, N., Mantovani, B. 2008. Satellite DNAs between selfishness and functionality: structure, genomics and evolution of tandem repeats in centromeric (hetero) chromatin. **Gene** 409: 72-82. doi:10.1016/j.gene.2007.11.013
- Rishi, K.K. 1973. Somatic karyotypes of three teleosts. **Genen Phaenen** 16(3): 101–107.
- Rishi, K.K. 1981. Chromosomal studies on four cyprinid fishes. **International Journal of Academy of Ichthyology** 2: 1–4.
- Rishi, K.K. and Rishi, S. 1981. Giemsa banding in fish chromosomes. **Perspectives in Cytology and Genetics** 3: 103–106.
- Rishi, K.K., Sharma, M.P. and Mankotia, R. 1977. Somatic chromosomes of three Indian teleosts. **Matsya** 3: 6–9.
- Sahoo, P.K., Nanda, P. and Barat, A. 2007. Karyotypic analysis of *Neolissocheilus hexagonolepis* (McClelland), *Puntius ticto* (Ham.) and *P. chola* (Ham.) (family: Cyprinidae, Pisces). **Cytologia** 72: 409–413.
- Seetapan, K. 2007. Karyotypes of sex fish species of the family Cyprinidae. In: **Proceedings of the 45th Kasetsart University Annual Conference: Fisheries**. pp. 749–758. Kasetsart University, Bangkok. [in Thai]
- Sermwatanakul, A. 2005. **The Current State of Ornamental Fish Industry in Thailand. Extension Paper No. 2/2005**. Ornamental Fish and Aquarium Plants Research Center, Department of Fisheries. [in Thai]
- Sharma, O.P. and Agarwal, A. 1981. The somatic and meiotic chromosomes of *Puntius conchonius* (Cyprinidae) from the Jammu and Kashmir state, India. **Genetica** 56: 235–237.
- 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., New Narosa Publishing House, Delhi. pp. 109–122.

- Sharma, O.P., Sharma, K.K., Tripathi, N.K. and Gupta, S.C. 1995. Localization of C-heterochromatin in two cyprinid fishes *Puntius ticto* and *Schizothorax niger*. **Chromosome Information Service** 58: 19–20.
- Sobita, N., Bhagirath, T.H. and Dhananjay, C.H. 2004. Chromosome complements of a cyprinid fish *Puntius manipurensis*. **The Nucleus** 47: 59–63.
- Sofy, H.I., Layla, A.M. and Iman, M.K.A. 2008. Karyotypic diversity of some tilapia species. **Nature and Science** 6(1): 19-27.
- Sophawanus, M., Tanomthong, A. and Suphiwong, W. 2017. Standardized Karyotype and Idiogram of Sicklefins Barb (*Puntioplites falcifer*) in Thailand. **Koch Cha Sarn Journal of Science** 39 (2): 75–84
- Supiwong, W., Liehr, T., Cioffi, M.B., Chaveerach, A., Kosyakova, N., Pinthong, K., Tanee, T. and Tanomthong, A. 2013. Karyotype and cytogenetic mapping of 9 classes of repetitive DNAs in the genome of the naked catfish *Mystus bocourti* (Siluriformes, Bagridae). **Molecular Cytogenetics** 6(1): art. no. 51.
- Supiwong, W., Liehr, T., Cioffi, M. B., Chaveerach, A., Kosyakova, N., Fan, X., Tanee, T. and Tanomthong, A. 2014a. Comparative cytogenetic mapping of rRNA genes among naked catfishes: implications for genomic evolution in the Bagridae family. **Genetics and Molecular Research** 13 (4): 9533-9542.
- Supiwong, W., Liehr, T., Cioffi, M. B., Chaveerach, A., Kosyakova, N., Pinthong, K., Tanee, T. and Tanomthong, A. 2014b. Chromosomal evolution in naked catfishes (Bagridae, Siluriformes): A comparative chromosome mapping study. **Zoologischer Anzeiger-A Journal of Comparative Zoology** 253(4): 316-320.
- Supiwong, W., Tanomthong, A., Jumruthanasan, S., Khakhong, S., Leelarasamee, K. and Sanoamuang, L. 2012. A first karyotype analysis and chromosomal characteristic of nucleolar organizer regions (NORs) of common sheathfish, *Micronema apogon* (Siluriformes, Siluridae) in Thailand. **Cytologia** 77(1): 53-58.
- Tanomthong, A. 2011. **Cytogenetics**. Khon Kaen University press, Khon Kaen. [in Thai]
- Turpin, R. and Lejeune, J. 1965. Les Chromosomes humains. Gauthier-Villars, Paris.
- Vidthayanon, C. 2005. **Handbook of Freshwater Fish**. 2nd ed. Sarakadee Press, Bangkok, Thailand. [in Thai]

Table 1. Reviews of cytogenetic reports in the tribes Labeonini, Poropuntiini, and Smiliogastrini

Tribe/Genus/Species	2n	NF	Formula	NORs	Reference
Tribe Labeonini					
<i>Barbichthys laevis</i>	50	76	20m+6sm+4st+20a		Donsakul et al. (2006)
<i>Bangana devdevi</i>	50	86	20m+16sm+14a		Donsakul et al. (2011)
<i>Cirrhinus julleini</i>	50	90	26m+14sm+4st+6a		Magtoon and Arai (1993)
	50	92	36m+6sm+2st+6a		Donsakul (1997)
<i>Cirrhinus microlepis</i>	50	88	22m+8sm+8st+12a		Donsakul and Magtoon

				(1997)
	50	72	12m+10sm+2st+26a	Donsakul et al. (2007)
<i>Epalzeorhynchus frenatus</i>	48	72	14m+10sm+8st+16a	Donsakul and Magtoon (1993)
<i>Epalzeorhynchus bicolor</i>	50	74	20m+4sm+2st+24a	Donsakul and Magtoon (1993)
<i>Epalzeorhynchus munensis</i>	50	84	22m+12sm+2st+14a	Donsakul et al. (2012)
<i>Garra cambodgiensis</i>	50	82	20m+12sm+4st+14t	Donsakul et al. (2016)
<i>Garra fasciacauda</i>	50	84	18m+14sm+2st+16t	Donsakul et al. (2016)
<i>Garra notata</i>	50	80	20m+10sm+20t	Donsakul et al. (2016)
<i>Incisilabeo behri</i>	50	78	12m + 16sm + 4st + 18t	Donsakul and Magtoon (2003)
<i>Labeo chrysophekadian</i>	50	78	4m + 10sm + 14st + 22a	Seetapan (2007)
<i>Labiobarbus lineatus</i>	50	80	20m+10sm+20a	Magtoon and Arai (1990)
<i>Labiobarbus spiopleura</i>	50	90	34m+4sm+2st+10a	Donsakul and Magtoon (1997)
<i>Mekongina erythrospila</i>	50	74	10m+14sm+26a(t)	Donsakul and Magtoon (2003)
<i>Osteochilus melanopleura</i>	50	96	36m+10sm+2st+2a	Donsakul and Magtoon (1995)
<i>Osteochilus microcephalus</i>	50	86	26m + 10sm + 14st	Donsakul et al. (2001)
<i>Osteochilus vittatus</i>	50	96	16m+30sm+4st	Magtoon and Arai (1990)
	50	86	26m+10sm+14st	Donsakul (1997)
<i>Osteochilus waandersi</i>	50	92	18m+24sm+4st+4a	2 Magtoon and Arai (1993)
<i>Puntioplites falcifer</i>	50	80	14m+16sm+2st+18a	- Donsakul et al. (2007)
	50	92	16m+10sm+16a+8t	Sophawanus et al. (2017)
Tribe Smiliogastrini				
<i>Osteobrama alfrediana</i>	50	96	24m+22sm+4a	- Donsakul et al. (2011)
<i>Hampala dispar</i>	50	70	5m+5sm+3st+12a	- Donsakul and Poopitayasathaporn, (2002)
<i>H. macrolepidota</i>	50	72	10m+12sm+8st+20a	- Donsakul and Poopitayasathaporn (2002)
<i>Puntius arulius</i>	50	82	6m+26sm+18a	- Taki and Suzuki (1977)
	50	90	10m+18sm+12st+10t	Arunachalan and Murugan (2007)
<i>P. binotatus</i>	50	92	8m+34sm+8a	- Taki et al. (1977)
<i>P. brevis</i>	50	70	6m+14sm+8st+22a	- Khuda-Bukhsh (1975)
	50	54	2m+2sm+2st+22a	- Donsakul and Poopitayasathaporn, (2002)
	48	56	2m+6st+40a	- Seetapan (2007)
	50	62	4m+4sm+4a+38t	2 Nitikulworawong and Khruenat (2014)
<i>P. chola</i>	50	56	2m+4sm+44a	- Taki and Suzuki (1977)
<i>P. chola</i>	50	54	2m+2sm+4st+42a	- Tripathi and Sharma (1987)
	50	54	2m+2sm+46a	- Sahoo et al. (2007)
<i>P. conchoniis</i>	50	94	6m+38sm+6a	- Hinegardner and Rosen (1972),
				Taki and Suzuki (1977)
	48	78	10m+20sm+10st+8a	- Sharma and Agarwal (1981)
	50	-	-	- Vasiliev (1985)
	50	90	16m+24sm+2st+8a	- Khuda et al. (1986),
				Ojima and Yamamoto (1990)
	50	94	4m+40sm+6a	- Takai and Ojima (1988)

<i>P. cumingi</i>	50	94	18m+26sm+6a	-	Taki and Suzuki (1977)
<i>P. daruphani</i>	50	70	12m+8sm+6st+24a	-	Magtoon and Arai (1989)
<i>P. denisonii</i>	50	74	4m+20sm+18st+8a	8	Nagpure <i>et al.</i> (2004)
<i>P. everetti</i>	50	86	6m+30sm+14a	-	Hinegardner and Rosen (1972), Taki <i>et al.</i> (1977), Vinogradov (1998)
<i>P. fasciatus</i>	50	80	30m+4st+16a	-	Ohno <i>et al.</i> (1967)
<i>P. fasciatus</i>	50	82	6m+26sm+18a	-	Taki <i>et al.</i> (1977)
<i>P. filamentosus</i>	50	84	8m+26sm+16a	-	Taki and Suzuki (1977)
	50	78	12m+16sm+12st+10a	8	Nagpure <i>et al.</i> (2003)
<i>P. lateristriga</i>	50	88	6m+32sm+12a	-	Taki <i>et al.</i> (1977)
	50	86	22m+14sm+6st+8a	-	Sobita <i>et al.</i> (2004)
<i>P. melanampyx</i>	50	74	12m+12sm+14st+12a	-	Khuda <i>et al.</i> (1986)
<i>P. nigrofasciatus</i>	50	100	16m+34sm	-	Taki and Suzuki (1977)
<i>P. oligolepis</i>	50	88	8m+30sm+12a	-	Taki <i>et al.</i> (1977)
<i>P. orphoides</i>	50	80	14m+16sm+4st+16a	-	Arai and Magtoon (1991)
	50	92	6m+36sm+8a	-	Taki <i>et al.</i> (1977)
<i>P. partipentazona</i>	50	90	6m+34sm+10a	-	Taki <i>et al.</i> (1977)
<i>P. pentazona</i>	50	98	22m+26sm+2a	-	Taki <i>et al.</i> (1977)
<i>P. sarana</i>	50	76	12m+14sm+12st+12a	-	Rishi (1981)
<i>P. sarana subnasutus</i>	50	88	12m+26sm+8st+4a	-	Nagpure <i>et al.</i> (2004)
<i>P. semifasciolatus</i>	50	76	12m+14sm+14st+10a	-	Gui <i>et al.</i> (1986), Yu <i>et al.</i> (1989)
	50	76	12m+14sm+14st+10a	8	Nagpure <i>et al.</i> (2004)
	50	76	8m+18sm+24a	-	Suzuki (1991)
<i>P. sophore</i>	48	52	2m+2sm+44a	-	Rishi (1973)
	48	54	2m+4sm+42a	-	Rishi <i>et al.</i> (1977)
	48	52	4m+2st+42a	-	Rishi and Rishi (1981)
<i>P. sophore</i>	50	56	2m+4sm+44a	-	Khuda <i>et al.</i> (1986)
	48	52	4m+6st+38a	-	Tripathi and Sharma (1987)
<i>P. sophoroides</i>	50	54	2m+2sm+46a	-	Magtoon and Arai (1989)
<i>P. stoliczkanus</i>	50	94	22m+22sm+4st+2a	-	Magtoon and Arai (1989)
<i>P. tambraparniei</i>	50	94	12m+16sm+16a+6t	-	Arunachalan and Murugan (2007)
<i>P. tetrazona</i>	50	84	34m+6st+10a	-	Ohno <i>et al.</i> (1967)
	50	84	6m+28sm+16a	-	Hinegardner and Rosen (1972), Taki <i>et al.</i> (1977), Suzuki <i>et al.</i> (1995)
	50	-	-	-	Krishnaja and Rege (1980) Vinogradov (1998)
<i>P. tetrazona partipentazona</i>	50	90	6m+34sm+10a	-	Taki <i>et al.</i> (1977)
<i>P. ticto</i>	50	82	20m+12sm+10st+8a	-	Sharma <i>et al.</i> (1995), Vinogradov (1998)
	50	100	28m+22sm	-	Taki and Suzuki (1977)
	50	94	28m+16sm+6st	-	Sahoo <i>et al.</i> (2007)
<i>P. titteya</i>	50	98	20m+28sm+2a	-	Hinegardner and Rosen (1972), Taki and Suzuki (1977)
	48	52	4m+2sm+42a	-	Khuda-Bukhsh and Barat (1987)
<i>Systemus sp.1</i>	50	82	12m+20sm+6st+12a	-	Donsakul <i>et al.</i> (2006)
<i>S. binotatus</i>	50	88	24m+14sm+12a	-	Donsakul and Magtoon (2002)
<i>S. orphoides</i>	50	82	12m+20sm+4st+14a	-	Piyapong (1999)

	50	74	8m+16sm+10st+16a	-	Donsakul and Poopitayasathaporn (2002)
<i>S. stoliczkanus</i>	50	94	24m+20sm+6a	-	Donsakul <i>et al.</i> (2011)
Tribe Poropuntiini					
<i>Amblyrhynchichthys truncatus</i>	50	78	16m+12sm+22a	-	Donsakul <i>et al.</i> (2006)
<i>Balantiocheilos melanopterus</i>	50	72	10m+12sm+28a	-	Ojima and Yamamoto (1990)
	50	70	14m+6sm+10st+20a	-	Donsakul and Poopitayasathaporn (2002)
<i>Barbonymus gonionotus</i>	50	72	2m+20sm+4st+24a	-	Magtoon and Arai (1989)
	50	74	16m+8sm+26a	-	Donsakul and Magtoon (1997)
	50	72	6m+16sm+6st+22a	-	Piyapong (1999)
	50	66	2m+4sm+10st+34a	-	Seetapan (2007)
	50	74	6m+18sm+16st+10a	2	Khuda-Bukhsh and Das (2007)
<i>Cosmochilus harmandi</i>	50	82	22m+10sm+10st+8a	-	Donsakul <i>et al.</i> (2005)
<i>Cyclocheilichthys apogon</i>	50	70	12m+8sm+6st+24a	-	Magtoon and Arai (1989)
	50	76	18m+8sm+4st+20a	-	Donsakul and Poopitayasathaporn (2002)
<i>C. apogon</i>	50	86	10m+16sm+10a+14t	6	Chantapan (2015)
<i>C. lagleri</i>	50	86	12m+6sm+1st+6a	-	Donsakul <i>et al.</i> (2006)
<i>C. repasson</i>	50	78	12m+16sm+6st+16a	-	Donsakul <i>et al.</i> (2005)
	50	84	6m+6sm+22st+16a	-	Seetapan (2007)
<i>Cyclocheilos enoplos</i>	50	90	10m+30sm+4st+6a	4	Magtoon and Arai (1993)
	50	72	14m+8sm+10st+18a	-	Donsakul and Magtoon (1995a)
	50	78	16m+12sm+6st+16a	-	Donsakul and Poopitayasathaporn (2002)
<i>Hypsibarbus lagleri</i>	50	74	4m+20sm+26a	-	Donsakul and Magtoon (2001)
<i>H. malcolmi</i>	50	64	10m+4sm+36a	-	Donsakul <i>et al.</i> (2007)
<i>H. vernayi</i>	50	58	6m+2sm+4st+38a	-	Donsakul and Magtoon (2002)
<i>H. wetmorei</i>	50	70	12m+8sm+6st+24a	-	Magtoon and Arai (1989)
	50	74	12m+12sm+4st+22a	2	Piyapong (1999)
	50	74	12m+12sm+2st+24a	-	Donsakul and Magtoon (2002)
<i>H. wetmorei</i>	50	82	10m+14sm+8a+18t	6	Chantapan (2015)
<i>Mystacoleucus argenteus</i>	50	76	6m+20sm+2st+22a	-	Donsakul <i>et al.</i> (2006)
<i>M. marginatus</i>	50	76	16m+10sm+24a	-	Arai and Magtoon (1991)
	50	68	14m+4sm+2st+30a	-	Donsakul and Poopitayasathaporn (2002)
<i>Poropuntius deauratus</i>	50	74	14m+10sm+26t	-	Donsakul <i>et al.</i> (2005)
<i>P. sinensis</i>	50	82	10m+22sm+18st	-	Zen <i>et al.</i> (1984)
<i>P. laoensis</i>	50	74	14m+10sm+10st+16a	-	Donsakul and Magtoon (2008)
<i>P. normani</i>	50	72	10m+12sm+28a	-	Donsakul <i>et al.</i> (2007)
<i>P. chonglingchungi</i>	50	80	12m+18sm+20st	-	Zen <i>et al.</i> (1986)
<i>Scaphognathops bandanensis</i>	50	64	10m+6sm+34a	-	Donsakul <i>et al.</i> (2007)

Sikukia gudgeri 50 68 10m+8sm+4st+28a - Donsakul *et al.* (2005)

Remarks: $2n$ = diploid number, m = metacentric, sm = submetacentric, st = subtelocentric, a = acrocentric and NORs = nucleolar organizer regions, NF = fundamental number, - = not available

Table 2 Cytogenetic and FISH studies on three Cypinid fishes in Thailand

Species	$2n$	NF	Chromosome type				Ag-NOR pair (type)	CA ₁₅ pair	CGG ₁₀ pair
			m	sm	a	t			
<i>Epalzeorhynchus frenatum</i>	50	84	18	10	10	12	10(sm)	1-13,15-25	1-6,9-12,14-25
<i>Puntigrus partipentazona</i>	50	94	6	24	14	6	1(m)	1-16, 18-21, 23-25	1
<i>Scaphognathops bandanensis</i>	50	66	4	12	-	34	9(t)	1-25	1, 3-5,9-11, 13, 15-16, 19-21

Remarks : $2n$ = diploid chromosome number, NF =fundamental number)number of chromosome arm(, m =metacentric, sm =submetacentric, a =acrocentric, t =telocentric chromosome, NOR =nucleolar organizer region

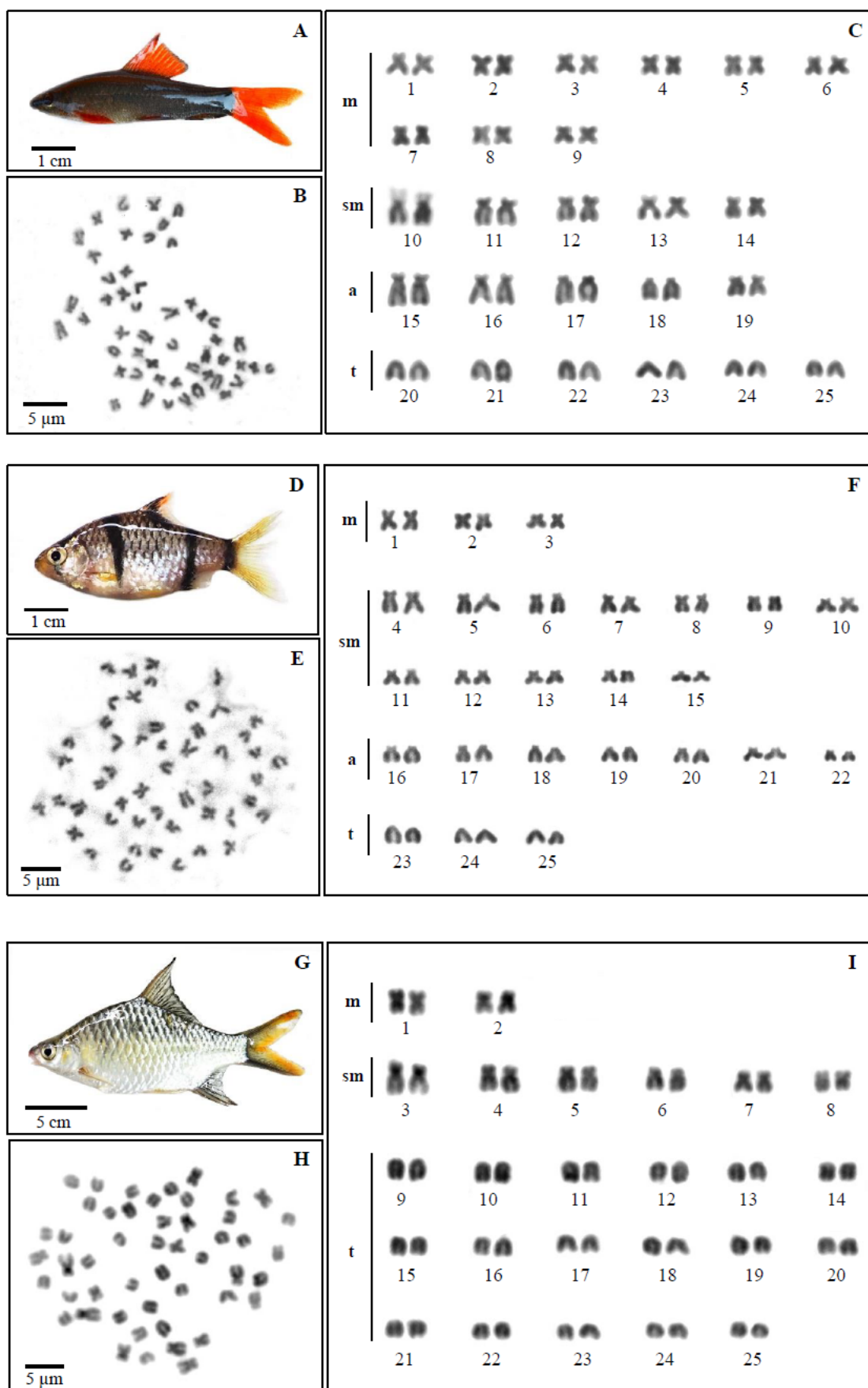


Fig. 1 Specimens, metaphase chromosome plates and karyotypes of *Epalzeorhynchus frenatum* (A-C), *Puntigrus partipentazona* (D-F), *Scaphognathops bandanensis* (G-I) by conventional technique.

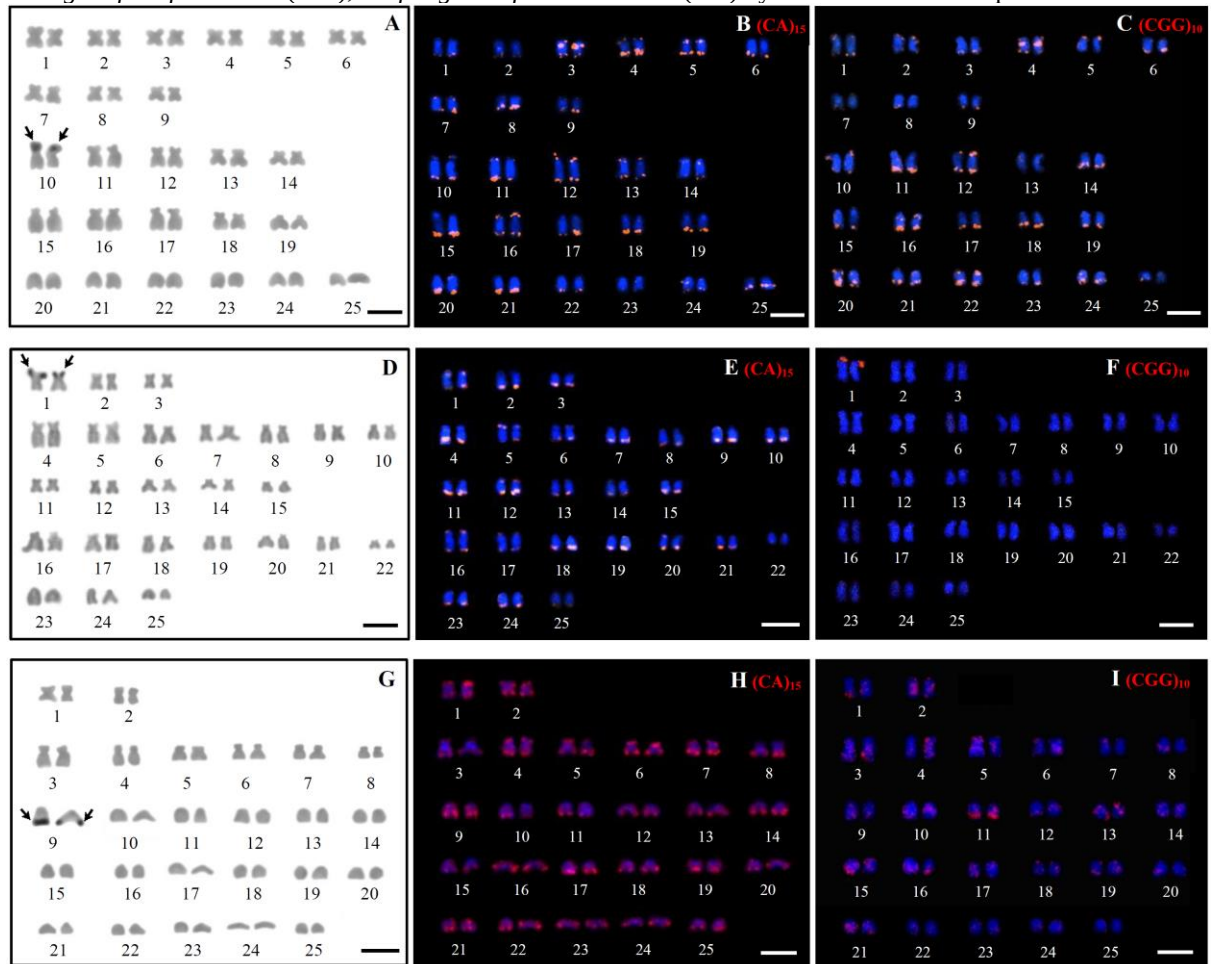


Fig. 2 Karyotypes of *Epalzeorhynchus frenatum* (A-C), *Puntigrus partipentazona* (D-F), *Scaphognathops bandanensis* (G-I) by NOR banding and FISH techniques. Arrows indicate NOR-bearing chromosomes. scale bars=5 μ m.

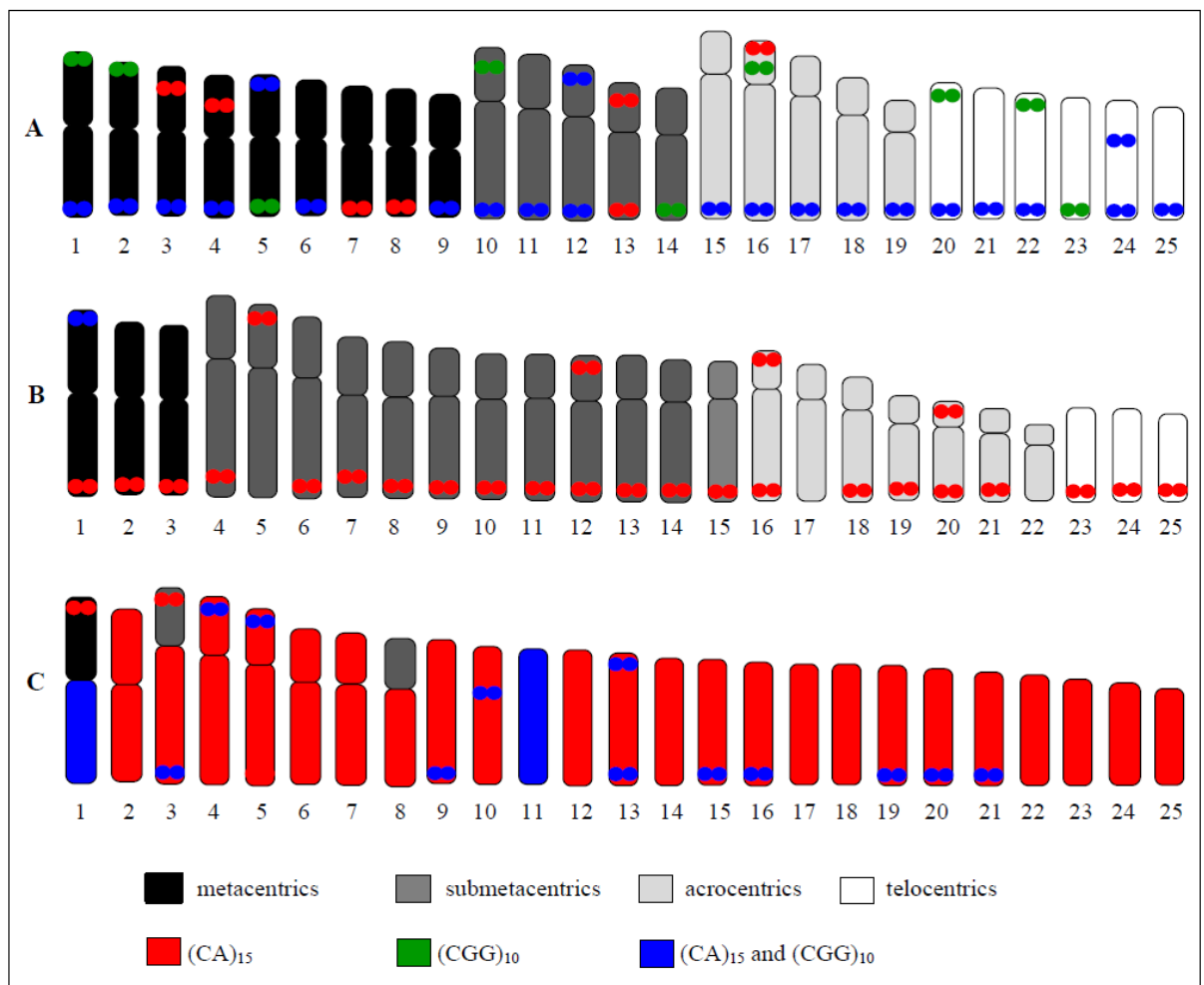


Fig. 3 Idiograms represent the (CA)₁₅ and (CGG)₁₀ mapping on the chromosomes of *Epalzeorhynchus frenatum* (A), *Puntigrus partipentazona* (B), *Scaphognathops bandanensis* (C).

NATIONAL GENETICS CONFERENCE



สมาคมพันธุศาสตร์แห่งประเทศไทย
Genetics Society of Thailand

การประชุมวิชาการพันธุศาสตร์แห่งชาติ ครั้งที่ 21

20-22 JUNE 2019

THE ZIGN HOTEL

PATTAYA, CHON BURI, THAILAND



Proceedings

GENETICS
for Sustainable Development

“พันธุศาสตร์เพื่อการพัฒนาอย่างยั่งยืน”





การประชุมวิชาการพันธุศาสตร์แห่งชาติ ครั้งที่ 21

21st NATIONAL GENETICS CONFERENCE

พันธุศาสตร์เพื่อการพัฒนาอย่างยั่งยืน

20-22 มิถุนายน 2562 The Zign Hotel เมืองพัทยา จังหวัดชลบุรี



สมาคมพันธุศาสตร์แห่งประเทศไทย
Genetics Society of Thailand

กำหนดการ

วันพฤหัสบดีที่ 20 มิถุนายน 2562

เวลา	ห้อง Fidella Grand Ballroom		
08.00 – 08.50	ลงทะเบียน		
08.50 – 09.00	พิธีทักทายและเปิดงาน		
09.00 – 09.15	กล่าวต้อนรับโดย อธิการบดีมหาวิทยาลัยบูรพา		
	กล่าวรายงานโดยนายกสมาคมฯ (ศ.ดร.เพทาย เย็นจิตโสมนัส)		
	พิธีเปิดโดย นายอำพล เสนาณรงค์ องคมนตรี ในรัชกาลที่ 9		
09.15 – 09.45	พิธีมอบโล่เกียรติยศและอ่านประวัติผู้ทำคุณประโยชน์แก่การวิชาการด้านพันธุศาสตร์ 3 ท่าน		
09.45 – 10.05	ปาฐกถาเกียรติยศโดย ดร.พรชัย จุฑามาศ		
10.05 – 10.25	ปาฐกถาเกียรติยศโดย ศ.นพ.ยง ภู่วรรณ		
10.25 – 10.45	ปาฐกถาเกียรติยศโดย ศ.ดร.โสพิศ วงศ์คำ		
10.45 – 11.00	พักรับประทานอาหารว่าง		
11.00 – 12.00	Keynote Lecture I: พญ. คุณหญิง พรทิพย์ โรจนสุนันท์		
12.00 – 12.40	Keynote Lecture II: รศ.ดร.อรินทิพย์ ธรรมชัยพนิต		
12.40 – 13.40	พักรับประทานอาหารกลางวัน (ห้อง DISSIN)		
	BREAKOUT SESSIONS		
	ห้อง Fidella Grand Ballroom (Human & Medical Genetics)	ห้อง Fauna Ballroom (Agricultural & Applied Genetics)	ห้อง Fineen Ballroom (Omics & Others)
13.40 – 14.00	รศ.ดร.บุษบา ฤกษ์อำนวยโชค	รศ.ดร.กิตติพัฒน์ อุโฆษกิจ	ผศ.ดร.ศรศร ศรีกุลนาถ
14.00 – 14.20	รศ.ดร.ปิติ จันทรรักษ์	รศ.ดร.ชัชวาล จันทราสุริยารัตน์	ดร.ศักดิ์ดา คุ่มหรั่ง
14.20 – 14.50	Dr. Heidi Cheng illumina®	Dr. Shun Ming Yuen SOPHIA GENETICS AS	Dr. Lee Chee Yang Agilent Technologies & Genomax Technologies Co., Ltd.
14.50 – 15.50	การนำเสนอแบบโปสเตอร์	การนำเสนอแบบโปสเตอร์	การนำเสนอแบบโปสเตอร์
15.50 – 16.20	พักรับประทานอาหารว่าง		
16.20 – 16.40	ผศ.ดร.นพ.เฉลิมชัย มิตรพันธ์	Prof. Nobuko Ohmido	ผศ.ดร.วโรดม เจริญสุวรรณ
16.40 – 17.00	รศ.ดร.จตุรงค์ พุทธิพรทิพย์	สพญ.ดร.อัมพิกา ทองภักดี	ดร.ศศิธร โชติวัฒน์มนตรี
17.00 – 17.15	นางสาวศิริินดา สุทธิจิต	ผศ.ดร.วีระยุทธ สุภังค์	นางสาวรัฐธนา ธนะสมบุรณ์
17.15 – 17.30	นายวรรัตน์ แซ่มพัฒนาชัย	นายทวีศักดิ์ วงษา	นางสาวพรทิพย์ เขียวชาญเกษตร
17.30 – 17.35	ผู้สนับสนุนแจกของรางวัล	ผู้สนับสนุนแจกของรางวัล	ผู้สนับสนุนแจกของรางวัล
17.30 – 18.45	ประชุมใหญ่สามัญประจำปี 2562 ของสมาคมพันธุศาสตร์แห่งประเทศไทย (ห้อง Flavio)		
18.45 – 21.45	งานเลี้ยงรับรอง (ห้อง DIGI @ Tsix5 Hotel)		



B: ห้อง Fauna Ballroom

(Agricultural & Applied Genetics)

วันพฤหัสบดีที่ 20 มิถุนายน 2562

13.40 – 14.50 บรรยายโดยวิทยากรรับเชิญ และการนำเสนอผลงานวิจัย

ประธาน: รศ.ดร.ธีระชัย ธนวัฒน์ (มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์)

ประธานร่วม: ดร.พัชรินทร์ อมรรัตนพันธ์ (มหาวิทยาลัยบูรพา)

13.40 – 14.00 บรรยายรับเชิญเรื่อง “ความก้าวหน้าการปรับปรุงพันธุ์พืชระดับโมเลกุลในพืชเศรษฐกิจของประเทศไทย”

รศ.ดร.กิตติพัฒน์ อุโฆษกิจ (มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์)

14.00 – 14.20 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อราโรคราไหมในประเทศไทยและวิวัฒนาการร่วมระดับโมเลกุลระหว่างข้าวกับเชื้อราโรคราไหม

รศ.ดร.ชัชวาล จันทราสุริยรัตน์ (มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์)

14.20 – 14.50 บรรยายรับเชิญเรื่อง “SOPHiA Clinical Exome Solution: Big Panel to Answer Big Questions”

Dr. Shun Ming Yuen (SOPHiA GENETICS AS)

14.50 – 15.50 การนำเสนอผลงานแบบโปสเตอร์

ห้อง A: Fidella Grand Ballroom โปสเตอร์รหัส A1-A36

ห้อง B: Fauna Ballroom โปสเตอร์รหัส B1-B31

ห้อง C: Fineen Ballroom โปสเตอร์รหัส C1-C16

15.50 – 16.20 พักรับประทานอาหารว่าง

16.20 - 17.30 บรรยายโดยวิทยากรรับเชิญและการนำเสนอผลงานวิจัยแบบบรรยาย

ประธาน: รศ.ดร.กิตติพัฒน์ อุโฆษกิจ (มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์)

ประธานร่วม: นพ.วีระยุทธ ประพันธ์พจน์ (บริษัท ศูนย์พันธุศาสตร์การแพทย์ จำกัด)

16.20 – 16.40 บรรยายรับเชิญเรื่อง “Insights of cytogenetics research for rice genetics and breeding”

Prof. Nobuko Ohmido (Kobe University, Japan)

16.40 – 17.00 บรรยายรับเชิญเรื่อง “การเก็บรักษาพันธุกรรมเพื่อการอนุรักษ์สัตว์ป่าอย่างยั่งยืน”

สพญ.ดร.อัมพิกา ทองภักดี (สำนักอนุรักษ์และวิจัย องค์การสวนสัตว์แห่งประเทศไทย)

17.00 – 17.15 บรรยายรับเชิญเรื่อง “พันธุศาสตร์ระดับเซลล์เปรียบเทียบระหว่างปลาแรดแม่น้ำโขงและปลาแรดธรรมดา ด้วยเทคนิคพื้นฐานและโมเลกุล”

ผศ.ดร.วีระยุทธ สุภวิทย์ (มหาวิทยาลัยขอนแก่น)

17.15 – 17.30 การศึกษาการกระจายตัวและการแสดงออกในหลอดทดลองของ virulence genes ที่เกี่ยวข้องกับความเสี่ยงในการก่อโรคของเชื้อ *Streptococcus suis* ซีโรไทป์ 2 ที่แยกได้จากผู้ป่วยในเขตภาคเหนือของประเทศไทย

นายทวีศักดิ์ วงษา (มหาวิทยาลัยเชียงใหม่)

17.30 – 18.45 ประชุมใหญ่สามัญประจำปี 2562 ของสมาคมพันธุศาสตร์แห่งประเทศไทย (ห้อง Flavio)

18.45 – 21.45 งานเลี้ยงรับรอง (DIGI room @Tsix5 Hotel)



พันธุศาสตร์ระดับเซลล์เปรียบเทียบระหว่างปลาแรดแม่น้ำโขงและปลาแรดธรรมดา
ด้วยเทคนิคพื้นฐานและโมเลกุล
Comparative Cytogenetics between *Osphronemus exodon* and *O. goramy*
by Classical and Molecular Methods

วีระยุทธ สุภิวงศ์^{1*} และอลองกลอด แทนอมทอง²
Weerayuth Supiwong^{1*} and Alongklod Tanomtong²

¹คณะวิทยาศาสตร์ประยุกต์และวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น วิทยาเขตหนองคาย หนองคาย 43000

²กลุ่มวิจัยพิษวิทยาปศุสัตว์และสัตว์น้ำ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ขอนแก่น 40002

¹Faculty of Applied Science and Engineering, Khon Kaen University, Nong Khai Campus, Nong Khai 43000

²Toxic Substances in Livestock and Aquatic Animals Research Group, Department of Biology, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002

*Corresponding author: weersu@kku.ac.th

บทคัดย่อ

การศึกษาพันธุศาสตร์ระดับเซลล์เปรียบเทียบของปลาแรดแม่น้ำโขงและปลาแรดธรรมดาจากกลุ่มน้ำโขงในประเทศไทย เตรียมโครโมโซมโดยวิธีทางตรงจากไต ย้อมสีโครโมโซมแบบธรรมดา แลกสีย้อมเอ็นโออาร์ และเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์ อิน ซิทู ไฮบริไดเซชัน ใช้โพรบไมโครแซเทลไลต์ d(CA)₁₅, d(GC)₁₅ และ d(CAT)₁₀ พบว่าปลาทั้งสองชนิดมีโครโมโซมดิพลอยด์ (2n=48) และโครโมโซมพื้นฐาน (NF=48) ที่เท่ากัน แคริโอไทป์เป็นโครโมโซมชนิดเทโลเซนทริกทั้งหมด ประกอบด้วยโครโมโซมขนาดใหญ่และขนาดกลางเท่ากับ 18-30 และ 20-28 ตามลำดับ โครโมโซมเครื่องหมายที่มีตำแหน่งนิวคลีโอลาร์ ออร์แกไนเซอร์ รีเจียน อยู่ตำแหน่งใกล้กับเซนโทรเมียร์บนโครโมโซมคู่ที่ 15 และ 22 ตามลำดับ พบการกระจายตัวของไมโครแซเทลไลต์บนโครโมโซมมีความแตกต่างกัน ในปลาแรดแม่น้ำโขงมีการกระจายทั่วไปในทุกแห่งของโครโมโซม และมีการสะสมอย่างมากตรงตำแหน่งเซนโทรเมียร์ กลางแท่ง และเทโลเมียร์ของโครโมโซมหลาย ๆ คู่ สำหรับในปลาแรดธรรมดามีการกระจายทั่วไปบางตำแหน่ง จากผลการศึกษาพบว่าข้อมูลพันธุศาสตร์ระดับเซลล์สามารถใช้ประกอบในการจำแนกชนิดปลาที่มีความใกล้เคียงกันได้

คำสำคัญ: ปลาแรดแม่น้ำโขง ปลาแรด โครโมโซม พันธุศาสตร์ระดับเซลล์ ฟลูออเรสเซนซ์ อิน ซิทู ไฮบริไดเซชัน

ABSTRACT

Comparative cytogenetic study on *Osphronemus exodon* and *O. goramy* from the Mekong Basin in Thailand, was carried out. Chromosomes were directly prepared from kidney proceed to conventional staining, NOR banding and Fluorescence *in situ* hybridization techniques using d(CA)₁₅, d(GC)₁₅ and d(CAT)₁₀ microsatellite probes. The results showed that both species had the same diploid number (2n=48) and the fundamental number (NF=48). Karyotypes composing of all telocentric chromosomes were divided into large and medium sizes as 18-30 and 20-28 in *O. exodon* and *O. goramy*, respectively. The marker chromosomes which have the Nucleolar Organizer Regions (NORs) can be observed at the regions adjacent to the centromeres of pairs 15 and 22, respectively. Different patterns of three microsatellites distributions on the chromosomes between two studied species were revealed that they are distributed throughout in all chromosomes with highly accumulated at centromeric, interstitial and telomeric positions in several pairs of *O. exodon* while in *O. goramy*, those display at some areas of some chromosomes. This result indicated that cytogenetic data can be used for classification in related fish species.

Keywords: *Osphronemus exodon*, *Osphronemus goramy*, Chromosome, Cytogenetics, Fluorescence *in situ* hybridization

INTRODUCTION

Gouramis or gouramies are a group of freshwater perciform fishes that comprise the family, Osphronemidae. The fish are native to Asia, from Pakistan and India to the Malay Archipelago and north-easterly towards Korea (Nelson, 2006). These fishes are of great importance as food fish. While, some species are kept as aquarium fishes, several ones have recently become a booming in aquaculture (Vidthayanon, 2005; Sanjundaeng, 2014). Two importance species in this family are elephant ear gourami, *Osphronemus exodon* and giant gourami, *O. goramy*. The elephant ear gourami, (*Osphronemus exodon*) is a species of gourami native to the Mekong in Thailand, Laos, and Cambodia while the giant gourami has wider native ranges, not only in the Mekong Basin, but it also found in other regions of Southeast Asia (Roberts, 1992). The species of the genus *Osphronemus*, juveniles and adults of this species have physical differences. Juveniles have 6 or 7 vertical stripes and a spot on the back, which fades as they get older (Figs. 1A, 1D). When a juvenile grows up to about around 10 centimetres (3.9 in), a red orange stripe appears around the bottom of the head. Adults are pale on its fins and blackish on its body (Rainboth, 1996). Thus, both species have quite similar in morphology in the juvenile. In many cases have the problem for identification of species. Elephant ear gourami is listed as vulnerable by the IUCN (Jenkins et al., 2009). In Asian cuisine, giant gourami is highly valued as food due to its thick flesh, pleasant texture as well as its tasty flavor. It is a popular food fish in Indonesian, Malaysian and Thai cuisines (Goldstein, 2005). From the mentions above, they play as economically important species in Thailand. However, there are few reports on basic knowledge especially cytogenetics in these species.

Cytogenetics is the study of chromosome including morphology structure and number that can be used as an essential tool for genetic material of cell transmission from one generation to the next (Rooney, 2001). The karyotype is the chromosome complement of an individual or related group of individuals, as defined by chromosome size, morphology and number. Though for all somatic cells of all individuals of species, the number of chromosomes is used as an indicator of classification of species and interrelationships within families (Campiranont, 2003; Tanomtong, 2011). The studies of the karyotypes help to investigate the aquatic structure of the species population in each habitat, so it can determine what species are related to each other in an accurate manner. This may help to facilitate the hybridization between them in the future for strain improvement (Sofy et al., 2008), breeding practices of organisms by using chromosome set management (Na-Nakhon et al., 1980). There were quite scarce of Cytogenetic studies in this family. There is only one report that studied on *O. exodon* and *O. goramy* using conventional staining technique by Donsakul et al. (2006). They found that both species had the diploid chromosome number of 48 composing of 24 pairs of telocentric chromosomes and arm numbers of 48.

For some species, the simple characterization of the karyotype may be sufficient to identify intra- and inter-specific variants. However, in most cases, just the karyotype description appears to be inconclusive when not coupled with other methods capable of generating more accurate chromosomal markers. In this sense, the use of molecular cytogenetic analyses has played an important role in the precise characterization of the structure of genomes (Cioffi and Bertollo, 2012). Recently, the molecular cytogenetic studies using fluorescence *in situ* hybridization (FISH) for

mapping repetitive DNA sequences have provided important contributions to the characterization of the biodiversity and the evolution of divergent fish groups (Cioffi and Bertollo, 2012).

The present study was aimed to compare on the cytogenetic data between *O. exodon* and *O. goramy* using conventional staining, Ag-NOR banding and Fluorescent *in situ* hybridization (FISH) techniques. The knowledge revealed will provide a powerful tool for the next generation of genome research in Thai gouramis and discovering biodiversity, with useful applications in fish breeding for conservation and commercials, evolution, systematics, phylogenetics, fish fauna management and suitable conservation of river basin.

MATERIALS AND METHODS

Sampling of *Osphronemus exodon* and *O. goramy* specimens

Ten males and 10 females of each species were collected in the Mekong Basin, of Nong Khai and Buangkan Provinces, Northeast Thailand. The fishes were taken to laboratory aquaria and were kept under the standard conditions for seven days before studies.

Classical cytogenetic technique

Chromosome preparation was directly performed from kidney tissues following by the methods of Supiwong et al. (2009) and Tanomtong (2011). Chromosomes were conventional stained by 20% Geimsa's solution for 30 minutes (Rooney, 2001) and Ag-NOR banding was applied to stain the chromosomes by 2% gelatin and 50% AgNO₃ solutions at 60 °C for five minutes (Howell and Black, 1980). The metaphase figures were analyzed according to the chromosome classification after Chaiyasut (1989). The centromeric index (CI) between 0.50-0.59, 0.60-0.69, 0.70-0.89, and 0.90-1.00 are described as metacentric, submetacentric, acrocentric, and telocentric chromosomes, respectively. Fundamental number, NF (number of chromosome arm), is obtained by assigning a value of two for metacentric, submetacentric and acrocentric chromosomes and one for telocentric chromosomes (Tanomtong, 2011).

Fluorescent *in situ* hybridization technique

Three microsatellites d(CA)₁₅, d(GC)₁₅ and d(CAT)₁₀ were used as probes described by Kubat et al. (2008) followed here with slight modifications. These sequences were directly labeled with Cy₃ at 5' terminal during synthesis by Sigma (St. Louis, MO, USA). FISH technique was performed under high stringency conditions on mitotic chromosome spreads (Pinkel et al. 1986). After denaturation of chromosomal DNA in 70% formamide at 70 °C for 4 min. The hybridization mixture (2 µL of probes and 8 µL of dextran sulphate) was dropped on the slides, and the hybridization was performed overnight at 37 °C in a moist chamber. The post hybridization wash was carried out with 2 X SSC for 5 min at room temperature for twice times. Finally, the slides were counterstained with DAPI and mounted in an antifade solution (Vectashield from Vector laboratories) (Lehr, 2009) and analyzed in an epifluorescence microscope Olympus BX50 (Olympus Corporation, Ishikawa, Japan).

RESULTS AND DISCUSSION

Classical cytogenetics

The results showed that *O. exodon* and *O. goramy* have the same of the diploid chromosome number and the fundamental number as 2n=48, NF=48 (Fig. 1B, E). They are agreement with the

report of Donsakul et al. (2006) and Koref-Santibanez et al. (1991). In addition, Donsakul et al. (2006) also reported the diploid chromosome number and the fundamental number in *O. laticlavus* that the same $2n$ as 48 chromosomes but the difference in the NF as 50 were found. Three from four species of the Osphroneminae subfamily have been cytogenetically studied so far. From the previous and present reports, they indicate that the diploid chromosome number in this subfamily is conserved. Moreover, to compare with others in distinct subfamily, the same diploid chromosome as 48 revealed in *T. fasciata* (Manna and Prasad, 1977; Koref-Santibanez and Paepke, 1994; Rishi et al., 1994; Sobita and Bhagirath, 2007; Kushwaha et al., 2008), *Trichogaster labiosa* (Manna and Prasad, 1977; Koref-Santibanez and Paepke, 1994), *T. sumatranus* (Calton and Denton, 1974), *Trichopodus microlepis* (Ojima and Yamamoto, 1990) and *Macropodus chinensis* (Lee et al., 1983). Arai (20011) reviewed the chromosomes in fishes showing that the diploid chromosome numbers in the Osphronemidae family vary from 16 to 48 chromosomes and the NFs vary between 16 and 86. The most frequency of $2n$ as 46 chromosomes (66.67%). The chromosomal evolution in fishes is related with the fusion to reduce the $2n$ and/or pericentric inversions to change the NF. The karyotypes of *O. exodon* and *O. goramy* composed of 48 telocentric chromosomes but there is difference in chromosome size as 18 large+ 30 medium and 20 large+28 medium sizes, respectively. The types of chromosomes in both species studied are the same as reported by Donsakul et al. (2006). However, there is different from *O. laticlavus* that two submetacentric and 46 telocentric (acrocentric) chromosomes were found (Donsakul et al., 2006).

The determination of nucleolar organizer regions (NORs) for this species was firstly proposed. If these loci are active during the interphase before to mitosis, they can be detected by silver nitrate staining (Howell and Black 1980) since they specifically stain a set of acidic proteins related to ribosomal synthesis process. The regions adjacent to the centromere of the long arms of the telocentric chromosome pairs 15 and 22 exhibited active Ag-NOR meshes in *O. exodon* and *O. goramy*, respectively (Figs. 1C and 1F). The single NOR-bearing chromosome pair in the present result is consistency to *Trichopodus trichopterus* (Supiwong et al., 2010) and *Trichogaster fasciata* (Kushwaha et al., 2008). This character is common characteristic found in many fish groups as well as vertebrates (Supiwong et al., 2012, 2013). However, Sobita and Bhagirath (2007) reported that number of NORs in *Trichogaster fasciata* displayed three chromosome pairs. NOR is frequently used to compare variations, as well as to identify and explain specifications. Changes in chromosome number and structure can alter the number, and structure of NOR. Structure, number, and morphology of a NOR may be specific to populations, species, and subspecies. Robertsonian translocations (centric fusion) may cause losses of NOR. Species, which have limited gene exchange due to geographical isolation, have elevated karyotype numbers and NOR variation. The use of NORs in explaining kinships depends on a large extent on the uniformity of this characteristic and on the degree of variety within a taxon (Yüksel and Gaffaroğlu, 2008).

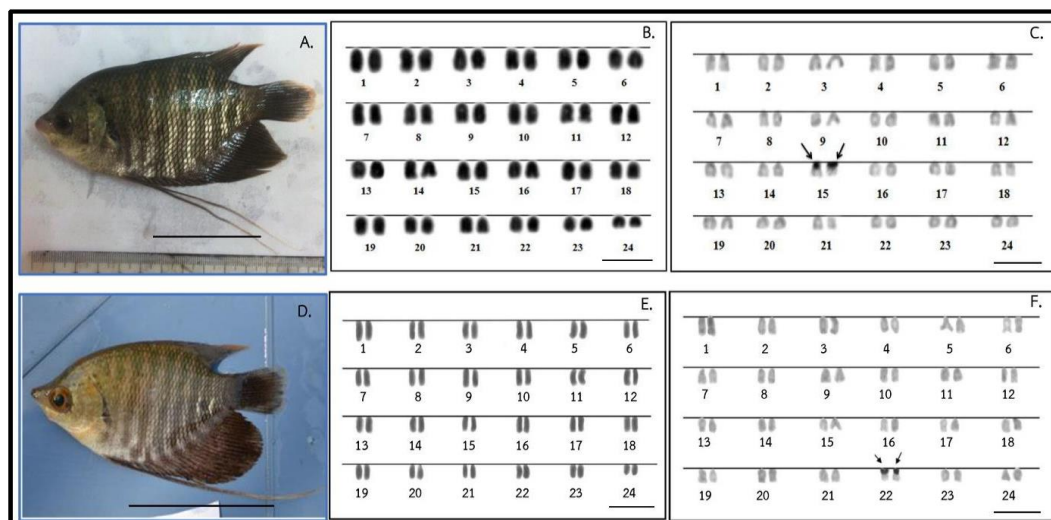


Figure 1 Morphologies and karyotypes from conventional staining and Ag-NOR banding techniques of *Osphronemus exodon* (A-C) and *O. goramy* (D-F). Arrows indicate Nucleolar Organizer Regions (NORs). Scale bars in fish figs. indicate 5 cm and ones in karyotypes indicate 5 μ m.

Patterns of microsatellite distribution on the chromosomes

Microsatellite d(CA)₁₅, d(GC)₁₅ and d(CAT)₁₀ sequences were detected disperse hybridization signals throughout all chromosomes with high accumulation of them at telomeric, centromeric and interstitial regions of several chromosomes in *O. exodon*. In the other hand, in *O. goramy*, microsatellite d(CA)₁₅ and d(GC)₁₅ repeats were observed throughout chromosomes in some pairs with highly accumulated at centromeric, interstitial and telomeric positions in some chromosomes while microsatellite d(CAT)₁₀ sequences are distributed in all chromosomes (Figure 2). To compare between two gouramis, the patterns of microsatellites distribution on the chromosomes are quite specific to species. The patterns of microsatellites d(CA)₁₅ in *O. exodon* and *O. goramy* in the present study are different from similar to the nine species of the Bagridae family including *Hemibagrus filamentus*, *H. spilopterus*, *H. wyckii*, *H. wyckioides*, *Mystus atrifasciatus*, *M. multiradiatus*, *M. mysticetus*, *M. bocourti*, and *Pseudomystus siamensis* (Supiwong et al., 2013, 2014), *Toxotes chatareus* (Supiwong et al., 2017). From the previous and current studies, it is believed that microsatellites have specific zones as heterochromatin (telomeres, centromeres and in the sex chromosomes) of fish genomes (Cioffi and Bertollo, 2012). However, microsatellites have also been found in noncentromeric regions, many of them were located either near or within genes (Rao et al., 2010).

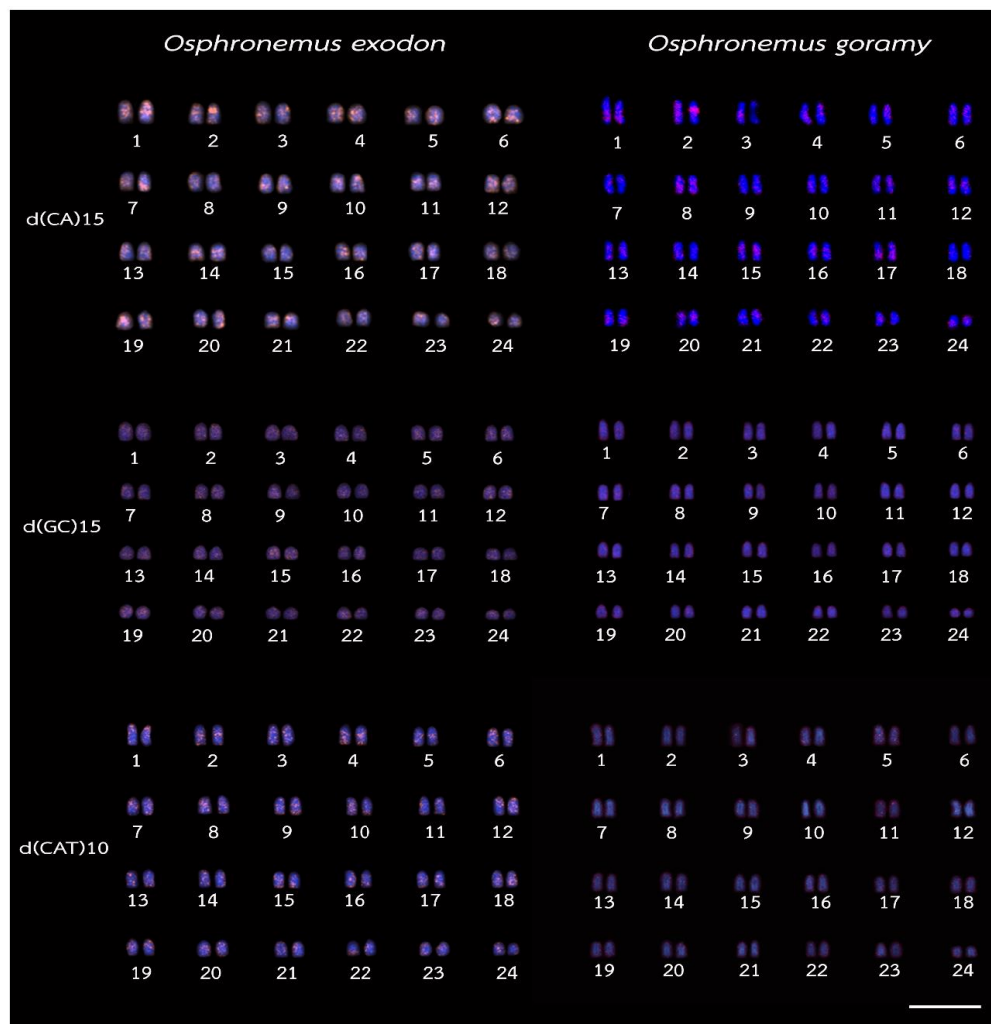


Figure 2 The patterns of $d(CA)_{15}$, $d(GC)_{15}$ and $d(CAT)_{10}$ microsatellites distributions on the chromosomes of *Osphronemus exodon* and *O. goramy*. Scale bar indicates 5 μm .

CONCLUSIONS

The present research is the first report on the NOR -banding and FISH techniques in *O. exodon* and *O. goramy*. Although both species have the same the diploid chromosome number ($2n=48$) and the fundamental number ($NF=48$) and two NOR-bearing chromosomes, there are differences in the number of each chromosome sizes, pairs having NOR and the patterns of microsatellites distributions on chromosomes as large-medium chromosome sizes: 18-30 and 20-28 in *O. exodon* and *O. goramy*, respectively. The NORs can be observed at the regions adjacent to the centromeres of pairs 15 and 22, respectively. The microsatellites are distributed throughout in all chromosomes with high accumulations at centromeric, interstitial and telomeric positions in several pairs of *O. exodon* while in *O. goramy*, those display at some areas of some chromosomes. This result indicated that cytogenetic data can be used for classification in related fish species which have similar morphology.



ACKNOWLEDGEMENTS

Present work was supported by the Research Grant of Khon Kaen University through National Research Council of Thailand (Grant no. 6100015), the research grant of the Office of the Higher Education Commission and the Thailand Research Fund (MRG6080020), and Toxic Substances in Livestock and Aquatic Animals Research Group, Khon Kaen University.

REFERENCES

- Arai, R. 2011. *Fish Karyotypes: A Check List*. Tokyo: Springer Japan.
- Calton, M.S. and Denton, T.E. 1974. Chromosomes of the chocolate gourami: a cytogenetic anomaly. *Science*. 185: 618-619.
- Campiranont, A. 2003. *Cytogenetics*. 2nd ed. Bangkok: Department of Genetics, Faculty of Science, Kasetsart University, Thailand.
- Cioffi, M.B. and Bertollo, L.A.C. 2012. Distribution and evolution of repetitive DNAs in fish. In: Garrido-Ramos, M.A., (Ed), Repetitive DNA. Karger, Genome Dyn. 2012, vol 7, Basel, pp. 197-221.
- Chaiyasut, K. 1989. *Cytogenetics and Cytotaxonomy of the Family Zephyranthes*. Bangkok: Department of Botany, Faculty of Science, Chulalongkorn University.
- Donsakul, T., Magtoon, W. and Rangsiruji, A. 2006. Karyotypes of three giant gourami, *Osphronemus goramy*, *O. exodon* and *O. latilavus* (Pisces : Osphronemidae). In: *The Proceedings of 44th Kasetsart University Annual Conference : Fisheries*. Bangkok. pp. 461-468.
- Goldstein, H. 2005. Searching for the pygmy gourami. *Tropical Fish Hobbyist*. 54(1): 93.
- 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: 1014-1015.
- Jenkins, A., Kullander, F.F. and Tan, H.H. 2009. *Osphronemus exodon*. *The IUCN Red List of Threatened Species 2009*: e.T169508A6640069. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2009-2.RLTS.T169508A6640069.en>. Downloaded on 05 April 2019.
- Koref-Santibanez, S., Paepke, H. and Tjio, H. 1991. Karyotypes of the species of the genus *Macropodus* Lac. (Pisces, Anabantoidei). *Zoologischer Anzeiger*. 227: 271-278.
- Kubat, Z., Hobza, R., Vyskot, B. and Kejnovsky, E. 2008. Microsatellite accumulation in the Y chromosome of *Silene latifolia*. *Genome*. 51: 350-356.
- Kushwaha, B., Kumar, R., Nagpure, N.S., Behera, B.K. and Lakra, W.S. 2008. Chromosome banding in two freshwater gouramies from north eastern India. *Nucleus*. 51: 61-72.
- Lakra, W.S. and Rishi, K.K. 1991. Chromosomes of Indian fishes: an annotated list. *Indian Journal of Animal Science*. 61: 342-349.
- Lee, H.Y., Yu, C.H., Jeon, S.K. and Lee, H.S. 1983. The karyotype analysis on 29 species of fresh water fish in Korea. *Bulletin of Institute of Basic Science, Inha University*. 4: 79-86. (In Korean with English abstract)
- Liehr, T. (ed). 2009. *Fluorescence In Situ Hybridization (FISH)-Application Guide*. Verlag, Berlin, Heidelberg: Springer.
- Manna, G.K. and Prasad, R. 1977. Chromosome analysis in five species of fresh water fishes. *Nucleus*. 20: 264-271.

- Na-Nakorn, U., Tarnchalanukit, W. and Taptippawan, P. 1980. Induction of triploidy in *Clarias batrachus* by cold shock. *Kasetsart Journal*. 22: 116-121.
- Nelson, J.S. 2006. *Fishes of the world*. 4th ed. New York: John Wiley and Sons, Inc.
- Ojima, Y. and Yamamoto, K. 1990. Cellular DNA contents of fishes determined by flow cytometry. *La Kromosomo*, II. 57: 1871-1888.
- Pinkel, D., Straume, T. and Gray, J. 1986. Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitivity, fluorescence hybridization. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 83: 2934-2938.
- Rainboth, W. J. 1996. *Fishes of the Cambodian Mekong*. Rome: FAO of the United Nation.
- Rao, S.R., Trivedi, S., Emmanue, D., Merita, K. and Hynniewta, M. 2010. DNA repetitive sequences- types, distribution and function: A review. *Journal of Cell and Molecular Biology*. 7(2)&8(1): 1-11.
- Rishi, K.K. 1975. Somatic and meiotic chromosomes of *Trichogaster fasciatus* (Bl. & Sch.) (Teleostei, Perciformes: Osphronemidae). *Genen Phaenen*. 18: 49-53.
- Rishi, K.K. 1979. Somatic G-banded chromosomes of *Colisa fasciatus* (Perciformes: Belontiidae) and confirmation of female heterogamety. *Copeia*. 1979: 146-149.
- Rishi, S., Gill, P.K. and Rishi, K.K. 1997. Karyotypic studies in eight species of fishes belonging to family Belontiidae (Pisces, Perciformes). *Chromosome Science*. 1: 55-59.
- Roberts, T.R. 1992. Systematic revision of the Southeast Asian anabantoid fish genus *Osphronemus*, with descriptions of two new species. *Ichthyology Explorer Freshwater*. 2(4): 351-360
- Rooney, D.E. 2001. *Human Cytogenetics: Constitutional Analysis: a Practical Approach*. London: Oxford University Press.
- Sanjundaeng, P. 2014. *Encyclopedia of Freshwater fishes in Thailand*. Khon Kaen: Klang Na Na Press, Khon Kaen University.
- Sobita, N. and Bhagirath, T. 2007. *Colisa fasciata* (Schneider) (Perciformes, Anabantoidei, Belontiidae): karyotype is divergent and ZW sex chromosomes are allocyclic and asynaptic. *Nucleus*. 50: 45-49.
- Sofy, H.I., Layla, A.M. and Iman, M.K.A. 2008. Karyotypic diversity of some tilapia species. *Nature and Science*. 6(1): 19-27.
- Supiwong, W., Jiwyam, W., Sreeputhorn, K., Maneechot, N., Bertollo, L. A. C., Cioffi, M. B., Getlekha, N. and Tanomtong, A. 2017. First reports on classical and molecular cytogenetics of archerfish, *Toxotes chatareus* (Perciformes: Toxotidae). *Nucleus (India)*. 60(3): 349-359. DOI 10.1007/s13237-017-0216-5.
- Supiwong, W., Liehr, T., Cioffi, M.B., Chaveerach, A., Kosyakova, N., Pinthong, K., Tanee, T. and Tanomtong, A. 2013. Karyotype description and cytogenetic mapping of 9 classes of repetitive DNAs on the Thailand catfish *Mystus bocourti*. *Molecular Cytogenetics*. 6: 51.
- Supiwong, W., Liehr, T., Cioffi, M.B., Chaveerach, A., Kosyakova, N., Pinthong, K., Tanee, T. and Tanomtong, A. 2014. Chromosomal evolution in naked catfishes (Bagridae, Siluriformes): A comparative chromosome mapping study. *Zoologischer Anzeiger*. 253: 316-320.



- Supiwong, W., Tanomtong, A., Chaveerach, A., Tanee, T., Khakhong, S. and Sanoamuang, L. 2013. Interpopulational variation of NOR positions and karyotypic analysis of Siamese catfish (*Pseudomystus siamensis*) in Thailand. *Cytologia*. 78(2): 25 –34.
- Supiwong, W., Tanomtong, A., Jumrusthanasan, S., Khakhong, S., Leelarasamee, K. and Sanoamuang, L. 2012. A first karyotype analysis and chromosomal characteristic of nucleolar organizer regions (NORs) in the common sheathfish, *Micronema apogon* (Siluriformes, Siluridae) in Thailand. *Cytologia*. 77(1): 53 –58.
- Supiwong, W., Tanomtong, A., Kenthao, A., Seetapan, K., Kaewsri, S. and Sanoamuang, L. 2010. Standardized karyotype of the three-spot gourami, *Trichogaster trichopterus* (Perciformes, Belontiidae) from Thailand by conventional and Ag-NOR staining technique. *Nucleus* (Sept–Dec 2010). 53(3): 103–107.
- Tanomtong, A. 2011. *Cytogenetics*. Khon Kaen: Khon Kaen University press.
- Turpin, R. and Lejeune, J. 1965. *Les Chromosomes Humains*. Paris: Gauthier-pillar.
- Vidthayanon, C. 2005. *Handbook of Freshwater Fish*. 2nd ed. Bangkok: Sarakadee Press.
- Yüksel, E. and Gaffaroğlu, M. 2008. The analysis of nucleolar organizer regions in *Chalcalburnus mossulensis* (Pisces: Cyprinidae). *Journal of Fisheries Science*. 2: 587–591.

เอกสารอ้างอิง

- กันยารัตน์ ไชยสุต. 2532. **เซลล์พันธุศาสตร์และเซลล์อนุกรมวิธานของพืชสกุล *Zephyranthes***. ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.
- กรมประมง. 2553. **ยุทธศาสตร์ปลาสวยงาม ปี 2555-2559**. จัดทำโดย คณะทำงานเพื่อจัดทำยุทธศาสตร์ปลาสวยงาม ภายใต้คณะกรรมการจัดทำยุทธศาสตร์ปลาสวยงาม. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพฯ.
- จิราภรณ์ มิ่งขวัญ และ อลงกลด แทนอมทอง. 2556. พันธุศาสตร์เซลล์ของปลาเก๋า (*Morulus chrysophekadion*) และปลาดุก (*Nandus oxyrhynchus*). ใน: **การประชุมวิชาการพันธุศาสตร์แห่งชาติ ครั้งที่ 18**. รวมเล่มเต็ม Thai J. Genet. 2013, S(1): 338-342.
- ขวลิต วิทยานนท์. 2548. **ปลาน้ำจืดไทย**. พิมพ์ครั้งที่ 5. นานมีบุ๊คส์พับลิเคชั่นส์, กรุงเทพฯ.
- ขวลิต วิทยานนท์ จรัสธาดา กรรณสูตร และ จารุจินต์ นภิตะภัก. 2540. **ความหลากหลายชนิดของปลาน้ำจืดในประเทศไทย**. บริษัทอินทรีเเกรเด็ด โปรโมชัน เทคโนโลยี จำกัด, กรุงเทพฯ.
- ธวัช ดอนสกุล. 2539. การศึกษาโครโมโซมของปลาเค้ด้า ปลาเค้ขาว ปลาหางเบื่อน และปลาก้างพระร่วงที่พบในประเทศไทย. ใน: **การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 34 สาขาพืช ประมง**. หน้า 367-377. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- ธวัช ดอนสกุล, วิเชียร มากต่น และอัจฉริยา รังษิรุจิ. 2549. **การโอโตไป์ของปลาแรด ปลาแรดแม่น้ำโขง และปลาแรดแดง**. ใน: รายงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 44. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ: 461-467.
- ธวัช ดอนสกุล, อัจฉริยา รังษิรุจิ และ วิเชียร มากต่น. 2550. การโอโตไป์ของปลาจาด จาด ปากเปลี่ยน และสร้อยน้ำเงินที่พบในประเทศไทย. ใน: **การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 45**. หน้า 740-748. สาขาประมง, กรุงเทพฯ.
- วิเชียร มากต่น และ ธวัช ดอนสกุล. 2536. การศึกษาโครโมโซมของปลาแกด ปลาทรงเครื่อง และปลายี่สกเทศ. ใน: **การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 31** 3-6 กุมภาพันธ์. หน้า 543-551. สาขาสัตว ประมง สัตวแพทยศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- วีรยุทธ เลหาะจินดา. 2552. **วิทยาสัตว์เลื้อยคลานและสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก**. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- วีระยุทธ สุภวัค. 2557. ความหลากหลายของโครโมโซมปลาน้ำจืดในประเทศไทย. **วารสารวิทยาศาสตร์ คชสาร**. 36(1): 50-65.
- สมโภชน์ อัคระทวิวัฒน์. 2544. **ประวัติความเป็นมาปลาหมอสีและอนุกรมวิธาน คู่มือปลาหมอสี**: 9-54. กรมประมง, กรุงเทพมหานคร.

- สมโภชน์ อัคระทวีวัฒน์. 2547. **สารนํ้าจืดไทย เล่ม ๒**. องค์การค้าของคุรุสภา.
- สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร. 2554. **การศึกษาเศรษฐกิจการผลิตการตลาดปลาสงขลาม**.
สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพฯ.
- อัจฉริยา รังษิณี วิเชียร มากต่น และ ธวัช ดอนสกุล. 2550. คาร์ิโอไทป์ของปลาแค้ว แค้ววาย
แค้ง และแค้ตืดหินสามแถบที่พบในประเทศไทย. ใน: **การประชุมทางวิชาการของ
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 45**. หน้า 732-739. สาขาประมง, กรุงเทพฯ.
- อมรา คัมภีรานนท์. 2546. **พันธุศาสตร์ของเซลล์**. พิมพ์ครั้งที่ 2. ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะ
วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.
- อลงกลด แทนอมทอง. 2554. **พันธุศาสตร์ของเซลล์**. โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยขอนแก่น,
ขอนแก่น.
- Arai, R. 2011. **Fish Karyotypes: A Check List**. Springer Japan, Tokyo.
- Calton, M. S. and Denton, T. E. 1974. Chromosomes of the chocolate gourami: a
cytogenetic anomaly. **Science**, 185: 618-619.
- Canapa, A., Cerioni, P. N., Barucca, M., Olmo, E. and Caputo, V. 2002. A centromeric
satellite DNA may be involved in heterochromatin compactness in gobiid
fishes. **Chromosome Research** 10: 297-304.
- Chen, T. R. and Ebeling, A. W. 1968. Karyological evidence of female
heterogamete in the mosquito fish, *Gambusia affinis*. **Copeia** 1: 70-75.
- Cioffi, M.B. and Bertollo, L. A. C. 2012. Distribution and evolution of repetitive
DNAs in fish. In: Garrido- Ramos, M.A., (Ed), Repetitive DNA. **Karger,
Genome Dyn.** 2012, vol 7, Basel, pp. 197-221.
- Cioffi, M.B., Martins, C. and Bertollo, L. A. C. 2009. Comparative chromosome
mapping of repetitive sequences. Implications for genomic evolution in the
fish, *Hoplias malabaricus*. **BMC. Genetics** 10: 34.
- Cross, I., Merlo, A., Manchdo, M., Infante, C., Canavate, J. P. and Rebordinos, L.
2006. Cytogenetic characterization of the sole *Solea senegalensis*
(Teleostei: Pleuronectiformes: Soleidae): Ag-NOR, (GATA)_n, (TTAGGG)_n and
ribosomal genes by one-color and two-color FISH. **Genetica** 128: 253-259.
- Donsakul, T. 1992. Chromosome study on three species of silurid fishes,
Kryptopterus cryptopterus, *K. bleekeri* and *Ompok bimaculatus*, from
Thailand. In: **Congress on Science and Technology of Thailand**. 18: 398-
399. Bangkok
- Elgar, G., Clark, M. S., Meek, S., Smith, S., Warner, S., Edwards, Y. J. K., Bouchireb,
N., Cottage, A., Yeo, G. S. H., Umrana, Y., Williams, G. and Brenner, S. 1999.
Generation and analysis of 25 Mb of genomic DNA from the pufferfish *Fugu
rubripes* by sequence scanning. **Genome Research** 9: 960-971.

- Eschmeyer, W. N. (ed). 2016. **Catalog of Fishes: Genera, Species, References**.
<http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>. Electronic version accessed 28 June 2016.
- Eschmeyer, W. N. and Fong, J. D. 2016. **Catalog of Fishes: Species by Family/Subfamily**. Online Version, Updated 2 August 2016.
<http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp>
- Fan, Y. S. 2002. **Molecular Cytogenetics Protocols and Applications**. New Jersey: Humana Press.
- Ferguson, J. W., Healey, M., Dugan, P. and Barlow, C. 2011. Potential effects of dams on migratory fish in the Mekong River: lessons from the Fraser and Columbia Rivers. **Environmental Management** 47 (1): 141-159.
doi:10.1007/s00267-010-9563-6.
- Fischer, C., Bouneau, L., Coutanceau, J. P., Weissenbach, J., Volff, J. N. and Ozouf-Costaz, C. 2004. Global heterochromatic colocalization of transposable elements with minisatellites in the compact genome of the pufferfish *Tetraodon nigroviridis*. **Gene** 336: 175-184.
- Fontana, F., Lanfredi, M., Congiu, L., Leis, M., Chicca, M. and Rossi, R. 2003. Chromosomal mapping of 18S-28S and 5S rRNA genes by two-colour fluorescent in situ hybridization in six sturgeon species. **Genome** 46: 473-477.
- Garrido-Ramos, M.A., Jamilena, M., Lozano, R., Ruiz Rejón, C. and Ruiz Réjon, M. 1994. Cloning and characterization of a fish centromeric satellite DNA. **Cytogenetics and Cell Genetics** 65: 233-237.
- Gold, J. R., Li, Y. C., Shipley, N. S. and Powers, P. K. 1990. Improved methods for working with fish chromosomes with a review of metaphase chromosome banding. **Journal of Fish Biology** 37: 563-575.
- Gomonteir, B., Tanomtong, A., Supiwong, W., Sikhruadong, S., Neeratanaphan, L. and Sanoamuang, L. 2012. Standardized karyotype and idiogram of the two-spot glass catfish, *Ompok bimaculatus* (Siluriformes, Siluridae) in Thailand by conventional and Ag-NOR staining techniques. **Cytologia** 77(4): 459-464.
- Hatanaka, T., Henrique-Silva, F. and Galetti Jr., P. M. 2002. A polymorphic, telomeric-like sequence microsatellite in the Neotropical fish *Prochilodus*. **Cytogenet. Genome Res.** 98: 308-310.

- 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: 1014-1015.
- Jurka, J., Kapitonov, V. V., Pavlicek, A., Klonowski, P., Kohany, O. and Walichiewicz, J. 2005. Repbase update, a database of eukaryotic repetitive elements. **Cytogenet. Genome Res.** 110: 462-467. doi: 10.1159/000084979
- Koref-Santibanez, S., Paepke, H. and Tjio, H. 1991. Karyotypes of the species of the genus *Macropodus* Lac. (Pisces, Anabantoidei). **Zool. Anz.**, 227: 271-278.
- Kottelat, M. 2001. **Fishes of Laos**. WHT Publications (Pte) Ltd., Sri Lanka.
- Kubat, Z., Hobza, R., Vyskot, B. and Kejnovsky, E. 2008. Microsatellite accumulation in the Y chromosome of *Silene latifolia*. **Genome** 51: 350-356.
- Kushwaha, B., Kumar, R., Nagpure, N. S., Behera, B. K. and Lakra, W. S. 2008. Chromosome banding in two freshwater gouramies from north eastern India. **Nucleus** 51: 61-72.
- Lakra, W. S. and Rishi, K. K. 1991. Chromosomes of Indian fishes: an annotated list. **Ind. J. Anim. Sci.** 61: 342-349.
- Lanfredi, M., Congiu, L., Garrido-Ramos, M. A., Herrrán, R., Leis, M., Chicca, M., Rossi, R., Tagliavini, J., Ruiz Rejón, M. and Fontana, F. 2001. Chromosomal location and evolution of a satellite DNA family in seven sturgeon species. **Chromosome Research** 9: 47-52.
- Lee, H. Y., Yu, C. H., Jeon, S. K. and Lee, H. S. 1983. The karyotype analysis on 29 species of fresh water fish in Korea. **Bull. Inst. Basic. Sci., Inha Univ.** 4: 79-86. (In Korean with English abstract)
- Liehr, T. (ed). 2009. **Fluorescence In Situ Hybridization (FISH)-Application Guide**. Springer, Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Liu, S., Lu, P., Liu, D., Jin, P. and Wang, W. 2009. Pinpointing source and measuring the lengths of the principal rivers of the World. **International Journal of Digital Earth** 2(1): 80-87. doi:10.1080/17538940902746082.
- Magtoon, W. and Donsakul, T. 2009. Karyotypes of *Silurichthys phaiosoma*, *S. schneideri*, *Ompok fumidus* and *Kryptopterus macrocephalus* (Family Siluridae) from Thailand. In: **Congress on Science and Technology of Thailand**, Vol. 35, Bangkok, pp. B3-B0084.
- Maneechot, N., Yano, C. F., Bertollo, L. A. C., Getlekha, N., Molina, W. F. and Ditcharoen, S. 2016. Genomic organization of repetitive DNAs highlights chromosomal evolution in the genus *Clarias* (Clariidae, Siluriformes). **Molecular Cytogenetics** 9: 4.

- Manna, G. K. and Prasad, R. 1977. Chromosome analysis in five species of fresh water fishes. **Nucleus** 20: 264-271.
- Mantovani, M., Abel, L. D. S., Mestriner, C. A. and Moreira-Filho, O. 2004. Evidence of the differentiated structural arrangement of constitutive heterochromatin between two populations of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). **Genetics and Molecular Biology** 27: 536-542.
- Martins, C. 2007. Chromosomes and Repetitive DNAs: A Contribution to the Knowledge of the Fish Genome. In: Pisano, E., Ozouf-Costaz, C. and Foresti, F. (Editors). **Fish Cytogenetics**. Science Publishers pp 421-453.
- Mazzei, F., Ghigliotti, L., Bonillo, C., Coutanceau, J-P., Ozouf-Costaz, C. and Pisano, E. 2004. Chromosomal patterns of major and 5S ribosomal DNA in six icefish species (Perciformes, Notothenioidei, Channichthyidae). **Polar Biology** 28: 47-55.
- Mazzuchelli, J. and Martins, C. 2009. Genomic organization of repetitive DNAs in the cichlid fish *Astronotus ocellatus*. **Genetica** 136: 461-469.
- Nanda, I., Scharlt, M., Feichtinger, W., Schlupp, I., Parzefall, J. and Schmid, M. 1995. Chromosomal evidence for laboratory synthesis of triploid hybrid between the gynogenetic teleost *Poecilia Formosa* and its host species. **Journal of Fish Biology** 47: 619-623.
- Ojima, Y. and Yamamoto, K. 1990. Cellular DNA contents of fishes determined by flow cytometry. **La Kromosomo, II** 57: 1871-1888.
- Oliveira, C. and Wright, J. M. 1998. Molecular cytogenetic analysis of heterochromatin in the chromosomes of tilapia, *Oreochromis niloticus* (Teleostei, Cichlidae). **Chromosome Res** 6: 205-211.
- Rainboth, W. J. 1996. **Fishes of the Cambodian Mekong**. FAO of the United Nation, Rome. 263p.
- Reed, K. M. and Phillips, R. B. 1995. Molecular characterization and cytogenetic analysis of highly repeated DNAs of lake trout, *Salvelinus namaycush*. **Chromosoma** 104: 242-251.
- Rishi, K. K. 1975. Somatic and meiotic chromosomes of *Trichogaster fasciatus* (Bl. & Sch.) (Teleostei, Perciformes: Osphronemidae). **Genen Phaenen**. 18: 49-53.
- Rishi, K. K. 1979. Somatic G-banded chromosomes of *Colisa fasciatus* (Perciformes: Belontiidae) and confirmation of female heterogamety. **Copeia** 1979: 146-149.

- Rishi, K. K. and Singh, J. 1983. Chromosomal analysis of the Indian silurid, *Wallago attu* (Schneider) (family: Siluridae). **Chromosome Information Service** 34: 10-11.
- Rishi, S., Gill, P. K. and Rishi, K. K. 1997. Karyotypic studies in eight species of fishes belonging to family Belontiidae (Pisces, Perciformes). **Chrom. Sci.** 1: 55-59.
- Rooney, D. E. 2001. **Human Cytogenetics: Constitutional Analysis: a Practical Approach**. Oxford University Press, London.
- Ruth, B. P. and Kent, M. R. 1996. Application of Fluorescence in situ hybridization (FISH) techniques to fish genetics: a review. **Aquaculture** 140: 197-216.
- Sermwatanakul, A. 2005. **The Current State of Ornamental Fish Industry in Thailand**. Extension Paper No. 2/2005. Ornamental Fish and Aquarium Plants Research Center, Department of Fisheries. 26 pp.
- Sharma, O. P. and Tripathi, N. K. 1984. Somatic chromosome analysis of *Wallago attu*, a siluroid fish from Jammu (J & K), India. **Perspectives in Cytology and Genetics** 4: 437-439.
- Sobita, N. and Bhagirath, T. 2007. *Colisa fasciata* (Schneider) (Perciformes, Anabantoidei, Belontiidae) karyotype is divergent and ZW sex chromosomes are allocyclic and asynaptic. **Nucleus** 50: 45-49.
- Sola, L. and Gornung, E. 2001. Classical and molecular cytogenetics of the zebrafish, *Danio rerio* (Cyprinidae, Cypriniformes): an overview. **Genetica** 111: 397-412.
- Supiwong, W., Jiwyam, W., Sreeputhorn, K., Maneechot, N., Bertollo, L. A. C., Cioffi, M. B., Getlekha, N. and Tanomtong, A. 2017. First reports on classical and molecular cytogenetics of archerfish, *Toxotes chatareus* (Perciformes: Toxotidae). **Nucleus** (India). 60(3): 349-359. DOI 10.1007/s13237-017-0216-5.
- Supiwong, W., Liehr, T., Cioffi, M. B., Chaveerach, A., Kosyakova, N., Pinthong, K., Tanee, T. and Tanomtong, A. 2013. Karyotype description and cytogenetic mapping of 9 classes of repetitive DNAs on the Thailand catfish *Mystus bocourti*. **Molecular Cytogenetics**.6: 51.
- Supiwong, W., Liehr, T., Cioffi, M. B., Chaveerach, A., Kosyakova, N., Pinthong, K., Tanee, T. and Tanomtong, A. 2014. Chromosomal evolution in naked catfishes (Bagridae, Siluriformes): A comparative chromosome mapping study. **Zoologischer Anzeiger**. 253: 316-20.
- Supiwong, W., Tanomtong, A., Chaveerach, A., Tanee, T., Khakhong, S. and Sanoamuang, L. 2013. Interpopulational variation of NOR positions and

- karyotypic analysis of Siamese catfish (*Pseudomystus siamensis*) in Thailand. **Cytologia**. 78(2): 25-34.
- Supiwong, W., Tanomtong, A., Kenthao, A., Seetapan, K., Kaewsri, S., Sanoamuang, L. 2010. Standardized karyotype of the three-spot gourami, *Trichogaster trichopterus* (Perciformes, Belontiidae) from Thailand by conventional and Ag-NOR staining technique. **Nucleus** (Sept-Dec 2010), 53(3), 103-107.
- Taki, Y., Urushido, T., Suzuki, A. and Serizawa, C. 1977. A comparative chromosome study of *Puntius* (Cyprinidae: Pisces). I. Southeast Asian species. **Proceeding of the Japan Academy Series B** 53: 231-235.
- Turpin, R. and Lejeune, J. 1965. **Les Chromosomes Humains**. Gauthier-pillars, Paris.
- Vanzela, A.L.L., Swarça, A.C., Dias, A.L., Stolf, R., Ruas, P.M., Ruas, C.F., Sbalqueiro, I.J. and Giuliano-Caetano, L. 2002. Differential distribution of (GA)₉+C microsatellite on chromosomes of some animal and plant species. **Cytologia** 67: 9-13.
- Vicari, M. R., Artoni, R. F. and Bertollo, L. A. C. 2005. Comparative cytogenetics of *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae). A population analysis in adjacent hydrographic basins. **Genet Mol Biol**. 28: 103-110.