- 1 ส.ค. 2543

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยทักษิณ

116216

รายงานการวิจัย

เรื่อง

การศึกษาโครโมโซมของกุ้งก้ามกรามที่พบในประเทศไทย

A Chromosome study of *Macrobrachium rosenbergii* from Thailand

โดย

นางอรุณรัศมิ์ วณิชชานนท์

นางแจ่มจันทร์ เพชรศิริ

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยทักษิณ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากงบประมาณรายได้

ของมหาวิทยาลัยทักษิณ ประจำปีงบประมาณ 2539

หนังสือนี้เป็นกรรมสิทธิ์ของสำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยทักษิณ
ห้ามคัดลอกไม่ว่าส่วนใดส่วนหนึ่งโดยไม่ได้รับอนุญาต
ยกเว้นการอ้างอิงเพื่อการศึกษาค้นคว้า

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณมหาวิทยาลัยทักษิณ ที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัย และขอขอบคุณ แผนกเทคโนโลยีการประมง คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตปัตตานี และภาควิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยทักษิณ ที่ให้ใช้สถานที่ และครุภัณฑ์ในการวิจัย รวมทั้งขอขอบคุณ อาจารย์รพีพร เรืองช่วย อาจารย์เสวต ไชยมงคล และอาจารย์ ธนพันธุ์ ปัทมานนท์ ที่มีส่วนช่วยให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ ผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่า รายงานการวิจัยนี้ จะเป็นประโยชน์แก่ผู้สนใจ พร้อมทั้งยินดีรับฟังความคิดเห็นและข้อเสนอแนะเพื่อนำไปปรับปรุงในการวิจัยครั้งต่อไป

อรุณรัศมี์ วณิชชานนท์
แจ่มจันทร์ เพชรศิริ
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยทักษิณ

การศึกษาโครโมโซมของกุ้งก้ามกรามที่พบในประเทศไทย

บทคัดย่อ

จากการศึกษาโครโมโซมของกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) ที่พบในประเทศไทย โดยนำกุ้งก้ามกรามทั้งเพศผู้และเพศเมีย ขนาดความยาวเฉลี่ย 17.00 เซนติเมตร จำนวน 50 ตัว มาตัดขาเดินคู่ที่ 2 เลี้ยงไว้ 1 สัปดาห์ นำชิ้นส่วนเนื้อเยื่อที่งอกใหม่ (Regeneration blastema) ของขาเดินคู่ที่ 2 มาผ่านขั้นตอนการเตรียมโครโมโซม ตามวิธีของ ฮายาชิและฟูจิวารา (Hayashi and Fujiwara , 1988) นับจำนวนโครโมโซมในระยะเมตาเฟส (Metaphase) จำนวน 50 เซลล์ และการจำแนกโครโมโซมถือเอาตามวิธีของลีแวนและคณะ (Levan et al . , 1964) พบว่ากุ้งก้ามกรามมีจำนวนโครโมโซม แบบดิพลอยด์ (2n) เท่ากับ 118 แท่ง คาริโอไทพ์ประกอบด้วย โครโมโซมแบบเมตาเซนตริก (Metacentric) และ ซับเมตาเซนตริก (Submetacentric) จำนวน 45 คู่ ทีโลเซนตริก (Telocentric) และอะโครเซนตริก (Acrocentric) จำนวน 14 คู่ ส่วนโครโมโซมเพศไม่สามารถแยกได้ชัดเจน

ผลการศึกษาครั้งนี้เป็นข้อมูลพื้นฐานที่จะนำไปใช้ในการผสมพันธุ์ ปรับปรุงพันธุ์ หรือการเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซมของกุ้งต่อไปในอนาคต

Abstract

A chromosome study was conducted in the freshwater prawn , *Macrobrachium rosenbergii* , found in Thailand. Fifty specimens of male and female , average length standard 17.00 cm. had a second pair of periopods removed. These mutilated specimens were kept in a small aquarium for one week to induce the regeneration blastema. The method of chromosome preparation followed the Hayashi and Fujiwara technique (1988) , by preparing metaphase chromosome spreads from the tissue of the regeneration blastema. Classification of chromosome followed the method recommended by Levan et al. 1964. The diploid chromosome number is 118. The karyotype consist of 45 metacentric and submetacentric , 14 telocentric and acrocentric pairs. The sex chromosomes were cytologically indistinguishable.

This result will become a basic database of cytotaxonomy study about fresh water prawn in the future such as inbreeding , genetic improvement or chromosome manipulation.

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
สารบัญภาพ	1
สารบัญตาราง	2
บทที่ 1 บทนำ	3
ความสำคัญของปัญหา	3
วัตถุประสงค์	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
ขอบเขตของการวิจัย	3
สถานที่และระยะเวลาที่ทำการวิจัย	4
บทที่ 2 การตรวจเอกสาร	5
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการ	10
บทที่ 4 ผลการทดลอง	12
บทที่ 5 อภิปรายและสรุปผลการทดลอง	16
ข้อเสนอแนะ	16
บรรณานุกรม	17
ภาคผนวก	18

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 แสดงลักษณะและขนาดของกุ้งก้ามกรามที่นำมาใช้ในการทดลองหาจำนวนโครโมโซม 12

ภาพที่ 2 แสดงเนื้อเยื่อที่งอกใหม่จากบริเวณขาเดินคู่ที่ 2 ที่นำมาใช้หาจำนวนโครโมโซม 13

ภาพที่ 3 แสดงจำนวนโครโมโซมแบบดิพลอยด์ (2n) = 118 ของกุ้งก้ามกราม 13

ภาพที่ 4 แสดงคาริโอไทพ์ของกุ้งก้ามกราม 14

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 แสดงความถี่ในการกระจายของโครโมโซมแบบดิพลอยด์ในระยะเมตาเฟส ของการแบ่งเซลล์แบบไมโตซีสของกุ้งก้ามกราม 15

ตารางที่ 2 แสดงจำนวนโครโมโซมแบบดิพลอยด์ (2n) และคาริโอไทพ์ของกุ้งก้ามกราม 15

บทที่ 1
บทนำ

ความสำคัญของปัญหา

กุ้งก้ามกรามเป็นกุ้งน้ำจืดที่มีขนาดใหญ่ชนิดหนึ่ง ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทยเป็นอย่างมาก ซึ่งจัดอยู่ในประเภทอาหารสัตว์น้ำที่มีราคาแพง เนื้อมีรสดี เป็นที่นิยมของผู้บริโภคทั่วไป กุ้งชนิดนี้อาศัยอยู่ในแหล่งน้ำจืดที่มีทางน้ำติดต่อกับทะเล ส่วนทางภาคใต้พบชุกชุมมากที่ทะเลสาบสงขลา แต่ปัจจุบันความอุดมสมบูรณ์ของกุ้งก้ามกรามในแหล่งน้ำธรรมชาติมีจำนวนลดน้อยลง เนื่องจากสาเหตุหลายประการ เช่นการทำประมงเกินกว่าที่กุ้งจะเจริญเติบโตและขยายพันธุ์ได้ทัน ปัญหาความเสื่อมโทรมของสภาวะแวดล้อมของน้ำ (สถานีพัฒนาการเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกราม , 2535) จึงได้มีการศึกษาค้นคว้าและปรับปรุงวิธีการเพาะเลี้ยงกันมากขึ้น จนกระทั่งในปี พ. ศ. 2537 สามารถส่งกุ้งก้ามกรามเป็นสินค้าออกได้ถึง 10.4 พันตัน คิดเป็นมูลค่า 1,098.3 ล้านบาท (ฝ่ายสถิติและสารสนเทศการประมง , 2539) แต่พบว่าขนาดของกุ้งก้ามกรามในปัจจุบันมีขนาดเล็กกว่าที่เคยจับได้จากธรรมชาติ ประกอบกับลักษณะโดยทั่วไปของกุ้งก้ามกราม ส่วนของหัวและอกอยู่รวมกันมีขนาดใหญ่และมีน้ำหนักมากกว่าลำตัว ซึ่งเป็นปัญหาสำคัญที่เป็นอุปสรรคต่อการส่งเป็นสินค้าออก (กรมประมง ,2530) การศึกษาโครโมโซมและคาริโอไทพ์ของกุ้งก้ามกรามยังไม่มีรายงานว่ามีผู้ใดศึกษามาก่อนในประเทศไทย จึงเป็นสิ่งที่น่าให้ความสนใจอย่างยิ่งว่า โครโมโซมของกุ้งชนิดนี้มีจำนวนเท่าไร และมีคาริโอไทพ์อย่างไร ผลที่ได้จากการศึกษาอาจนำไปใช้ประโยชน์ทางด้านไซโตแทกโซโนมี และด้านการปรับปรุงพันธุ์กุ้งก้ามกรามให้มีลักษณะเหมาะสมต่อการส่งเป็นสินค้าออกและมีขนาดตามความต้องการของผู้บริโภค

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาโครโมโซมและคาริโอไทพ์ของกุ้งก้ามกราม

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานด้านไซโตแทกโซโนมีของกุ้ง
2. เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการปรับปรุงสายพันธุ์กุ้ง

ขอบเขตของการวิจัย

เก็บตัวอย่างกุ้งก้ามกรามจากฟาร์มเลี้ยงกุ้ง จำนวน 50 ตัว มาทำการนับจำนวนโครโมโซม จำนวน 50 เซลล์ และจัดทำคาริโอไทพ์

สถานที่และระยะเวลาทำวิจัย

เก็บตัวอย่างกุ้งจากฟาร์มเลี้ยงในจังหวัดปัตตานี นำมาตัดขาบริเวณขาเดินคู่ที่ 2 เลี้ยงไว้ 1 สัปดาห์ที่ แผนกเทคโนโลยีประมง คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตปัตตานี อ. เมือง จ. ปัตตานี และนำตัวอย่างเนื้อเยื่อที่งอกใหม่มาผ่านขั้นตอนการศึกษาโครโมโซม นับจำนวนโครโมโซมและจัดทำคาริโอไทพ์ ที่ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ อ. เมือง จ. สงขลา

ระยะเวลาที่ทำการวิจัย

เริ่มตั้งแต่เดือน กรกฎาคม 2539 ถึงเดือน ธันวาคม 2539 รวมระยะเวลา 6 เดือน

บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

กุ้งก้ามกรามเป็นกุ้งน้ำจืดที่มีขนาดใหญ่ของประเทศไทย สามารถอาศัยอยู่ได้ทั้งในน้ำกร่อยและน้ำจืด ตัวโตที่สุดเท่าที่เคยพบ มีความยาวจากหัวถึงหางประมาณ 25 เซนติเมตร หนัก 470 กรัม (กรมประมง , 2538) พบที่จังหวัดพระนครศรีอยุธยา มีชื่อเรียกหลายชื่อเช่น กุ้งนาง กุ้งหลวง กุ้งก้ามเกลี้ยง กุ้งแห กุ้งใหญ่ กุ้งแม่น้ำ มีการจัดจำแนกดังนี้ (อนันต์ , 2523)

Phylum Arthropoda

Class Crustacean

Order Decapoda

Family Palaemonidae

Genus *Macrobrachium*

Species *rosenbergii*

มีชื่อสามัญว่า Giant Freshwater Prawn มีถิ่นกำเนิดอยู่ทางตอนใต้และตะวันออกเฉียงใต้ของทวีปเอเชีย และบางส่วนของเกาะในมหาสมุทรแปซิฟิก สำหรับในประเทศไทยจะมีชุกชุมอยู่แถบภาคกลาง ตามลุ่มแม่น้ำเจ้าพระยา แม่น้ำนครชัยศรี แม่น้ำบางปะกง แม่น้ำสุพรรณบุรี แถบตะวันออกที่จังหวัดจันทบุรี และตราด ส่วนทางภาคใต้มีมากที่จังหวัดสุราษฎร์ธานีและที่ทะเลสาบสงขลา ตามธรรมชาติกุ้งจะอาศัยอยู่ตามคู คลอง หนอง บึง ที่มีทางติดต่อกับแม่น้ำใหญ่ที่ไหลออกสู่ทะเล ส่วนการเลี้ยงกุ้งก้ามกรามมีการเลี้ยงกันมานานกว่า 40 ปีมาแล้ว โดยมีการเลี้ยงกันมากในภาคกลาง โดยเฉพาะที่จังหวัดพระนครศรีอยุธยาและจังหวัดนนทบุรี (กรมประมง, 2538) ในปี 2520 รัฐบาลไทยได้รับความช่วยเหลือจาก เอฟ เอ โอ เพื่อตั้งศูนย์พัฒนาการเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกรามขึ้นที่สถานีประมงจังหวัดฉะเชิงเทรา ซึ่งทางสถานีได้ทำการทดลองค้นคว้าและปรับปรุงวิธีการเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกราม พร้อมทั้งส่งเสริมให้เอกชนทำการเพาะลูกกุ้งก้ามกรามเพื่อจำหน่ายทำให้ปริมาณลูกกุ้งก้ามกรามที่เคยขาดแคลนมีปริมาณเพียงพอ ซึ่งส่งผลให้มีการขยายตัวอย่างรวดเร็ว ในปัจจุบันนี้การเลี้ยงกุ้งก้ามกรามมีแหล่งใหญ่อยู่ในจังหวัดนครปฐม สุพรรณบุรี และราชบุรี พื้นที่ฟาร์มเลี้ยงกุ้งก้ามกรามมีตั้งแต่ 1 ไร่ ถึง 300 ไร่ แต่ส่วนมากพื้นที่การเลี้ยงอยู่ระหว่าง 10 ถึง 30 ไร่

ลักษณะทั่วไปของกุ้งก้ามกราม

ลักษณะภายนอกโดยทั่วไปของกุ้งก้ามกราม มีโครงร่างแข็งหุ้มอยู่นอกร่างกาย (Exoskeleton) ลำตัวแบ่งออกเป็น 3 ตอนคือ ส่วนหัว (Head) ส่วนอก (Thorax) และส่วนท้อง (Abdomen) โดยส่วนหัวและส่วนอกอยู่รวมเป็นปล้องเดียวกัน (Cephalothorax) มีน้ำหนักมากกว่าลำตัวเปลือกที่คลุมส่วนนี้เรียกว่า คาราเพซ (Carapace) ส่วนหนึ่งของเปลือกที่คลุมส่วนนี้งอนและยาวออกไปข้างหน้าเรียกว่ากรี (Rostrum) กรีด้านบนมีหยัก 12 - 15 หยัก กรีด้านล่างมีหยัก 10 - 14 หยัก โคนกรีกว้างและหนากว่าปลายกรี ยาวถึงแผ่นฐานหนวดคู่ที่ 2 ลักษณะสำคัญของกุ้งชนิดนี้คือบนเปลือกกุ้งบริเวณหัวส่วนหน้า ใกล้กับนัยตามีหนามเล็ก ๆ ด้านละ 2 อัน คือ เฮพาติก (Hapatic) และ แอนเทอนอล สไปร์ (Anternal spine) กับมีร่อง แบรงชิโอ สตีกอล กรูฟ (Branchiostegal groove) ปรากฏอยู่ทั้งสองข้าง (ชมรมพัฒนาการประมง, 2521) ส่วนตากุ้งเป็นตารวม มีก้านตา ส่วนอกคลุมด้วยเปลือกชิ้นเดียวกัน ส่วนของลำตัวมีลักษณะเป็นปล้อง ๆ มี 6 ปล้อง

กุ้งก้ามกรามมีหนวด 2 คู่ ใช้รับความรู้สึก หนวดคู่แรกส่วนของโคนหนา แบ่งเป็น 3 ข้อปล้อง ปล้องที่สาม แยกเป็นเส้นหนวด 2 เส้น หนวดคู่ที่สอง ยาวกว่าหนวดคู่ที่ 1 แบ่งเป็น 5 ข้อปล้อง ความยาวของฐานหนวดคู่ที่สอง ยาวเป็น 3 เท่าของความกว้างแผ่นฐานหนวดคู่ที่สอง

ขาเดิน (Walking legs หรือ Periopods) ของกุ้งก้ามกรามมี 5 คู่ โดยขาคู่ที่หนึ่งและสองตรงปลายมีลักษณะเป็นก้าม มีหน้าที่ต่างกันออกไป ก้ามคู่ที่ 1 (Chelipeds) มีขนาดเล็กใช้จับฉีกอาหารเข้าปาก ป้องกันตัวและทำความสะอาด ส่วนขาเดินคู่ที่ 2 ที่มีลักษณะเป็นก้ามนั้นถ้าเป็นตัวผู้จะมีลักษณะใหญ่มาก โดยทั่วไปส่วนของก้ามทำหน้าที่ในการจับอาหารเข้าปาก ป้องกันศัตรู และใช้เป็นอาวุธสำหรับรุกรานผู้อื่น ส่วนคู่ที่ 3 . 4 และ 5 ตรงปลายมีลักษณะเป็นปลายแหลมธรรมดาทำหน้าที่เดิน เปลือกทางส่วนท้องแยกออกเป็นปล้อง ๆ เรียกว่า สกรีไรท์ (Sclerite) มี 6 ปล้อง เปลือกที่โค้งคลุมตัวเรียกว่า เทอกัม (Tergum) และส่วนที่ห้อยเลยตัวลงไปเรียกว่า พริวรอน (Pleuron) บริเวณใต้ท้องมีเปลือกบางใสหุ้ม เรียกว่าสเตอนัม (Sternum)

ระยางค์ส่วนท้องมีทั้งหมด 6 คู่คือ ระยางค์ว่ายน้ำ (Swimming legs) มี 5 คู่ และแพนหาง (Telson) มีลักษณะแหลม ตรงปลายด้านข้างเป็นแพนออกไปสองข้าง

ลักษณะของสี สีของกุ้งก้ามกรามโดยทั่วไปมีสีน้ำเงินอมเหลือง โดยเฉพาะขาเดิน คู่ที่เป็นก้ามและส่วนของลำตัวมีสีน้ำเงินเข้ม ปลายขามักเป็นสีชมพูอมแดง แพนหางตอนปลายมีสีชมพูอมแดงทั่ว ๆไป ส่วนความแตกต่างระหว่างกุ้งก้ามกรามเพศผู้และเพศเมียสามารถแยกเพศได้โดยดูลักษณะของขาว่ายน้ำคู่ที่สอง ถ้าเป็นกุ้งเพศเมียตรงปลายขาว่ายน้ำคู่ที่สอง ตรงปล้องสุดท้ายแยกออกเป็นแขนง 3 อัน โดยอันเล็กสุดอยู่ด้านใน ถ้าเป็นกุ้งเพศผู้ปลายขาว่ายน้ำคู่ที่สอง แยกเป็นแขนง 4 อัน หรือในกุ้งขนาดใหญ่สามารถแยกเพศได้โดย กุ้งเพศผู้จะมีขาเดินคู่ที่ 2 ซึ่งเรียกว่าก้าม (กรมประมง, 2530) จะมีขนาดใหญ่และยาวกว่าคู่อื่น ๆ มาก และมีขนาดใหญ่กว่าของเพศเมียอย่างเห็นได้ชัดเจน

ส่วนเพศเมียหลังจากผสมพันธุ์แล้วเพศเมียจะปล่อยไข่ออกมาอุ้มไว้ที่ส่วนท้องเห็นได้ชัดเจน (สุรินทร์และสมสุข , 2533)

การศึกษาโครโมโซมและคาริโอไทพ์

การศึกษาโครโมโซมของครัสเตเชียน (Crustacean) ยังมีการศึกษากันไม่มากนัก Mittal และ Dhall , 1971 ได้ทำการศึกษาในกุ้งน้ำจืดของอินเดีย 3 ชนิดคือ *Macrobrachium siwalikensis Paratelphusa masoniana* และ *Potamon koolooense* ทำการศึกษาโดยการนำอัณฑะมาแช่ในน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 37 ° C นาน 20 นาที แล้วตรึง (fix) ตัวอย่างใน อะซิติก – แอลกอฮอล์ (Acetic alcohol) 10 - 15 นาที แล้วนำไปขยี้ (Squash) บนสไลด์ แล้วย้อมด้วยสี อะซีโตคามาย (Aceto - camine) หรือ อะซีโตออซิน (Aceto - orcein) พบว่ากุ้งชนิด *Macrobrachium siwalikensis* มีโครโมโซมแบบดิพลอยด์ (2n) เท่ากับ 100 และทุกโครโมโซมเป็นแบบ เมตาเซนตริก (Metacentric) และไม่มีความแตกต่างระหว่างโครโมโซมเพศและโครโมโซมร่างกาย ส่วนกุ้งชนิด *Paratelphusa masoniana* มีโครโมโซมแบบดิพลอยด์ (2n)เท่ากับ 134 และมีโครโมโซมบางมาก ไม่สามารถกำหนดตำแหน่งของเซนโตรเมียร์ได้ จึงไม่สามารถจัดคาริโอไทพ์ของกุ้งชนิดนี้ได้ และกุ้งชนิด *Potamon koolooense* มีจำนวนโครโมโซมแบบดิพลอยด์ (2n) เท่ากับ 80 และไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างโครโมโซมเพศและโครโมโซมร่างกายได้ และจำนวนโครโมโซมของกุ้งในครอบครัว Palaemonidae มีจำนวนโครโมโซมแบบดิพลอยด์อยู่ระหว่าง 100 – 134 ซึ่งสูงกว่าจำนวนโครโมโซมของกุ้งในสกุลพีเนียส (Penaeus) ซึ่งมีจำนวนระหว่าง 88 – 90 (Murofushi และ Deguchi , 1990) ส่วน Mittal และ Dhall , 1971 พบว่าจำนวนโครโมโซมแบบแฮพลอยด์ (n) ของสัตว์ในอันดับเดคาโพดา (Order Decapoda) มีจำนวนระหว่าง 12 - 127 แท่ง และสัตว์จำพวกครัสเตเชี่ยนมีจำนวนโครโมโซมมากกว่าสัตว์ชนิดอื่น ฉนั้นจึงต้องทำการนับจำนวนโครโมโซมในระยะเมตาเฟสจากหลาย ๆ เซลล์หรือหลาย ๆ ตัวอย่าง เพื่อที่จะหาจำนวนโครโมโซมที่แน่นอน ความแตกต่างของจำนวนโครโมโซมไม่เพียงแต่ใช้ในการแยกความแตกต่างของสัตว์ในอันดับเดียวกัน แต่สามารถใช้แยกถึงความสัมพันธ์ของสัตว์ภายในชนิดเดียวกันด้วย ถึงแม้ว่ากุ้งในครอบครัวเดียวกันแต่มีจำนวนโครโมโซมต่างกัน เช่น *Paratelphusa masoniana* และ *Potamon koolooense* มีจำนวนโครโมโซมแบบดิพลอยด์ (2n) เท่ากับ 67 และ 80 ตามลำดับ ซึ่งตรงข้ามกับกุ้งชนิด *Macrobrachium siwalikensis* มีจำนวนโครโมโซมแบบแฮพลอยด์ (hapliod) (n) เท่ากับ 50 ซึ่งมีจำนวนใกล้เคียงกับกุ้งชนิด *Ovalipes punctatus* มีจำนวนโครโมโซมแบบแฮพพลอยด์ (n) เท่ากับ 51 52 ทั้งๆ ที่กุ้งทั้งสองชนิดนี้มีลักษณะภายนอกที่แตกต่างกันอย่างชัดเจน และ Hayashi และ Fujiwara , 1988 พบว่ากุ้งในสกุลเดียวกันอาจมีจำนวนโครโมโซมเท่ากันหรือแตกต่างกันก็ได้ เช่น *Penaeus japonicus* มีโครโมโซมแบบดิพลอยด์ เท่ากับ 86 ส่วน *Penaus aztecus* และ *Penaeus*

duorarum มีโครโมโซมแบบดิพลอยด์ เท่ากับ 88 ซึ่งต่างจาก *Penaeus japonicus* ส่วน *Peneus setferus* มีจำนวนโครโมโซมแบบดิพลอยด์เท่ากับ 90 และพบว่าการศึกษาจำนวนโครโมโซมของสัตว์จำพวกกุ้งและกั้งในระยะเมตาเฟส สามารถทำได้จากหลายบริเวณ เช่น เนื้อเยื่อส่วนตับอ่อน เหงือก โดยวิธีฉีดโคลชิซินเข้าช่องท้องและนำเนื้อเยื่อมาศึกษานับจำนวนโครโมโซม ซึ่งเหมือนกับวิธีการศึกษาโครโมโซมของปลา (ธวัชและวิเชียร ,2535) แต่ปัจจุบันการศึกษาโครโมโซมของกุ้งนิยมเก็บตัวอย่างจากเนื้อเยื่อที่งอกใหม่ (Regeneration blastema) ซึ่งตัดขาเดินของกุ้งคู่ที่ 2 ทิ้งไว้ 1 สัปดาห์ แล้วนำเนื้อเยื่อส่วนที่งอกใหม่นี้มาตรวจหาจำนวนโครโมโซม ซึ่งวิธีการนี้มีข้อดีกว่าวิธีการแบบเก่าหลายประการคือ การเก็บตัวอย่างจากตับอ่อน และจากเหงือก มักจะปนเปื้อนด้วยสิ่งสกปรกต่าง ๆ ส่วนการเตรียมตัวอย่างจากเนื้อเยื่อที่งอกใหม่จะได้ตัวอย่างที่สะอาด และมีข้อดีกว่าการเก็บตัวอย่างจากอวัยวะสืบพันธุ์ คือไม่มีอิทธิพลจากฤดูกาลเข้ามาเกี่ยวข้อง ยิ่งไปกว่านั้นไม่ต้องฆ่าสัตว์ทดลองเพียงแต่ตัดเนื้อเยื่อส่วนที่งอกใหม่มาใช้ในการทดลองเท่านั้น และสามารถทำการทดลองซ้ำได้ในระยะเวลาอันสั้น

สำหรับการจัดคาริโอไทพ์ Mittal และ Dhall , 1971 รายงานว่า สัตว์ในครอบครัว พาลีโมนิดี (Palaemonidae) มีสมาชิกประมาณ 125 ชนิด แต่ได้มีรายงานการศึกษาคาริโอไทพ์เพียง 2 ชนิดเท่านั้น คือ *Macrobrachium siwalikensis* มีจำนวนโครโมโซมแบบดิพลอยด์ เท่ากับ 100 และทุกโครโมโซมเป็นแบบเมตาเซนตริก และไม่มีลักษณะภายนอกที่แตกต่างระหว่างโครโมโซมเพศและโครโมโซมร่างกาย และกุ้งชนิด *Palaemon lamarei* มีจำนวนโครโมโซมแบบดิพลอยด์ เท่ากับ 118 และมีคาริโอไทพ์ แบบเมตาเซนตริก 4 คู่ และแบบอะโครเซนตริก 55 คู่ (Vishnoi , 1972)

คาริโอไทพ์ (Karyotype)

คาริโอไทพ์หมายถึง การนำเอาโครโมโซมแต่ละอันจากเซลล์ในระยะเมตาเฟส (โดยอาศัยจากเซลล์ไดเซลล์หนึ่งเท่านั้น) มาเรียงเป็นคู่โฮโมโลกัส (Homologous) เรียงตามลำดับจากใหญ่จนถึงเล็ก การวางโครโมโซมจะวางโดยให้แขนข้างสั้นตั้งขึ้น และนิยมวางโครโมโซมเพศอยู่ที่มุมขวาสุดของภาพ (อมรา,2536) การทำคาริโอไทพ์นิยมทำโดยการใช้ภาพที่ถ่ายจากกล้อง สิ่งที่สำคัญที่สุดในการทำคาริโอไทพ์คือต้องมีรูปภาพโครโมโซมที่ดีชัดเจน การทำคาริโอไทพ์ในพืชและสัตว์มักจะได้รับการเรียงตามความเห็นสวยงามของผู้ศึกษาเอง ปกติจะเรียงจากโครโมโซมใหญ่ที่สุดไปจนถึงเล็กสุด และเรียงภาพโครโมโซมประมาณ 6 คู่ใน 1 แถว โดยมีโครโมโซมเพศปรากฏอยู่ที่มุมภาพล่างด้านขวาสุด โดยเลือกภาพโครโมโซมที่กระจายดีจากเซลล์เมตาเฟสอันใดอันหนึ่ง แล้วตัดโครโมโซมออกเป็นแท่งๆ ใช้กาวทาด้านหลังภาพโครโมโซมหรือใช้เทปใสทับภาพติดโครโมโซมลงไปบนกระดาษรองภาพสีขาว

ชนิดของโครโมโซมในระยะเมตาเฟส

มีการจำแนกโครโมโซมในระยะเมตาเฟส โดยอาศัยตำแหน่งของเซนโตรเมียร์ออกเป็น 4 ชนิดคือ

เมตาเซนตริก (Metacentric) โครโมโซมเมตาเฟสที่มีเซนโตรเมียร์อยู่กึ่งกลางของโครโมโซม มีผลทำให้แขนของโครโมโซมทั้งสองข้างมีความยาวเท่ากัน

สับเมตาเซนตริก (Submetacentric) โครโมโซมที่มีเซนโตรเมียร์ค่อนไปทางด้านใดด้านหนึ่งของปลายโครโมโซม มีผลทำให้แขนทั้งสองข้างของโครโมโซมยาวไม่เท่ากัน จึงมีการกำหนดสัญญลักษณ์ของแขนข้างสั้นคือ "p" และแขนข้างยาว "q"

ทีโลเซนตริก (Telocentric) โครโมโซมเมตาเฟสที่มีเซนโตรเมียร์อยู่ตอนปลายสุดของโครโมโซมมีผลทำให้โครโมโซมมีแขนเพียงข้างเดียว

อะโครเซนตริก (Acrocentric) โครโมโซมเมตาเฟสที่มีเซนโตรเมียร์อยู่เกือบปลายสุดของโครโมโซมซึ่งแขนข้างสั้นมีความสั้นมากจนแทบไม่ปรากฏ

Levan et al., 1964 ได้กำหนดชนิดของโครโมโซมโดยหาอัตราส่วนระหว่างแขนยาวต่อแขนสั้นและความสัมพันธ์ของโครโมโซมแต่ละอันเพื่อนำมาวิเคราะห์คาริโอไทพ์ ความยาวสัมพันธ์คำนวนได้จากสูตรความยาวสัมพันธ์เท่ากับความยาวทั้งหมด (Total length) ของโครโมโซมแต่ละคู่ x 100 ต่อความยาวของแขนทั้งหมดของโครโมโซมที่เป็นส่วนประกอบ ถ้าโครโมโซมมีอัตราส่วนระหว่างแขนยาวต่อแขนสั้น (Long arm / Short arm) อยู่ระหว่าง 1.00 – 1.70 โครโมโซมเป็นแบบเมตาเซนตริก (m) 1.71 – 2.99 โครโมโซมเป็นแบบสับเมตาเซนตริก (sm) 3.00 – 6.99 โครโมโซมเป็นแบบทีโลเซนตริก (t) และถ้าอัตราส่วนระหว่างแขนยาวต่อแขนสั้นมีช่วงความยาวมากกว่า 7.00 โครโมโซมเป็นแบบอะโครเซนตริก (a) จำนวนแขนของโครโมโซม (Arm number หรือ FN) แบ่งออกเป็น 2 พวก คือพวกที่มีโครโมโซมแขนเดียว (Monoarmed group) ประกอบด้วยโครโมโซมแบบอะโครเซนตริกกับแบบทีโลเซนตริก กับอีกพวกหนึ่งคือพวกที่มีโครโมโซม 2 แขน (Biarmed group) ซึ่งประกอบด้วยโครโมโซมแบบเมตาเซนตริกกับสับเมตาเซนตริก

595.5
0264ว
2539
ว.1

ว.57880
สำนักหอสมุด
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

บทที่3
อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์และสารเคมี

1. กุ้งก้ามกรามจำนวน 50 ตัว
2. ตู้กระจกขนาด 18 x 24 x18 ลูกบาศก์นิ้ว จำนวน 10 ตู้
3. กล้องจุลทรรศน์แบบผสมพร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพครบชุด
4. เครื่องพ่นออกซิเจน
5. ภาชนะวางสไลด์ย้อมสี
6. หลอดดูดปลายแหลม
7. กรรไกร ปากคีบ
8. สไลด์ และกระจกปิดสไลด์
9. สวิง
10. เครื่องอุ่นสไลด์ (slide warmmer)
11. โคลชิซิน
12. โพแทสเซี่ยมคลอไรด์
13. กรดอะซิติก
14. แอลกอฮอล์
15. สีกิมซ่า
16. ไดโซเดี่ยมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4)
17. โซเดี่ยมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (NaH_2PO_4)

วิธีการศึกษา

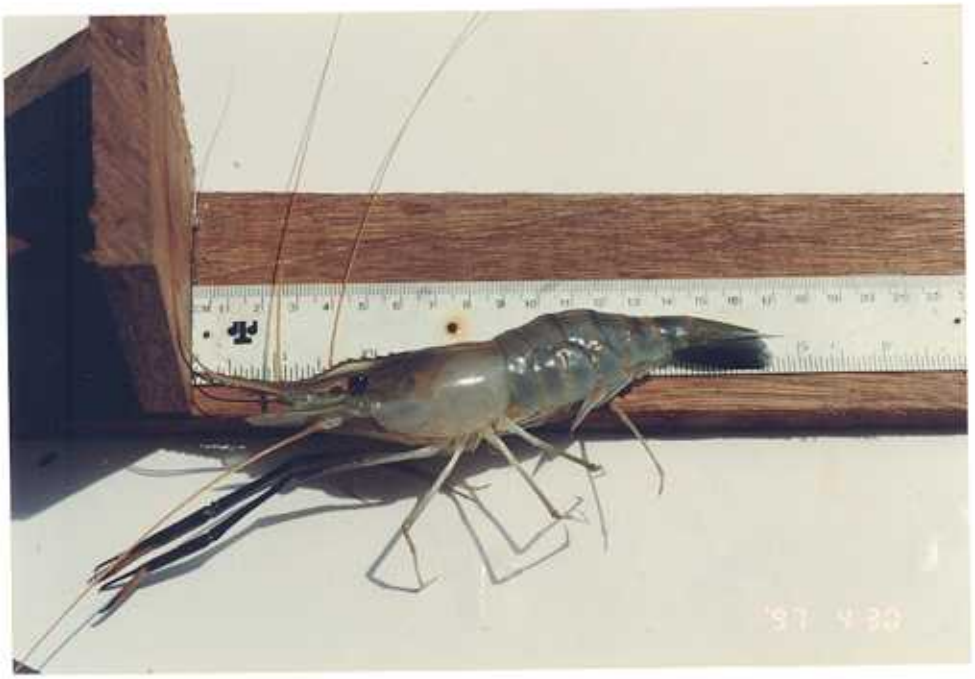
1. รวบรวมกุ้งก้ามกรามขนาดความยาวเฉลี่ย 17.00 เซนติเมตร จากบ่อเลี้ยงจำนวน 50 ตัว
2. นำมาตัดขาเดินคู่ที่ 2 และแยกเลี้ยงในตู้กระจก ตู้ละ 5 ตัว เป็นเวลา 1 สัปดาห์ และให้อาหารวันละ 2 ครั้ง เช้า - เย็น และถ่ายน้ำทุกวัน และให้เครื่องพ่นอากาศตลอดเวลา
3. ตัดส่วนของขาเดินคู่ที่ 2 ที่งอกออกมาใหม่ ซึ่งมีความยาวประมาณ 3 มิลลิเมตร นำมาแช่ในสารละลายโคลชิซิน 0.01 % เป็นเวลา 30 – 60 นาที
   เพื่อให้โครโมโซมหดตัวสั้นและแบ่งตัวอยู่ในระยะเมตาเฟสมากขึ้น เพราะสารชนิดนี้จะไปยับยั้งการทำงานของเส้นใยสปินเดิล (Spindle fiber) ทำให้พบโครโมโซมในระยะเมตาเฟส มากขึ้น ซึ่งง่ายแก่การศึกษา

116216

4. เมื่อแช่ตัวอย่างในสารละลายโคลชิซิน ครบ 30 – 60 นาที แล้วเปลี่ยนมาแช่ในสารละลายโพแตสเซียมคลอไรด์เข้มข้น 0.4 % ซึ่งเป็นไฮโปโทนิค ซูลูชั่น (Hypotonic solution) เป็นเวลา 30 นาที เพื่อทำให้เซลล์พอง
5. นำตัวอย่างมาแช่ในน้ำยา fixative ซึ่งประกอบด้วย กรดอะซิติก 1 ส่วน ผสมกับแอลกอฮอล์ 3 ส่วน ที่เตรียมใหม่ เนื่องจากน้ำยาที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องจะเกิดปฏิกิริยาสร้างเอสเทอร์ขึ้นอย่างรวดเร็ว ทำการแช่ในน้ำยา fixative อย่างน้อย 2 ครั้ง ครั้งละอย่างน้อย 30 นาที เพื่อตรึงโครโมโซมไม่ให้มีการเปลี่ยนแปลง และรักษาสภาพของไซโตพลาสซึม และเนื้อเยื่อให้อยู่ในสภาพสมบูรณ์ไม่เปลี่ยนแปลง
6. เอาเนื้อเยื่อออกจาก fixative วางบนกระดาษกรองเพื่อซับเอา fixative ที่ตกค้างออก
7. หลังซับเอา fixative ออกจากเนื้อเยื่อแล้ว วางเนื้อเยื่อบนสไลด์หลุม หยดกรดอะซิติกความเข้มข้น 50 % จำนวน 2 – 3 หยด เพื่อทำให้เนื้อเยื่อกระจายออกจากกัน ใช้หลอดหยดดูดเข้าออกจะช่วยให้เซลล์กระจายตัวดี
8. ดูดเอาส่วนที่บดละเอียดแล้วไปหยดบนสไลด์ที่สะอาดอุณหภูมิ 40 – 50 °C บน เครื่องอุ่นสไลด์ การเพิ่มอุณหภูมิช่วยให้เซลล์กระจายและเพิ่มจำนวนเซลล์รอบๆ วงมากขึ้น แต่อุณหภูมิสูง (> 50 °C) จะทำลายโครโมโซม การหยดเนื้อเยื่อบนสไลด์ต้องให้บางที่สุดเพื่อที่เซลล์กระจายไม่ทับกันหนาทึบ และหยดเป็นวง สไลด์ละ 2 – 3 วง เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1 เซนติเมตร ทิ้งไว้ประมาณ 1 คืน เพื่อให้เนื้อเยื่อติดสไลด์
9. เมื่อเนื้อเยื่อติดสไลด์ดีแล้ว นำสไลด์มาย้อมสี ด้วยสีกิมซ่า ความเข้มข้น 0.4 % ใน 0.01 M phosphate buffer pH 6.8 ที่เตรียมใหม่ทุกครั้ง นาน 15 – 30 นาที
10. นำสไลด์ขึ้นจากสี ล้างสีที่เกินพอด้วยน้ำกลั่น ทิ้งให้แห้งในอากาศหรือวางในไซลีนนาน 10 นาที เพื่อทำให้เซลล์ใส แล้วนำไปตรวจหาโครโมโซมด้วยกล้องจุลทรรศน์
11. บันทึกภาพโครโมโซมและอัดขยาย เพื่อนำมานับจำนวนโครโมโซมและจัดคาริโอไทพ์และตั้งชื่อชนิดของโครโมโซม โดยใช้ความสัมพันธ์ของอัตราส่วนความยาวแขน (แขนยาว/แขนสั้น) ตามวิธีของลีแวนและคณะ (Levan et. Al., 1964) และเรียงลำดับโครโมโซมตามขนาดที่ลดลง

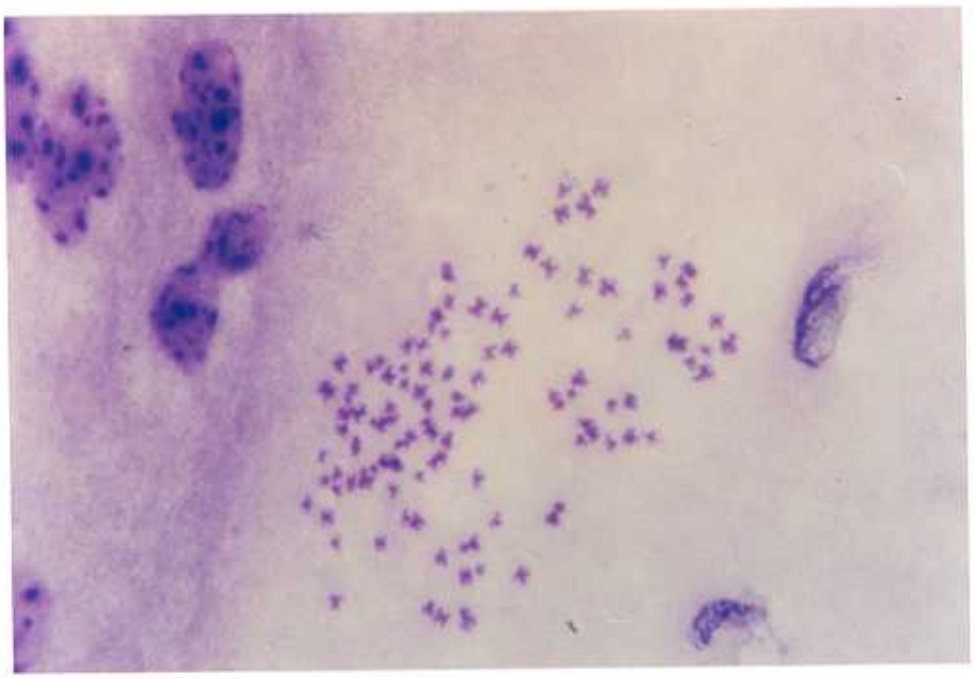
บทที่ 4
ผลการทดลอง

จากการศึกษาจำนวนโครโมโซมของกุ้งก้ามกราม *Macrobrachium rosenbergii* ขนาดความยาวเฉลี่ย 17.00 เซนติเมตร ตามภาพที่ 1 โดยศึกษาจากเนื้อเยื่อที่งอกใหม่บริเวณขาเดินคู่ที่ 2 ตามภาพที่ 2 พบว่ากุ้งก้ามกรามมีความถี่ของโครโมโซมแบบดิพลอยด์ (2n) ในระยะเมตาเฟสของการแบ่งเซลล์แบบไทโตซีส ซึ่งนับได้จากเซลล์แต่ละเซลล์มีความถี่และจำนวนสูงสุดคือ 2n = 118 ตามตารางที่ 1 จากความถี่ของโครโมโซมที่นับได้นี้ สรุปได้ว่ากุ้งก้ามกรามมีจำนวนโครโมโซมแบบดิพลอยด์ (2n) = 118 ตามภาพที่ 3 ส่วนคาริโอไทพ์ประกอบด้วยโครโมโซมแบบ เมตาเซนตริกและสับเมตาเซนตริก 45 คู่ แบบทีโลเซนตริกและอะโครเซนตริก 14 คู่ ดังปรากฏในภาพที่ 4 ส่วนโครโมโซมเพศไม่สามารถแยกได้เนื่องจากมีลักษณะภายนอกเหมือนโครโมโซมร่างกาย

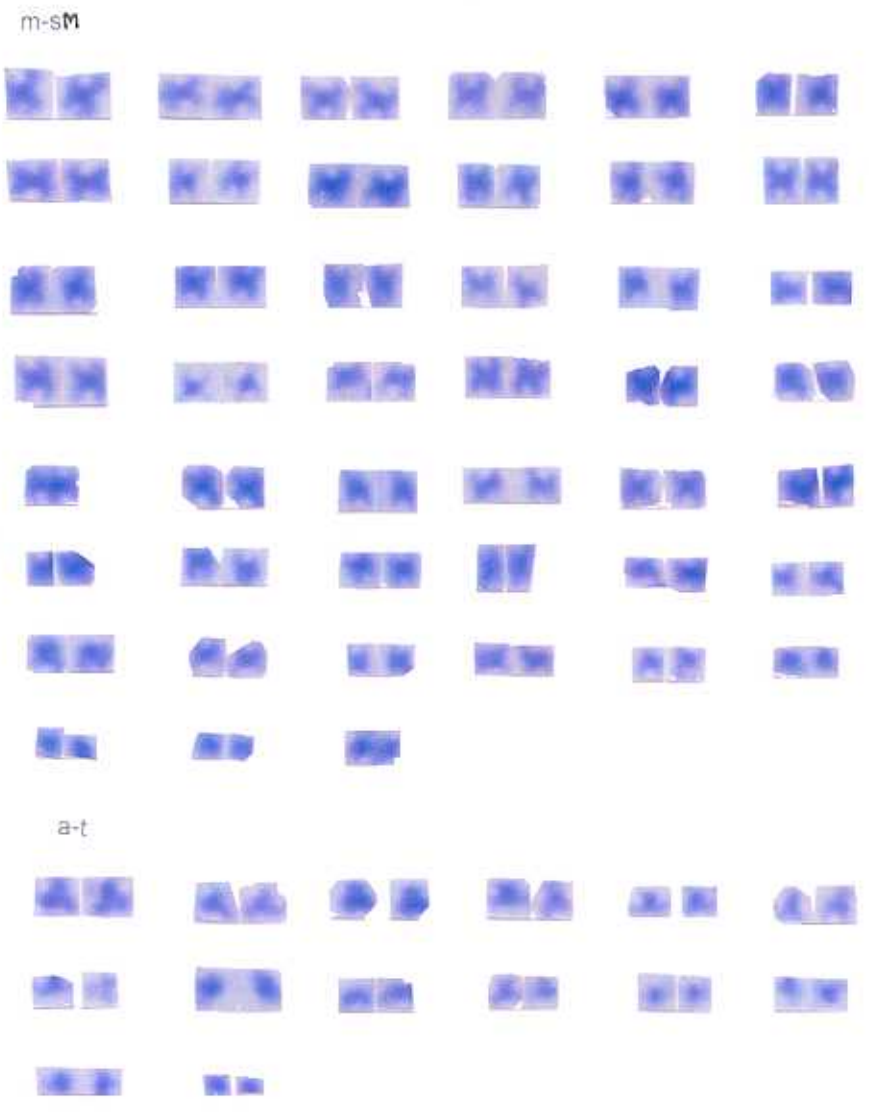


ภาพที่ 1 แสดงลักษณะและขนาดของกุ้งก้ามกรามที่นำมาใช้ในการทดลองหาจำนวนโครโมโซม

ภาพที่ 2 แสดงเนื้อเยื่อที่งอกใหม่จากบริเวณขาเดินคู่ที่ 2 ที่นำมาใช้หาจำนวนโครโมโซม



ภาพที่ 3 แสดงจำนวนโครโมโซมแบบดิพลอยด์ 2n = 118 ของกุ้งก้ามกราม



ภาพที่ 4 แสดงคาริโอไทพ์ของกุ้งก้ามกราม

ตารางที่ 1 แสดงความถี่ในการกระจายของโครโมโซมแบบดิพลอยด์ในระยะเมตาเฟสของการแบ่งเซลล์แบบไมโตซีสของกุ้งก้ามกราม

จำนวนโครโมโซมแบบดิพลอยด์ (2n)	104	106	108	110	112	114	116	118	รวม (เซลล์)
จำนวนความถี่	8	6	4	7	4	3	8	10	50

ตารางที่ 2 แสดงจำนวนโครโมโซมแบบดิพลอยด์ (2n) และคาริโอไทพ์ของกุ้งก้ามกราม

จำนวนโครโมโซม (2n)	โครโมโซมแบบ	
	เมตาเซนตริกและสับเมตาเซนตริก	ทีโลเซนตริกและอะโครเซนตริก
118	90	28

บทที่ 5
อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

ผลการศึกษาโครโมโซมของกุ้งก้ามกรามที่พบในประเทศไทย พบว่ากุ้งก้ามกรามมีจำนวนโครโมโซมแบบดิพลอยด์ (2n) เท่ากับ 118 คาริโอไทพ์ประกอบด้วยโครโมโซมแบบเมตาเซนตริกและซับเมตาเซนตริก 45 คู่ แบบทีโลเซนตริกและอะโครเซนตริก 14 คู่ จำนวนโครโมโซมของกุ้งก้ามกรามมีเท่ากับจำนวนโครโมโซมของกุ้งในครอบครัวเดียวกันชนิด *Palaemon lamarei* ที่มีจำนวนโครโมโซมแบบดิพลอยด์ (2n) เท่ากับ 118 แต่มีคาริโอไทพ์ต่างกันคือ กุ้งชนิด *Palaemon lamarei* มีคาริโอไทพ์แบบเมตาเซนตริก 4 คู่ ซึ่งน้อยกว่าของกุ้งก้ามกราม และแบบอะโครเซนตริกเซนตริก 55 คู่ ซึ่งมากกว่าของกุ้งก้ามกราม และจำนวนโครโมโซมของกุ้งก้ามกรามมีน้อยกว่าของกุ้งในครอบครัวเดียวกันชนิด *Paratelphusa masoniana* ซึ่งมีจำนวนโครโมโซมแบบดิพลอยด์ (2n) เท่ากับ 134 แต่กุ้งชนิดนี้มีจำนวนโครโมโซมบางมากไม่สามารถจัดคาริโอไทพ์ได้ และพบว่ากุ้งก้ามกรามมีจำนวนโครโมโซมมากกว่ากุ้งในสกุลเดียวกันชนิด *Macrobrachium siwalikensis* ซึ่งมีจำนวนโครโมโซมแบบดิพลอยด์ (2n) เท่ากับ 100 และมีคาริโอไทพ์ต่างกันคือ กุ้งชนิด *Macrobrachium siwalikensis* มีคาริโอไทพ์เป็นแบบเมตาเซนตริกทุกโครโมโซม

ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Mittal และ Dhall , 1971 ที่พบว่าจำนวนโครโมโซมของกุ้งในครอบครัว พาลีโมนิดี มีจำนวนโครโมโซมแบบดิพลอยด์อยู่ระหว่าง 100 - 134 ซึ่งมีจำนวนสูงและผลการศึกษานี้สอดคล้องกับการทดลองของ Mittal และ Dhall , 1971 ที่พบว่ากุ้งในครอบครัวเดียวกันอาจมีจำนวนโครโมโซมเท่ากันหรือต่างกันก็ได้ และ Hayashi และ Fujiwara , 1988 พบว่ากุ้งในสกุลเดียวกันอาจมีจำนวนโครโมโซมเท่ากันหรือต่างกันก็ได้เช่นกัน จากการทดลองนี้สรุปได้ว่ากุ้งในครอบครัวเดียวกันหรือในสกุลเดียวกันมีจำนวนโครโมโซมเท่ากันหรือต่างกันก็ได้ แต่กุ้งแต่ละชนิดจะมีแบบของโครโมโซมหรือคาริโอไทพ์ต่างกัน เพราะฉะนั้นการจัดคาริโอไทพ์ของกุ้งสามารถนำมาใช้ในจำแนกชนิดของกุ้งได้อีกวิธีหนึ่ง

ข้อเสนอแนะ

1. ควรเก็บตัวอย่างจากเนื้อเยื่อบริเวณอวัยวะสืบพันธุ์เพื่อที่จะหาจำนวนโครโมโซมแบบชุดเดียวเพื่อยืนยันจำนวนโครโมโซมที่แน่นอน
2. ควรศึกษาเวลาในการเก็บตัวอย่างที่เหมาะสม เพื่อที่จะหาว่าเวลาใดเหมาะสำหรับเก็บตัวอย่าง หรือระยะเวลาใดที่การแบ่งเซลล์กำลังอยู่ในอยู่ในระยะเมตาเฟสมากที่สุด

บรรณานุกรม

กรมประมง. 2530. ภาพปลาและสัตว์น้ำของไทย. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 325 หน้า

กรมประมง . 2538 คู่มือการเพาะและอนุบาลกุ้งก้ามกราม. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 19 หน้า

ชมรมพัฒนาการประมง . 2521 . กุ้งก้ามกราม. วิทยาสารประมงฉบับการเพาะเลี้ยงกุ้งในเมืองไทย. วิทยาสารประมงประจำปี 2520 – 21 คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. หน้า 50

ธวัช คอนสกุล และ วิเชียร มากคุ่น . 2535 . การศึกษาโครโมโซมของปลาหลดจุด ปลาหลดภูเขา ปลาหลดและปลากระทิงดำ ที่พบในประเทศไทย . ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ บางเขน กรุงเทพ ฯ . 25 หน้า.

ฝ่ายสถิติและสารสนเทศการประมง. 2539. สถิติการประมงแห่งประเทศไทย ปี พ.ศ. 2537 . กองเศรษฐกิจการประมง, กรมประมง, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 80 หน้า.

สุรินทร์ มัจฉาชีพ และ สมสุข มัจฉาชีพ. 2533. สารานุกรมพืชสัตว์ เล่ม 1. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ บางแสน. 131 หน้า

สถานีพัฒนาการเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกราม. 2535. การเลี้ยงกุ้งก้ามกรามในคอกบริเวณทะเลสาบสงขลา. กรมประมง , กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 7 หน้า.

อนันต์ ตันสุตะพานิช. 2523. พัฒนาวิธีการเพาะและอนุบาลกุ้งก้ามกรามวัยอ่อนโดยใช้เกลือสินเธาว์ เกลือสมุทร และน้ำเกลือจากภาคอิสาน. รายงานประจำปี 2520 – 2530. สถานีประมงน้ำกร่อยจังหวัดฉะเชิงเทรา, กองประมงน้ำกร่อย กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

อมรา คัมภิรานนท์ . 2536 . พันธุศาสตร์ของเซลล์ . คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน กรุงเทพ ฯ. 322 หน้า..

Levan , A., Fredga , K., and Sandberg , A.A. 1964. "Nomenclature for centromeric position on Chromosome" . Hereditas. 52 : 201 – 220.

Hayashi , K., and Fujiwara. Y. 1988. A new method for obtaining metaphase chromosomes from the regeneration blastema of *Penaeus (Marsupenaeus) japonicus*. Nippon Suisan Gakkaishi , 54 : 1563 – 1565.

Mittal , O. P. and Dhall , U. 1971 . Chromosome studies in three species of freshwater Decapods (crustaces). Cytologia. 36 : 633 – 638.

Murofushi , M. and Deguchi , Y ., 1990 . Karyotype evolution in Decapoda , Crustacea. In: R. Hirano and I. Hanyu (Editors). Proc . Second Asian Fisheries Forum. Asian Fisheries Society , Tokyo , Japan , pp . 549 – 553.

Vishnoi, D. N., 1972. Studies on the Chromosomes of some Indian crustacea. Cytologia, 37 : 43 – 51.

ภาคผนวก

การเตรียมน้ำยา

1. การเตรียมน้ำยา pretreatment โดยใช้สารละลาย colchicine 0.01 % ใช้ colchicine 0.01 กรัมละลายในน้ำ 100 มิลลิลิตร
2. เตรียม hypotonic treatment 0.4 % ใช้โปแตสเซียมคลอไรด์ 0.4 กรัม ละลายน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร
3. เตรียม fixative solution ใช้ glacial acetic acid 1 ส่วน ผสม absolute methanol 3 ส่วน
4. เตรียมสีกิมซ่า (giemsa) 5 % ใช้สีกิมซ่า 5 มิลลิลิตร เติม phosphate buffer ให้ครบ 100 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ 6.8

การเตรียม **phosphate buffer**

Na_2HPO_4 2.75 กรัม เติมน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร

NaH_2PO_4 2.84 กรัม เติมน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร

ใช้อัตราส่วน $Na_2HPO_4 : NaH_2PO_4 = 1 : 1$ เป็นสารละลาย phosphate buffer