

### บทที่ 3

#### อุปกรณ์และวิธีดำเนินการ

##### การจัดเตรียมตัวอย่าง

#### 1. อุปกรณ์ในการเก็บตัวอย่าง

- 1.1 อุปกรณ์ดำน้ำ
- 1.2 กระชัง
- 1.3 ตู้กระจก
- 1.4 เครื่องให้อากาศ

#### 2. สถานที่เก็บตัวอย่าง

##### 2.1 ถุ่มน้ำนม

แม่น้ำนมอยู่ทางภาคเหนือของประเทศไทย มีต้นกำเนิดอยู่ในคอซงูนอวม ทิวเขาผีปันน้ำ ในเขตของอำเภอปาง และอำเภอเชียงม่วน จ. พะเยา แล้วไหลลงมาทางทิศตะวันตกเฉียงใต้ เมื่อเข้าเขต จ. แพร่ มีถ้ำน้ำยาว ซึ่งเป็นถ้ำน้ำสาขาที่สำคัญไหลมาบรรจบ จากนั้นไหลผ่านที่ราบ จ. แพร่ ลงไปจนถึง จ. สุโขทัย ช่วงนี้มีความลาดเทน้อยลง และแม่น้ำนมจะไหลเป็นแนวนานคู่กับแม่น้ำน่าน ผ่าน จ. สุโขทัย จ. พิษณุโลก เข้าสู่ จ. พิจิตร และไหลลงมาบรรจบกับแม่น้ำน่านที่ อ. ชุมแสง จ. นครสวรรค์ รวมความยาวจากต้นน้ำถึงจุดที่ไหลลงแม่น้ำน่าน ยาวประมาณ 735 กิโลเมตร ที่ตั้งของถุ่มน้ำนม ทิศเหนือติดกับถุ่มน้ำโจง ทิศใต้ติดกับถุ่มน้ำปึง และถุ่มน้ำเจ้าพระยา ทิศตะวันออกติดกับถุ่มน้ำน่าน ทิศตะวันตกติดกับถุ่มน้ำวัง และถุ่มน้ำปึง

สภาพภูมิประเทศ ตอนบนเป็นเทือกเขาและมีที่ราบหุบเขา พื้นที่ถุ่มน้ำนมมีที่ราบถุ่มในเขตอำเภอสอง อำเภอเมืองแพร่ และอำเภอเด่นชัย สภาพภูมิประเทศตอนล่างของจังหวัดแพร่ และตอนบนของ จ. สุโขทัย เป็นที่ราบสูงและพื้นที่เทือกเขา ที่ราบถุ่มตอนล่างคือ พื้นที่ในเขตตอนล่างของ

จ. สุโขทัย จ. พิษณุโลก จ. พิจิตร และ จ. นครสวรรค์ ที่แม่น้ำยมไหลไปบรรจบกับแม่น้ำน่าน ซึ่งเป็นบริเวณกว้างใหญ่และเป็นแหล่งที่มีความอุดมสมบูรณ์

สภาพภูมิอากาศของพื้นที่ลุ่มแม่น้ำยม อยู่ภายใต้อิทธิพลจากลมมรสุมตะวันตกถึงตะวันตกเฉียงใต้ และลมมรสุมตะวันออกเฉียงเหนือ มีปริมาณน้ำฝนรายปีเฉลี่ยทั้งลุ่มน้ำประมาณ 1,118.4 มิลลิเมตร อุณหภูมิรายเดือนเฉลี่ยทั้งปี มีค่าประมาณ 26.5 องศาเซลเซียส และความชื้นสัมพัทธ์เฉลี่ยทั้งปีประมาณ 72.0 เปอร์เซ็นต์

คุณภาพน้ำ แม่น้ำยมตอนเหนือตัวเมือง จ. แพร่ น้ำมีคุณภาพดีเหมาะแก่การใช้ประโยชน์ทางด้านอุปโภคบริโภค คุณภาพน้ำของแม่น้ำยมตอนกลาง และตอนล่าง ได้รับผลกระทบจากการระบายน้ำเสียจากชุมชน แต่ยังไม่ถึงขั้นรุนแรง

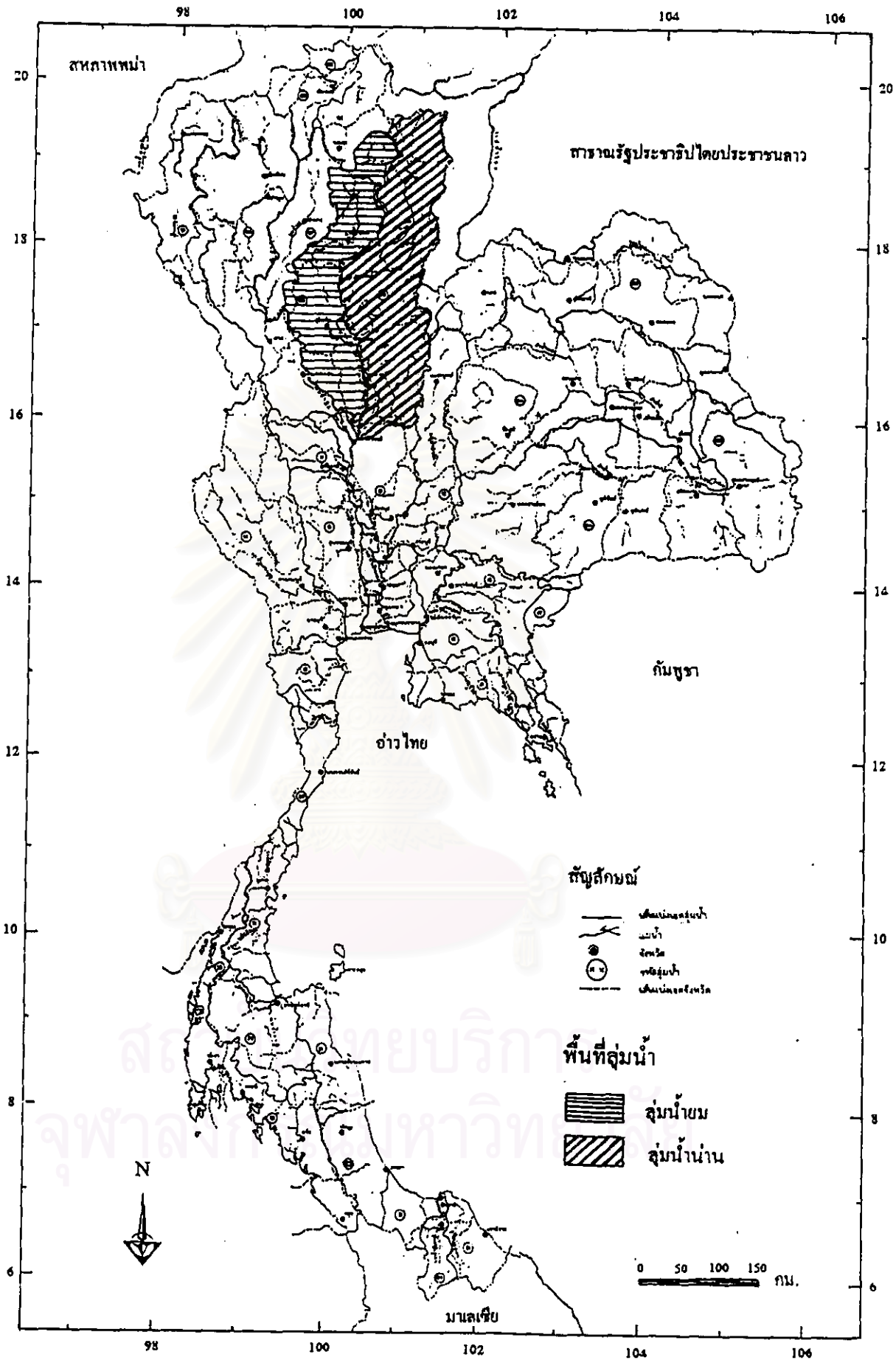
## 2.2 ลุ่มน้ำน่าน

แม่น้ำน่าน มีต้นกำเนิดจากคอกขลุ่ย ในทิวเขาหลวงพระบาง อ. หุ่นช้าง อ. เชียงกลาง และ อ. ปัว จ. น่าน ไหลผ่านพื้นที่ราบกว้างใหญ่อันอุดมสมบูรณ์ของภาคเหนือ ประกอบด้วยแม่น้ำสาขาหลักคือ แม่น้ำน่านตอนบน และลำน้ำว้า ซึ่งเป็นแม่น้ำสาขาใหญ่ ไหลมาบรรจบกับแม่น้ำน่านที่ อ. เวียงสา จากนั้นไหลผ่าน จ. อุตรดิตถ์ มีลำน้ำสาขาใหญ่คือ ลำน้ำป่าด ไหลมาบรรจบ และเมื่อไหลเข้าสู่ จ. พิษณุโลก ผ่าน อ. พรหมพิราม มีแม่น้ำแควน้อย ซึ่งเป็นลำน้ำสาขาใหญ่ที่สุดไหลมาบรรจบอีกสายหนึ่ง จากนั้นไหลเข้าสู่ จ. พิจิตร มีแม่น้ำวังทอง ซึ่งเป็นลำน้ำสาขาใหญ่ไหลมารวม จากนั้นแม่น้ำน่านไหลเข้าสู่ จ. นครสวรรค์ โดยมีแม่น้ำยมไหลเข้ามาตั้งแต่ที่ จ. พิษณุโลก และได้บรรจบกันที่ อ. ชุมแสง จ. นครสวรรค์ จากนั้นแม่น้ำน่านจึงไหลผ่านบึงบอระเพ็ด ก่อนไปบรรจบร่วมกับแม่น้ำปิง ที่ ค. แควใหญ่ อ. เมือง จ. นครสวรรค์ รวมมีความยาว 770 กิโลเมตร

ที่ตั้งลุ่มน้ำน่าน อาณาเขตทางทิศเหนือติดกับลุ่มน้ำโขง ทิศใต้ติดกับลุ่มแม่น้ำเจ้าพระยา ทิศตะวันตกติดกับลุ่มน้ำแม่ป๋ายม ทิศตะวันออกติดกับลุ่มน้ำแม่ป๋ายโขง และลุ่มแม่น้ำป่าสัก

สภาพภูมิประเทศ ตอนบนเป็นเทือกเขาและมีที่ราบในหุบเขา มีพื้นที่ลุ่มแม่น้ำน่านตอนบน และตอนล่างขนาดใหญ่ เป็นพื้นที่ จ. อุตรดิตถ์

สภาพภูมิอากาศ ในพื้นที่ลุ่มน้ำแม่น้ำน่าน อยู่ภายใต้อิทธิพลจากลมมรสุมตะวันตกเฉียงใต้ และลมมรสุมตะวันออกเฉียงเหนือ อุณหภูมิรายเดือนเฉลี่ยทั้งปีมีค่าประมาณ 26.4 องศาเซลเซียส ปริมาณน้ำฝนเฉลี่ยทั้งปีของลุ่มน้ำประมาณ 1,240.3 มิลลิเมตร และค่าความชื้นสัมพัทธ์เฉลี่ยทั้งปีประมาณ 72.0 เปอร์เซ็นต์



รูปที่ 2 แผนที่แสดงบริเวณพื้นที่ของลุ่มน้ำยมและลุ่มน้ำน่าน

คุณภาพน้ำ แม่น้ำน่านตอนบน บริเวณตัวเมือง จ. น่าน มีคุณภาพน้ำเหมาะสมสำหรับผลิตน้ำประปา ส่วนในคอนล่างของเทศบาลเมืองน่าน ได้รับผลกระทบโดยตรงจากการระบายน้ำเสียของชุมชน คุณภาพน้ำด้านท้ายเขื่อนสิริกิติ์ มีคุณภาพน้ำเหมาะแก่การใช้ประโยชน์ทางด้านการประมง การอุปโภค ส่วนในจังหวัดอื่นๆ ได้รับผลกระทบจากการระบายน้ำเสียของชุมชนใกล้เคียงเช่นกัน

จะเห็นได้ว่ากลุ่มน้ำยมและกลุ่มน้ำน่านเป็นบริเวณที่มีความอุดมสมบูรณ์ มีความสำคัญต่อชีวิตความเป็นอยู่ของประชากร ตลอดจนถึงสภาพทางเศรษฐกิจ ทั้งนี้บริเวณพื้นที่ของกลุ่มน้ำทั้งสอง แสดงคังรูปที่ 2

### 3. ตัวอย่างหอยกาบน้ำจืด

หอยกาบน้ำจืดที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ได้เลือกศึกษาเฉพาะหอยกาบน้ำจืดในวงศ์ *Amblemidae* ที่สำรวจพบในบริเวณกลุ่มน้ำยมและกลุ่มน้ำน่าน ในช่วงเดือนพฤศจิกายน 2537 ถึงเดือนธันวาคม 2539 จำนวน 4 สปีชีส์ 5 สปีชีส์ย่อย ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 สปีชีส์ของหอยกาบน้ำจืดและจำนวนหอยแต่ละสปีชีส์ที่ใช้ในการศึกษา

สปีชีส์ของหอยกาบน้ำจืด	จำนวนหอยที่ใช้ศึกษา (ตัว)
<i>Pilsbryoconcha exilis exilis</i>	11
<i>Pseudodon vondembuschianus ellipticus</i>	13
<i>Ps. vondembuschianus chaperi</i>	5
<i>Hyriopsis (Limnoscapha) desowitzi</i>	7
<i>H. (Limnoscapha) myersiana</i>	7
<i>Chamberlainia hainesiana</i>	4
<i>Uniandra contradens rustica</i>	9
<i>U. contradens tumidula</i>	9
<i>Physunio superbus</i>	9

#### 4. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการศึกษาคริโอโทปี

##### 4.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

- เวอร์เนีย
- กระจกสไลด์
- คิวเคอร์
- เครื่องมือผ่าตัด
- ขวดสำหรับคองตัวอย่าง

##### 4.2 สารเคมี

- 0.05% colchicine
- 0.069 M KCl
- carnoy solution (absolute methyl alcohol : glacial acetic acid = 3:1)
- 60% acetic acid
- 20% Giemsa (stock Geimsa : buffer = 2 : 8)
- Phosphate buffer pH 6.8
- 10% formalin

##### 4.3 อุปกรณ์เกี่ยวกับการถ่ายภาพโครโมโซม

- กล้องจุลทรรศน์ติดกล้องถ่ายรูป
- ฟิล์มสไลด์ Fuji Provia 100, ฟิล์มที Kodak Ektapress Plus 100,

## วิธีดำเนินการ

### 1. การสำรวจและเก็บตัวอย่างหอยกาบน้ำจืด

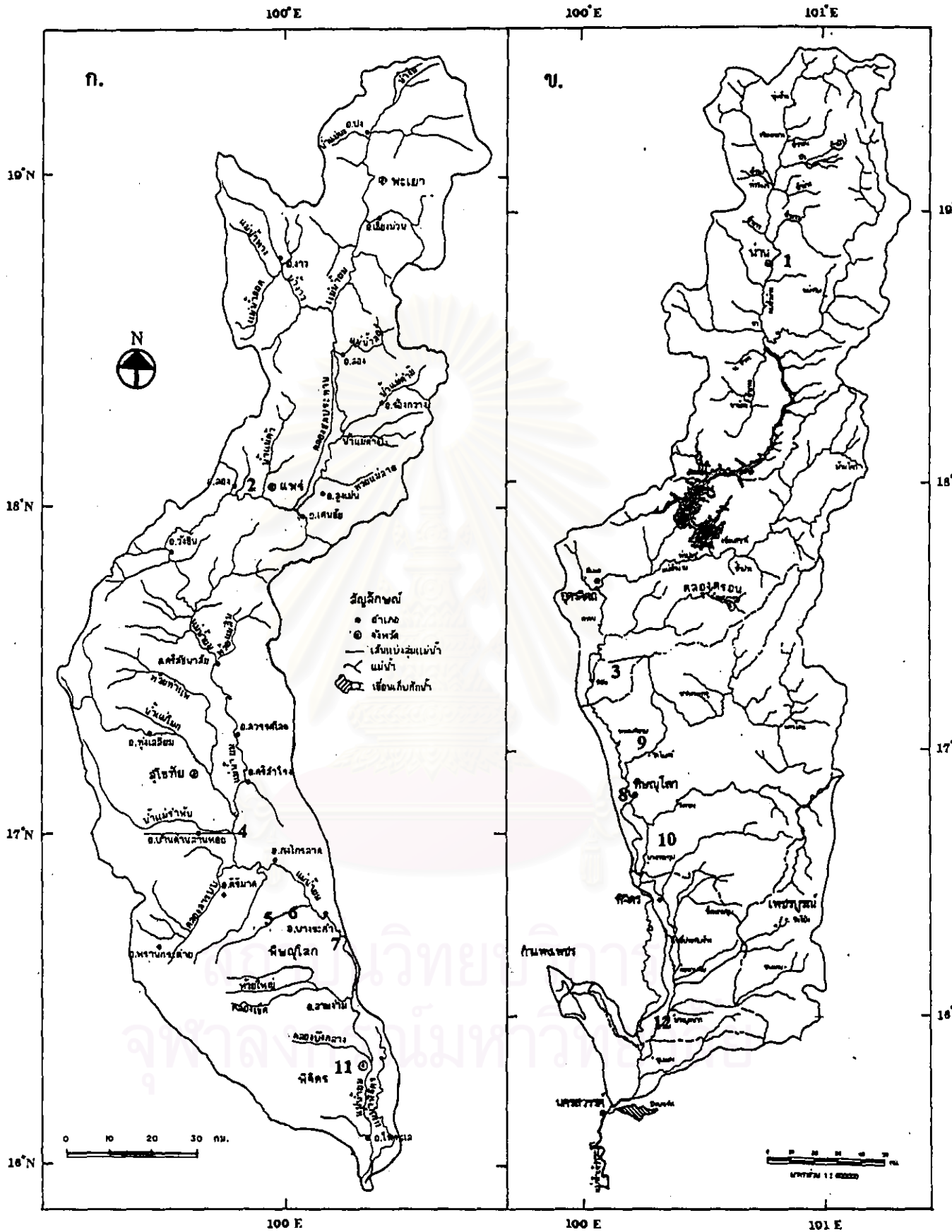
บริเวณที่ทำการสำรวจและเก็บตัวอย่าง อยู่ในบริเวณกลุ่มน้ำยมและน่าน โดยมีสถานที่ทำการเก็บตัวอย่างรวมทั้งสิ้น 12 สถานที่ ซึ่งได้แสดงไว้ในรูปที่ 3 ดังต่อไปนี้

สถานที่ 1	กลุ่มน้ำน่าน		อ. เมือง	จ. น่าน
สถานที่ 2	กลุ่มน้ำยม	แก่งเสือเต้น	อ. สอง	จ.แพร่
สถานที่ 3	กลุ่มน้ำน่าน		อ. พิชัย	จ. อุตรดิตถ์
สถานที่ 4	กลุ่มน้ำยม	ค. บ้านสวน	อ. เมือง	จ. สุโขทัย
สถานที่ 5	กลุ่มน้ำยม	ค. วังเป็ด	อ. บางระกำ	จ. พิษณุโลก
สถานที่ 6	กลุ่มน้ำยม	ค. วังอิทก	อ. บางระกำ	จ. พิษณุโลก
สถานที่ 7	กลุ่มน้ำยม	ค. บางบัว	อ. บางระกำ	จ. พิษณุโลก
สถานที่ 8	กลุ่มน้ำน่าน	ค. วัดคต	อ. เมือง	จ. พิษณุโลก
สถานที่ 9	กลุ่มน้ำน่าน	ค. ท่างาม	อ. วัดโบสถ์	จ. พิษณุโลก
สถานที่ 10	กลุ่มน้ำน่าน	ค. บางกระทุ่ม	อ. บางกระทุ่ม	จ. พิษณุโลก
สถานที่ 11	กลุ่มน้ำยม	ค. ท่าพ่อ	อ. บางมูลนาก	จ. พิจิตร
สถานที่ 12	กลุ่มน้ำน่าน	ค. ท่าพ่อ	อ. บางมูลนาก	จ. พิจิตร

นำตัวอย่างหอยกาบน้ำจืดกลับมาที่ห้องปฏิบัติการชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เก็บตัวอย่างไว้ในตู้กระจกซึ่งให้ออกซิเจนตลอดเวลา ทำการจัดเตรียมตัวอย่างหอยโดยเร็วที่สุด โดยเลือกใช้หอยที่มีขนาดเล็กและอายุน้อย เนื่องจากมีอัตราการแบ่งเซลล์สูง เพื่อความสมบูรณ์ของตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์โครโมโซม

### 2. ขั้นตอนการตรวจสอบชื่อวิทยาศาสตร์

ตัวอย่างหอยกาบน้ำจืดที่เก็บได้และใช้ในการศึกษา โดยนำส่วนเปลือกของหอยที่ใช้เตรียมโครโมโซมมาล้างให้สะอาด และเก็บรักษาไว้ ประกอบด้วยตัวอย่างหอยที่ได้จากการเก็บรักษาใน 10% formalin จำนวน 1-2 ตัว ในแต่ละชนิด ทิ้งไว้ 3 วัน จากนั้นเปลี่ยน 10% formalin



รูปที่ 3 แผนที่แสดงสถานีเก็บตัวอย่างหอยกาบน้ำจืดที่ใช้ในการศึกษา

ก. ลุ่มน้ำยม ข. ลุ่มน้ำ่าน



เป็น 70% ethyl alcohol การศึกษาโดยนำตัวอย่างหอยคั้งกล่าวมาทำการตรวจสอบชื่อวิทยาศาสตร์ ร่วมกับรองศาสตราจารย์ ดร. สมศักดิ์ ปัญหา โดยใช้เอกสารของ Brandt (1974)

### 3. ขั้นตอนการศึกษาคริโอโทปี

#### 3.1 การเตรียมโครโมโซมในระยะเมตาเฟส

ทำการเตรียมโครโมโซม โดยคัดแปลงจากวิธีการของ Okamoto (1986); Ieyama *et al.* (1994) และ Insua *et al.* (1994)

3.1.1 Pretreatment : โดยนำหอยแช่ลงใน 0.05% โคลชิซิน และให้ ออกซิเจนเบาๆ นาน 6-8 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์ที่กำลังแบ่งตัวหยุดอยู่ในระยะเมตาเฟส

3.1.2 Hypotonic treatment : นำตัวอย่างหอยมาล้างหลายๆ ครั้ง ค่อยจาก นั้นนำหอยแล้วตัดส่วนเหงือกออกมา แช่ใน 0.069% KCl ซึ่งเป็น hypotonic solution นาน 45 นาที เพื่อให้เซลล์บวม

3.1.3 Fixation : ใช้หลอดดูด hypotonic solution ออกให้หมด ทำการเติม carnoy solution ซึ่งเตรียมใหม่ๆ ลงไป ซึ่งจะทำหน้าที่เป็น fixative เปลี่ยน carnoy solution 3-4 ครั้ง ทุกๆ 20 นาที โดยระหว่างทำ fixation เก็บขวดตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส เพื่อเป็นการรักษาสภาพโดยไม่ทำลายส่วนประกอบของเซลล์

3.1.4 Air dried slide : ตัดชิ้นเหงือกมาบดให้ละเอียดและแช่ใน 60% acetic acid นาน 20 นาที ใช้หลอดหยดดูดส่วน supernatant มาหยดลงบนสไลด์ที่วางบน warming plate อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

3.1.5 Staining : ทำการย้อมสไลด์ด้วยสี 20% Giemsa ที่เตรียมใหม่ๆ นาน 30 นาที ล้างสไลด์ด้วยน้ำกลั่น ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

3.1.6 นำสไลด์ที่ได้ไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ เพื่อทำการนับ จำนวนและวิเคราะห์โครโมโซม เพื่อจัดเรียงคริโอโทปี

#### 3.2 การถ่ายภาพโครโมโซม

ใช้กล้องถ่ายภาพ Olympus BX50 โดยใช้ objective ที่มีขนาดกำลังขยาย x 100 และ eye piece ของกล้องถ่ายภาพกำลังขยาย x 3.5 ถ่ายด้วยฟิล์มสไลด์ โดยเลือกถ่ายภาพกลุ่มโครโมโซมที่กระจายดี และมีจำนวนมากที่สุด ประมาณ 100 เซลล์ต่อหอยแต่ละสปีชีส์ เพื่อศึกษา จำนวนโครโมโซม และถ่ายด้วยฟิล์มสี โดยเลือกกลุ่มที่มองเห็นชัดเจนที่สุด จำนวน 10 เซลล์ ใน



หอยแต่ละสปีชีส์ เพื่อศึกษาลักษณะโครโมโซมและคาริโอไทป์ ยกเว้น *Chamberlainia hainesiana* เลือกกกลุ่มโครโมโซม จำนวน 15 เซลล์ เนื่องจากมีตัวอย่างหอย 4 ตัว

### 3.3 การหาจำนวนโครโมโซมของหอยแต่ละสปีชีส์ที่ศึกษา

นำฟิล์มสไลด์ที่ถ่ายภาพโครโมโซมไปล้าง และนำมาฉายด้วยเครื่องฉายสไลด์ นับจำนวนโครโมโซมจากภาพที่ขยาย ทำการเปรียบเทียบเป็นเปอร์เซ็นต์ โดยถือตามจำนวนโครโมโซมที่มีเปอร์เซ็นต์สูงสุดในแต่ละสปีชีส์เป็นสำคัญ

### 3.4 การจัดการคาริโอไทป์

นำฟิล์มสไลด์ที่ได้ถ่ายภาพโครโมโซมที่กระจายดีและชัดเจนที่สุดในแต่ละสปีชีส์ มาสปีชีส์ละ 10 เซลล์ นำไปอัดเป็นภาพขยายขนาด 4 x 6 นิ้ว (โดยเทียบกับขนาด stage micrometer) ทำการวัดความยาวของแขนข้างสั้น (Ls) และความยาวของแขนข้างยาว (Li) โดยวัดจากตำแหน่งเซนโตรเมียร์ (centromere) ไปยังปลายโครโมโซมทั้ง 2 ด้าน ด้วยคิไวเคอร์ แล้วนำมาวัดเทียบค่าที่ถูกต้องกับเวอร์เนีย คำนวณค่า Centromeric index (C. I.) =  $(Ls/Li) \times 100$  (โดยที่  $L_t = \text{total length}$ ) (Lavan *et al*, 1964) เรียงลำดับตามความยาว และแบ่งชนิดโครโมโซม (การแบ่งชนิดโครโมโซมจากค่า C.I. ดังตารางที่ 3) แล้วจับคู่โครโมโซมโดยอาศัยค่า C. I. ประกอบกับลักษณะที่คล้ายกันมากที่สุด จัดเรียงคาริโอไทป์โดยเรียงลำดับจากโครโมโซมคู่ที่ยาวที่สุดไปหาคู่ที่สั้นที่สุด

ตารางที่ 3 การแยกชนิดโครโมโซมหอยกานน้ำจืด โดยใช้ค่า Centromeric index (C.I.)

ชนิดโครโมโซม	สัญลักษณ์	ช่วง Centromeric Index
Metacentric	m	46-49
Submetacentric	sm	26-45
Subtelocentric	st	15-25
Telocentric	t	<15

ตามลำดับ คำนวณความสัมพันธ์ของคู่โครโมโซม โดยการหาค่า haploid length, haploid complement และค่า Relative length โดย

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

haploid length = ผลรวมของค่าความยาวเฉลี่ยของคู่โครโมโซมแต่ละเซต

haploid complement =  $\frac{\text{ผลรวมของค่า haploid length จาก 10 เซต ในหอยแต่ละสปีชีส์}}{\text{จำนวนเซต}}$

Relative length =  $\frac{\text{ค่าความยาวเฉลี่ยของคู่แขนโครโมโซมจาก 10 เซต} \times 100}{\text{haploid complement}}$

นำค่า Relative length ของหอยแต่ละสปีชีส์มาสร้างอิดิโอแกรม โดยเรียงตามลำดับความยาวเฉลี่ยของคู่โครโมโซม และค่า Centromeric index

ขนาดของโครโมโซม แบ่งเป็น 2 กลุ่ม ตามวิธีของ Ullerich (1966) คือโครโมโซมขนาดใหญ่และขนาดเล็ก โดยโครโมโซมขนาดใหญ่ มีขนาดความยาวเกินครึ่งหนึ่งของโครโมโซมคู่ที่ยาวที่สุด ส่วนที่เหลือจัดเป็นโครโมโซมขนาดเล็ก

### 3.5 การเปรียบเทียบคาริโอไทป์ของหอยแต่ละสปีชีส์

#### 3.5.1 จำนวนโครโมโซม (diploid number)

#### 3.5.2 ชนิดโครโมโซม (chromosome type)

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย