บทที่ 3

วิธีดำเนินการทดลอง

1. การเพาะพันธุ์ปลากัดไทย

1.1 คัดปลาทั้งตัวผู้และตัวเมียที่มีอายุมากพอที่จะผสมพันธุ์ได้ คือประมาณ 5 – 6 เดือนขึ้นไป เลี้ยงในขวดกลมตั้งไว้ใกล้กันเป็นคู่ ๆ ใช้กระดาษกั้นระหว่างขวด แต่ให้โอกาสให้เห็นเป็นครั้งคราว ระยะเวลาที่เทียบไว้ประมาณ 2 – 4 สัปดาห์ ทั้งนี้ก็เพื่อกระตุ้นให้ปลาพร้อมที่จะผสมพันธุ์ ระหว่างนี้ควรให้อาหารเพียงพอ อาหารที่จะใช้เลี้ยงปลาคือ ลูกน้ำหรือหนอนแดง ไม่ควรให้อาหารปลามากจนเหลือ เพราะอาจทำให้น้ำเสีย เป็นสาเหตุให้ปลาเป็นโรคได้ง่าย ปลาที่ใช้เลี้ยงในขวดต้องใช้สายยางดูดอุจจาระออกและเติมน้ำใหม่ทุก ๆ 5 วัน

1.2 เตรียมตู้กระจกสำหรับเพาะพันธุ์ปลา ใส่น้ำประปาที่ตกตะกอนแล้วลงในตู้กระจกให้มีระดับน้ำสูงประมาณ 6 นิ้ว ใส่สาหร่ายหางกระรอกและผักบุ้งเพื่อให้ปลาใช้ค้ำจุนหวอดที่ตัวผู้สร้างขึ้น อุณหภูมิของน้ำระหว่าง 23.5 – 29 °ซ. pH น้ำระหว่าง 6.8 – 7.2

1.3 ช้อนตัวปลาทั้งตัวผู้และตัวเมียที่ได้ตั้งเทียบไว้และพร้อมจะผสมพันธุ์ใส่ลงในตู้สำหรับเพาะพันธุ์ในเวลาประมาณ 19.00 น. ปลาตัวเมียซึ่งพร้อมจะผสมพันธุ์ สังเกตได้จากบริเวณท้องจะมีสีจางกว่าบริเวณอื่นของลำตัว gentital papilla ตรง gentital poreจะมีขนาดใหญ่สีขาวแกมเหลือง ส่วนตัวผู้จะก่อหวอดที่ผิวน้ำ ในระยะแรกตัวผู้จะไล่ตัวเมียไปรอบ ๆ ตู้เพาะพันธุ์ ตัวเมียบางตัวถูกตัวผู้กัดจนบาดเจ็บมากก่อนจะยอมให้ตัวผู้รัด เพื่อให้ปลาทั้งคู่นั้นเคยกับที่อยู่ใหม่ และให้ตัวเมียสามารถผลางตัวจากตัวผู้ ควรใส่ปลาในเวลากลางคืน เมื่อเริ่มผสมพันธุ์ ปลาตัวเมียจะลอยตัวขนานกับผิวน้ำใต้หวอดที่ตัวผู้สร้างไว้ ตัวผู้จะงอตัวรัดตัวเมียตรงบริเวณระดับ gentital pore ปล่อยน้ำเชื้อออกมาผสมกับไข่ พอปลาจะว่ายน้ำไปอมไข่ที่ผสมแล้วและกำลังจมลงสู่ก้นอ่าง นำไปพ่นไว้

ในฟองหวอด เมื่อแม่ปลาหนีไปอยู่ที่มุมอ่างเป็นอันสิ้นสุดการผสมพันธุ์ ต้องช้อนแม่ปลาออก ถ้าทิ้งไว้อาจถูกพ่อปลากัดตายได้ ส่วนพ่อปลาจะคอยดูแลไข่ที่ได้รับการผสมจนฟักออกเป็นตัว และจนกระทั่งลูกปลาว่ายน้ำแข็งแรง

1.4 การให้อาหารลูกปลา ในระยะ 2 – 3 วันแรกลูกปลายังไม่กินอาหาร เพราะยังใช้อาหารจากไข่แดง ชุมสาย (2517) รายงานว่าไข่แดงใช้หมดในวันที่ 8 หลังจากที่มีการผสมพันธุ์ ลูกปลาเริ่มกินอาหารได้เล็กน้อยเมื่ออายุประมาณ 5 วัน อาหารลูกปลาได้แก่ protozoa ดังนั้นเพื่อให้ลูกปลามีอาหารกินตลอดเวลา หลังจากปลาผสมพันธุ์วันแรกและวันที่สองขยี้ใบผักบุ้ง 2 – 3 ใบ ใส่ในตู้เพาะพันธุ์ปลา หลังจากนั้น 4 – 5 วันจะพบมี protozoa ในตู้ปลามากพอสำหรับลูกปลา ในวันที่ 6 เริ่มให้ไรน้ำเล็กน้อยวันละ 2 ครั้งทุกวัน จนกระทั่งลูกปลาโตพอที่จะกินลูกน้ำได้จึงเลี้ยงด้วยลูกน้ำวันละครั้งประมาณ 9.00 น.

1.5 การเปลี่ยนน้ำ เมื่อลูกปลาอายุได้ 1 เดือน เติมน้ำประปาที่ตกตะกอนแล้วลงในตู้เพาะพันธุ์ ให้ระดับสูงกว่าเดิมประมาณ $\frac{1}{2}$ นิ้วทุก ๆ 5 วัน และดูดสิ่งสกปรกก้นตู้เพาะพันธุ์ออกโดยใช้สายยาง

1.6 การแยกปลา เริ่มแยกปลาเมื่อปลามีขนาดความยาวมาตรฐานประมาณ 2 ซ.ม. เลี้ยงปลาในขวดที่มีกระดาษแข็งกั้นระหว่างขวด อาหารปลาคือลูกน้ำและเปลี่ยนน้ำทุก ๆ 5 วัน

2. <u>การผสมพันธุ์ปลา</u>

2.1 การผสมพันธุ์ปลารุ่น F_1 (ตัวผู้และตัวเมียได้มาจากแหล่งเพาะพันธุ์ปลา)

ลูกที่ S_1 พ่อและแม่เป็นปลากัดไทยพวกหางสั้นครีบสั้นสีฟ้า
ลูกที่ S_2 พ่อและแม่เป็นปลากัดไทยพวกหางสั้นครีบสั้นสีฟ้า
ลูกที่ S_3 พ่อและแม่เป็นปลากัดไทยพวกหางสั้นครีบสั้นสีฟ้า
ลูกที่ S_4 พ่อและแม่เป็นปลากัดไทยพวกหางสั้นครีบสั้นสีแดง
ลูกที่ S_5 พ่อและแม่เป็นปลากัดไทยพวกหางสั้นครีบสั้นสีแดง

คู่ที่ s_6 พ่อและแม่เป็นปลากัดไทยพวกหางสั้นครีบสั้นสีแดง
คู่ที่ 1_1 พ่อและแม่เป็นปลากัดไทยพวกหางยาวครีบยาวสีฟ้า
คู่ที่ 1_2 พ่อและแม่เป็นปลากัดไทยพวกหางยาวครีบยาวสีฟ้า
คู่ที่ 1_3 พ่อและแม่เป็นปลากัดไทยพวกหางยาวครีบยาวสีฟ้า
คู่ที่ 1_4 พ่อและแม่เป็นปลากัดไทยพวกหางยาวครีบยาวสีแดง
คู่ที่ 1_5 พ่อและแม่เป็นปลากัดไทยพวกหางยาวครีบยาวสีแดง
คู่ที่ 1_6 พ่อและแม่เป็นปลากัดไทยพวกหางยาวครีบยาวสีแดง

2.2 การผสมพันธุ์ปลารุ่น F_2 (ตัวผู้และตัวเมียได้มาจาก F_1 ที่มีอายุ 6 – 7 เดือน)

ก. การผสมพันธุ์ปลาในพวกเดียวกันเพื่อศึกษา

a พฤติกรรมบางอย่างในระหว่างผสมพันธุ์

b ศึกษาเปอร์เซนต์การฟักเป็นตัว และการมีชีวิตอยู่รอดของลูกปลา

c ศึกษาแคร์โอไทพ์ของลูกปลาที่เจริญเต็มวัย

การผสมพันธุ์ปลาในพวกเดียวกันแบ่งได้ 2 พวก

ก. (1) ปลากัดไทยหางและครีบสั้นทดลอง 8 คู่ ดังนี้

คู่ที่ S_1 เป็นลูกที่เกิดจาก $s_1 \times s_2$
คู่ที่ S_2 เป็นลูกที่เกิดจาก $s_1 \times s_3$
คู่ที่ S_3 เป็นลูกที่เกิดจาก $s_2 \times s_3$
คู่ที่ S_4 เป็นลูกที่เกิดจาก $s_3 \times s_1$
คู่ที่ S_5 เป็นลูกที่เกิดจาก $s_4 \times s_5$
คู่ที่ S_6 เป็นลูกที่เกิดจาก $s_5 \times s_6$
คู่ที่ S_7 เป็นลูกที่เกิดจาก $s_6 \times s_4$
คู่ที่ S_8 เป็นลูกที่เกิดจาก $s_6 \times s_1$

ก. (2) ปลากัดไทยหางและครีบยาว 8 คู่ ดังนี้

คู่ที่ L_1 เป็นลูกที่เกิดจาก 1_1 x 1_2
คู่ที่ L_2 เป็นลูกที่เกิดจาก 1_2 x 1_3
คู่ที่ L_3 เป็นลูกที่เกิดจาก 1_3 x 1_1
คู่ที่ L_4 เป็นลูกที่เกิดจาก 1_1 x 1_3
คู่ที่ L_5 เป็นลูกที่เกิดจาก 1_4 x 1_5
คู่ที่ L_6 เป็นลูกที่เกิดจาก 1_5 x 1_6
คู่ที่ L_7 เป็นลูกที่เกิดจาก 1_6 x 1_4
คู่ที่ L_8 เป็นลูกที่เกิดจาก 1_6 x 1_1

ข. การผสมพันธุ์เพื่อให้ได้ลูกผสม (reciprocal crosses)

a ความสามารถในการผสมพันธุ์ของปลา 2 พวก

b ศึกษาเปอร์เซ็นต์การฟักเป็นตัวและการอยู่รอดของลูกผสม

วิธีการผสมแบ่งได้เป็น 2 ประเภท

ข. (1) ลูกผสมระหว่างแม่เป็นปลากัดไทยพวกหางและครีบสั้น พ่อเป็นปลากัดไทยพวกหางและครีบยาว ทดลอง 8 คู่ ดังนี้

คู่ที่ $Hs_1 1_1$ เป็นลูกผสมเกิดจากแม่ s_1 x พ่อ 1_1
คู่ที่ $Hs_2 1_2$ เป็นลูกผสมเกิดจากแม่ s_2 x พ่อ 1_2
คู่ที่ $Hs_3 1_3$ เป็นลูกผสมเกิดจากแม่ s_3 x พ่อ 1_3
คู่ที่ $Hs_3 1_2$ เป็นลูกผสมเกิดจากแม่ s_3 x พ่อ 1_2
คู่ที่ $Hs_4 1_4$ เป็นลูกผสมเกิดจากแม่ s_4 x พ่อ 1_4
คู่ที่ $Hs_5 1_5$ เป็นลูกผสมเกิดจากแม่ s_5 x พ่อ 1_5
คู่ที่ $Hs_6 1_6$ เป็นลูกผสมเกิดจากแม่ s_6 x พ่อ 1_6
คู่ที่ $Hs_1 1_6$ เป็นลูกผสมเกิดจากแม่ s_1 x พ่อ 1_6

ข. (2) ลูกผสมระหว่างแม่เป็นปลากัดไทยพวกหางและครีบยาว พ่อเป็นปลากัดไทยพวกหางและครีบสั้น ทดลอง 8 คู่ ดังนี้

คู่ที่ $H1_1s_1$ เป็นลูกผสมที่เกิดจากแม่ 1_1 x พ่อ s_1

คู่ที่ $H1_2s_2$ เป็นลูกผสมที่เกิดจากแม่ 1_2 x พ่อ s_2

คู่ที่ $H1_3s_3$ เป็นลูกผสมที่เกิดจากแม่ 1_3 x พ่อ s_3

คู่ที่ $H1_2s_3$ เป็นลูกผสมที่เกิดจากแม่ 1_2 x พ่อ s_3

คู่ที่ $H1_4s_4$ เป็นลูกผสมที่เกิดจากแม่ 1_4 x พ่อ s_4

คู่ที่ $H1_5s_5$ เป็นลูกผสมที่เกิดจากแม่ 1_5 x พ่อ s_5

คู่ที่ $H1_6s_6$ เป็นลูกผสมที่เกิดจากแม่ 1_6 x พ่อ s_6

คู่ที่ $H1_6s_1$ เป็นลูกผสมที่เกิดจากแม่ 1_6 x พ่อ s_1

2.3 การผสมเพื่อการศึกษาความสามารถในการสืบพันธุ์ของลูกผสม (back crosses)

ก. การผสมระหว่างลูกผสมจาก ข. (1) กับปลาพันธุ์แท้จาก 2.1 และ 2.2

คู่ที่ B_1 ลูกผสมจากคู่ Hs_1l_1 ♂ x S_6

คู่ที่ B_2 ลูกผสมจากคู่ Hs_1l_1 ♂ x L_2

คู่ที่ B_3 ลูกผสมจากคู่ Hs_1l_1 ♀ x S_3

คู่ที่ B_4 ลูกผสมจากคู่ Hs_1l_1 ♀ x L_4

คู่ที่ B_5 ลูกผสมจากคู่ Hs_2l_2 ♂ x S_1

คู่ที่ B_6 ลูกผสมจากคู่ Hs_2l_2 ♀ x S_4

คู่ที่ B_7 ลูกผสมจากคู่ Hs_2l_2 ♀ x L_1

คู่ที่ B_8 ลูกผสมจากคู่ Hs_3l_3 ♂ x S_3

คู่ที่ B_9 ลูกผสมจากคู่ Hs_3l_3 ♂ x L_2

คู่ที่ B_{10} ลูกผสมจากคู่ Hs_3l_3 ♀ x S_2

ข. การผสมระหว่างลูกผสมจาก ข. (2) กับปลาพันธุ์แท้จาก 2.1 และ 2.2

ลูกที่	B_{11}	ลูกผสมจากคู่	$H1_2S_3$	♂	x S_3
ลูกที่	B_{12}	ลูกผสมจากคู่	$H1_2s_3$	♂	x L_6
ลูกที่	B_{13}	ลูกผสมจากคู่	$H1_2s_3$	♀	x S_5
ลูกที่	B_{14}	ลูกผสมจากคู่	$H1_2s_3$	♀	x L_4
ลูกที่	B_{15}	ลูกผสมจากคู่	$H1_4s_4$	♂	x S_7
ลูกที่	B_{16}	ลูกผสมจากคู่	$H1_4s_4$	♂	x 1_3
ลูกที่	B_{17}	ลูกผสมจากคู่	$H1_4s_4$	♀	x S_4
ลูกที่	B_{18}	ลูกผสมจากคู่	$H1_5s_5$	♀	x S_3
ลูกที่	B_{19}	ลูกผสมจากคู่	$H1_5s_5$	♀	x L_6
ลูกที่	B_{20}	ลูกผสมจากคู่	$H1_6s_6$	♂	x 1_1

3. การศึกษา karyotype

ศึกษาโครโมโซมจากปลาพันธุ์แท้ที่ผสมจนถึงรุ่น F_2 ทั้ง 2 ชนิด คือปลากัดไทยพวกหางและครีบสั้น และปลากัดไทยพวกหางและครีบยาว

3.1 ศึกษาเซลของ spleen ที่กำลังแบ่งตัวในระยะ metaphase โดยดัดแปลงมาจากวิธีของ Davission (1972)

ก. Pretreatment: เพื่อให้เซลที่กำลังแบ่งหยุดอยู่ในระยะ metaphase โดยใช้ colchicino 0.05% ปริมาณที่ใช้ 0.03 ml/gm body weight เนื่องจากมีปลาขนาดเล็ก การฉีด colchicine ใช้ฉีดเข้ากล้ามเนื้อด้านหลังห่างจาก dorsol fin มาข้างหน้า $\frac{1}{2}$ ซ.ม. ภายหลังจากฉีด colchicine แล้วให้จาวายน้ำในภาชนะที่มีอากาศผ่าน 4 ซ.ม. เวลาที่เหมาะสมในการฉีด colchicine สำหรับปลากัดไทยคือระหว่าง 10.00 – 11.00 น. หลังจากนั้นฆ่าปลาระหว่าง 14.00 - 15.00 น.

1175012

ข. Hypotonic treatment: หลังจากฆ่าปลาโดยวิธีตัดคอ ใช้กรรไกรเปิดช่องท้องปลา และใช้ปากคีบปลายแหลมคีบ spleen มาใส่ใน 1% sodium citrate ถ้ามีไขมันติดมาด้วยต้องเปลี่ยนน้ำยาโดยใช้ dropper ดูดน้ำยาเก่าทิ้งไป เติม 1% sodium citrate ลงไปใหม่ ใช้กรรไกรปลายแหลมตัด spleen ให้เป็นชิ้นเล็กละเอียด ทิ้งไว้ 30 นาที 1% sodium citrate เป็น hypotonic solution ช่วยให้เซลพองสะดวกในการที่ให้โครโมโซมกระจาย

ค. Fixation: ใช้ dropper ดูด hypotonic solution ออกให้หมด แล้วเติม 50% glacial acetic acid ซึ่งทำหน้าเป็น fixative ลงแทน ใช้กระจกปิดกันระเหย ทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที

ฆ. Squash preparation: ใช้ dropper ดูด spleen ในน้ำยา fixative หยดบนแผ่นสไลด์ที่สะอาด ใช้เข็มปลายแหลมเขี่ยให้เนื้อเยื่อ spleen แยกกันมากชิ้น ปิด coverglassระวังอย่าให้มีฟองอากาศ ใช้กระดาษซับวางทับด้านบน ครั้งแรกใช้โคนดินสอที่มียางลบกดเบา ๆ แล้วจึงใช้หัวแม่มือกดแรง ๆ โดยระวังไม่ให้ coverglass เลื่อนไปจากตำแหน่งเดิม เพื่อป้องกันไม่ให้โครโมโซมปนกับโครโมโซมของเซลอื่น

ง. Air-dried slide: นำแผ่นสไลด์ที่ปิดแล้ววางบนก้อนน้ำแข็งแห้ง เป็นเวลาประมาณ 20 – 30 นาที ใช้ใบมีดโกนแงะ coverglass ออกจากแผ่นสไลด์ ขณะที่แผ่นสไลด์อยู่ใต้แผ่นน้ำแข็งแห้ง โดยวิธีนี้โครโมโซมจะติดไปกับแผ่น coverglass น้อยมาก (Conger and Fairchild, 1953) นำแผ่นสไลด์ไปผึ่งให้แห้งสนิท

จ. Staining: ย้อมแผ่นสไลด์ด้วยสี Giemsa ที่เตรียมใหม่ ๆ ก่อนย้อมทุกครั้ง ทิ้งแผ่นสไลด์ไว้ใน Giemsa ประมาณ 18 – 24 ชั่วโมง ล้างสีออกด้วยน้ำกลั่น ทิ้งไว้ให้แห้งสนิท

ฉ. Permanent slide preparation นำแผ่นสไลด์ที่ย้อมสีแล้วมาทำให้เป็นสไลด์ถาวรดังนี้

ก. แช่ใน absolute alcohol 1 – 2 นาที
ข. แช่ใน xylene 20 – 30 นาที
ค. mount ด้วย canada balsum

3.2 การถ่ายรูป chromosomes จาก permanent slide

เนื่องจากโครโมโซมมีขนาดเล็กมาก การสังเกตลักษณะและขนาดด้วยกล้องจุลทัศน์ objective กำลังขยาย x 100 ยังไม่สามารถศึกษาหารายละเอียดได้ชัดเจน จึงต้องอาศัยขยายขนาดจากภาพที่ถ่ายจากกล้องจุลทัศน์อีกต่อหนึ่ง โดยนำ permanent slide ไปศึกษาโครโมโซมระยะ metaphase เลือกถ่ายภาพเฉพาะเซลที่มีโครโมโซมขนาดไม่หดสั้นมากเกินไป และกระจายดีไม่ทับกัน

3.3 การหา heteromorphic chromosomes

นำภาพถ่ายโครโมโซมซึ่งขยาย 5000 เท่า จากของจริงโดยเทียบกับขนาดขยายของ stage micrometer มาตัดรูปโครโมโซม แล้วจับคู่เรียงติดในกระดาษตามลำดับความยาวและชนิดของโครโมโซม

ภาพถ่ายโครโมโซมที่นำมาศึกษานี้ ได้มาจากปลากัดไทยทั้ง 2 กลุ่ม ๆ ละ 30 เซล ซึ่งมาจากตัวผู้ 15 เซล และตัวเมีย 15 เซล

ปลากัดไทยชนิดหางและครีบสั้นตัวผู้ 15 เซลได้มาจากปลา 11 ตัว
ปลากัดไทยชนิดหางและครีบสั้นตัวเมีย 15 เซลได้มาจากปลา 10 ตัว
ปลากัดไทยชนิดหางและครีบยาวตัวผู้ 15 เซลได้มาจากปลา 12 ตัว
ปลากัดไทยชนิดหางและครีบยาวตัวเมีย 15 เซลได้มาจากปลา 11 ตัว

เนื่องจากไม่พบหลักฐานที่แสดงว่ามี heteromorphic sex chromosome ดังนั้นในการศึกษาเพื่อเปรียบเทียบแคริโอไทพ์ระหว่างปลากัดไทยระหว่างหางสั้นครีบสั้นและหางยาวครีบยาวจึงไม่ต้องคำนึงถึงความแตกต่างระหว่างเพศ คัดเลือกเซลมากลุ่มละ 20 เซลเพื่อศึกษาแคริโอไทพ์

3.4 การวัดขนาดของโครโมโซมเพื่อนำไปจัดแคริโอไทพ์

การจัดโครโมโซมเป็นหมวดหมู่นี้ เพื่อให้มีความผิดพลาดน้อยที่สุด อาศัยวัดขนาดโครโมโซมจากรูปวาดที่ขยายขนาดใหญ่มาก ๆ ดังนั้นนำฟิล์มที่เลือกไว้กลุ่มละ 20 เซลที่ล้างเป็น negative ไปใส่เฟลมสไลด์และฉายโดยเครื่องฉายสไลด์แล้ววาดภาพโครโมโซมในที่นี้ขนาด 7000 เท่าจากของจริงโดยเทียบขนาดขยายของ stage micrometer จากนั้นนำภาพที่วาดมาวัดความยาวโครโมโซมโดยวัดความยาว short arm (Ls) และความยาว long arm (L1) การวัด วัดจากตำแหน่ง centromere ไปยังปลายโครโมโซมทั้ง 2 ข้าง เนื่องจากโครโมโซมประกอบด้วย 2 chromatids ดังนั้นจึงวัดได้ค่า long arm และ short arm อย่างละ 2 ค่า ต้องนำมาหาค่าเฉลี่ยแล้วคำนวณหาความยาวของแต่ละโครโมโซม ซึ่งจะเท่ากับ Ls + L1

3.5 การแบ่งหมวดหมู่ของโครโมโซม

ความยาวของแต่ละโครโมโซม LT = Ls + L1

Relative length (R.I.) = $\frac{LT}{\Sigma LT}$ (Nishioka 1972)

Centromeric index (C.I.) = $\frac{L1}{LT}$ (Lejeune 1965)

โครโมโซมที่เป็นคู่กัน (homologous chromosome) ย่อมมีค่า Relative length และ Centromeric index เท่าหรือใกล้เคียงกัน สามารถจัดโครโมโซมจากคู่ที่ 1 ถึงคู่ที่ 21 ได้โดยนำค่า R.L. และ C.I. ไปเขียนกราฟและอาศัยภาพถ่ายโครโมโซมประกอบ

การศึกษาแคริโอไทพ์เปรียบเทียบระหว่างปลา 2 กลุ่มที่ศึกษา ทำตามวิธีดังกล่าวนี้ศึกษากลุ่มละ 20 เซล จากสัตว์ทดลองกลุ่มละไม่น้อยกว่า 10 ตัว นำค่า Relative length และค่า Centromeric index ของโครโมโซมแต่ละคู่ทั้ง 20 เซล และมาคำนวณหาค่า mean, standard deviation, standard

error ของ mean เพื่อนำไปเขียนกราฟตามวิธีของ Tymowska and Kobel (1972)

ค่า Centromeric indexทำให้ทราบถึงชนิดของโครโมโซม และใช้เป็นค่าในการเปรียบเทียบโครโมโซมแต่ละคู่ในปลาทั้ง 2 ชนิด

ค่า Centromeric index ระหว่าง .50 – .69 จัดเป็น metacentric chromosome

ค่า Centromeric index ระหว่าง .70 – .75 จัดเป็น submetacentric chromosome

ค่า Centromeric index ระหว่าง .76 – 87 จัดเป็น acrocentric chromosome

ค่า Centromeric index ระหว่าง .88 – 1.0 จัดเป็น telocentric chromosome

โดยทั่วไปโครโมโซมในสัตว์แต่ละชนิดแบ่งเป็น 2 พวกตามวิธีของ Ullerich (1966) คือพวกที่มีขนาดใหญ่ และพวกที่มีขนาดเล็ก พวกที่มีขนาดใหญ่ถือหลักว่ามีความยาวเกินกึ่งหนึ่งของโครโมโซมคู่ที่ยาวที่สุด ถ้าโครโมโซมใดยาวน้อยกว่ากึ่งหนึ่งของโครโมโซมคู่ที่ยาวที่สุดจัดเป็นโครโมโซมที่มีขนาดเล็ก

3.6 เปรียบเทียบแคริโอไทพ์ระหว่างปลากัดไทยหางสั้นครีบสั้น และปลากัดไทยหางยาวครีบยาว ใช้หลักดังต่อไปนี้

ก. จำนวนโครโมโซม (diploid number)

ข. ชนิดของโครโมโซม โดยยึดค่า Centromeric index เป็นหลัก

ค. จำนวนแขนโครโมโซม (arm number)

Simon and Dollar (1963)โครโมโซมใดมี centromere อยู่กึ่งกลางหรือเกือบกึ่งกลางจัดเป็น bi-armed chromosome ดังนั้น metacentric และ submetacentric มี arm no. = 2 แต่ถ้า centromere อยู่ปลายหรือค่อนไปทางปลาย จัดเป็น one-armed chromosome ดังนั้น acrocentric หรือ telocentric มีจำนวน arm no. = 1

ฆ. ชนิดของ acrocentric chromosome

Chen and Ruddle (1970) และ Chen (1971) จัดชนิด acrocentric โดยยึดหลักดังนี้

$$\frac{\text{ความยาวโครโมโซมแขนยาว}}{\text{ความยาวโครโมโซมทั้งแท่ง}} \quad \text{หรือค่า C.I.} = \frac{L1}{LT}$$

ค่า C.I. มากกว่า 0.8 จัดเป็น Short-short arm acrocentric (SSA)

ค่า C.I. น้อยกว่า 0.8 จัดเป็น Long-short arm acrocentric (LSA)

ในสัตว์ชนิดใดถ้ามี	SSA	มากกว่า 50%	จัดเป็น SSA group
ถ้าสัตว์ใดมี	SSA	น้อยกว่า 50%	จัดเป็น LSA group

ง. ลักษณะ chromosome marker ที่อาจจะพบ เช่น satellite chromosome และ secondary constriction เป็นต้น

4. <u>การศึกษา hybridization</u>

4.1 ศึกษา reciprocal crosses และการผสมในปลาพวกเดียวกันโดยสังเกตเปรียบเทียบ

ก. ช่วงเวลาของวันและระยะเวลาที่ปลาผสมพันธุ์ เริ่มจับเวลาตั้งแต่แม่ปลาเริ่มปล่อยไข่เมื่อพ่อปลาโค้งตัวโดยรอบรัดแม่ปลา จนกระทั่งแม่ปลาเริ่มว่ายน้ำหนีไป

อยู่มุมตู้เพาะพันธุ์ปลา เป็นการเสร็จสิ้นการผสมพันธุ์

ข. การนับจำนวนครั้งที่พ่อปลารัดแม่ปลา และจำนวนไข่ทั้งหมด การรัดของพ่อปลาแต่ละครั้งได้ไข่จำนวนไม่เท่ากัน บันทึกจำนวนไข่ที่ได้จากการรัดแต่ละครั้งแล้วนำมารวมกันเป็นจำนวนไข่ทั้งหมด และนับจำนวนครั้งที่พ่อปลารัดแม่ปลาระหว่างที่มีการผสมพันธุ์ นำมารวมกันเป็นจำนวนครั้งที่รัดทั้งหมดในการผสมพันธุ์

ค. การนับจำนวนลูกปลาที่ฟักเป็นตัว

ปกติลูกปลาจะเริ่มฟักเป็นตัวภายใน 48 ชั่วโมง ไม่สามารถนับลูกปลาในทันทีได้ เพราะลูกปลายังว่ายน้ำไม่ได้แข็งแรง และมักอยู่บริเวณใต้หวอด จนกระทั่งวันที่ 5 ลูกปลาเริ่มว่ายน้ำได้แข็ง และแยกพ่อปลาออกแล้วจึงนับลูกปลาโดยใช้แผ่นพลาสติคใสนำมากั้นเป็นห้องเล็ก ๆ ขนาด 3 x 3 x 7 นิ้ว ใส่ลงในตู้เพาะพันธุ์ปลา นับจำนวนลูกปลาแต่ละห้องแล้วนำมารวมกัน เป็นจำนวนลูกปลาที่ฟักเป็นตัว

$$\text{เปอร์เซ็นต์การฟักเป็นตัวของลูกปลา} = \frac{\text{จำนวนลูกปลาที่ฟักเป็นตัว}}{\text{จำนวนไข่ทั้งหมด}} \times 100$$

ง. การนับจำนวนลูกปลาที่สามารถมีชีวิตรอด

ปลากัดจะเริ่มตายมากในสองกรณี กรณีที่หนึ่งในระยะที่ไข่แดงเริ่มหมด แล้วลูกปลาได้รับอาหารไม่เพียงพอ กรณีที่สองในระยะที่ลูกปลาสร้างอวัยวะที่ช่วยในการหายใจ (labyrinth organ) เมื่อปลามีอายุได้ประมาณ 3 สัปดาห์

การนับจำนวนลูกปลาที่อยู่รอดเริ่มนับเมื่อลูกปลามีอายุได้ $1\frac{1}{2}$ เดือน ซึ่งเป็นระยะที่ลูกปลามีความยาวมาตราฐาน 1 – 2 ซ.ม. สามารถช้อนลูกปลานับทีละตัวโดยไม่เป็นอันตรายต่อลูกปลา

$$\text{เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของลูกปลา} = \frac{\text{จำนวนลูกปลาที่อยู่รอด}}{\text{จำนวนลูกปลาที่ฟักเป็นตัว}} \times 100$$

4.2 การศึกษา backcross

เลือกปลากัดลูกผสมที่เจริญเต็มวัยทั้งตัวผู้และตัวเมียผสมพันธุ์กับปลากัดไทยพวกหางและครีบสั้น และหรือพวกหางและครีบยาว ลูกผสมที่สามารถให้ลูกเจริญเติบโตจนถึงอายุประมาณ 1 เดือน ซึ่งลูกปลาได้สร้าง labyrinth organ เรียบร้อยแล้วจัดว่าลูกผสมนั้น fertile

5. สังเกตลักษณะบางอย่างขณะผสมพันธุ์ในปลากัดไทยพวกหางและครีบสั้น และพวกหางและครีบยาว สังเกตตามหัวข้อดังต่อไปนี้

5.1 ลักษณะการสร้างหวอด (bubble nest)

5.2 ระยะเวลาที่ตัวผู้เริ่มรัดตัวเมีย จนกระทั่งตัวเมียว่ายน้ำหนีไป

5.3 การดูผลไข่ที่ได้รับการผสมและลูกที่ฟักเป็นตัว

5.4 สุขภาพของปลาเมื่อการผสมพันธุ์สิ้นสุด