ลำดับเบสไซโทโครมบีและโครโมโซมของปลาสกุล *Chitala* (TELEOSTEI: NOTOPTERIDAE) ในประเทศไทย

นางสาวเวอร์จีเนีย เฉลิมชัยกิจ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2548

ISBN 974-14-3332-8

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CYTOCHROME *b* NUCLEOTIDE SEQUENCE AND CHROMOSOME OF FISH IN THE GENUS *Chitala* (TELEOSTEI: NOTOPTERIDAE) IN THAILAND.

Miss Virginia Chalermchaikit

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science Program in Genetics

Department of Botany

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2005

ISBN 974-14-3332-8

481675

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ลำดับเบสไซโทโครมบีและโครโมโซมของปลาสกุล Chitala (TELEOSTEI: NOTOPTERIDAE) ในประเทศไทย
โดย	นางสาวเวอร์จีเนีย เฉลิมชัยกิจ
ภาควิชา	พฤกษศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	อาจารย์ ดร. อัจฉริยา รังษิรุจิ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร. เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พงศ์ธาริน โล่ห์ตระกูล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ดร. วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(อาจารย์ ดร. อัจฉริยา รังษิรุจิ)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์เตือนใจ โก้สกุล)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ธวัช ตอนสกุล)

ต้นฉบับ หน้าขาดหาย

ต้นฉบับ หน้าขาดหาย

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล อาจารย์ที่ปรึกษา และ อาจารย์ ดร. อัจฉริยา รังษิรุจิ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม เป็นอย่างสูง สำหรับคำปรึกษา คำแนะนำทางเซลล์พันธุศาสตร์และพันธุศาสตร์โมเลกุลที่มีค่าอย่างยิ่ง และสนับสนุนส่งเสริมวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ตลอดจนความกรุณาในการอ่านและแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พงศ์ธาริน โล่ตระกูล ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เตือนใจ โก้สกุล ที่สละเวลาอันมีค่าร่วมเป็นคณะกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ครั้งนี้ และให้คำแนะนำในการตรวจแก้วิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ ธวัช ดอนสกุล ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่สละเวลาอันมีค่าร่วมเป็นคณะกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ครั้งนี้ รวมถึงความช่วยเหลือในการจำแนกชนิดของปลา คำปรึกษา คำแนะนำเกี่ยวกับปลาที่ใช้ในการทดลองและเซลล์พันธุศาสตร์ เอกสารอ้างอิงต่างๆ ที่มีค่าอย่างยิ่ง

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่และเพื่อนๆ ของภาควิชาพฤกษศาสตร์ วิทยาศาสตร์ทางทะเล และเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และที่ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้รับทุนสนับสนุนวิทยานิพนธ์และกลุ่มวิทยานิพนธ์ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และทุนโครงการพัฒนาอาจารย์ สาขาชาดแคลนทบวงมหาวิทยาลัย

ขอน้อมรำลึกถึงพระคุณบิดามารดา ที่มอบความรัก ความเข้าใจ การสนับสนุนและช่วยเหลือข้าพเจ้าตลอดมา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....จ

กิตติกรรมประกาศ.....ฉ

สารบัญ.....ช

สารบัญตาราง.....ฌ

สารบัญรูปภาพ.....ญ

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....ฎ

บทที่ 1 บทนำ.....1

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ลักษณะปลาในสกุล *Chitala*.....3

2.2 ชีววิทยาของปลาในสกุล *Chitala*.....6

2.3 การศึกษาทางพันธุศาสตร์โมเลกุล.....9

2.3.1 ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ (Mitochondrial DNA).....10

2.3.2 ไซโทโครมบี (Cytochrome *b*).....11

2.3.3 ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการระดับโมเลกุล (molecular phylogenetics)13

2.4 การศึกษาทางเซลล์พันธุศาสตร์.....15

2.4.1 การเรียกชื่อและจำแนกชนิดโครโมโซม.....17

2.4.2 การเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซม.....18

2.4.3 การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโครโมโซม.....19

2.4.4 การแปรผันของจำนวนโครโมโซม.....20

2.4.5 การประยุกต์ใช้การแปรผันของโครโมโซมในปลา.....21

บทที่ 3 อุปกรณ์และสารเคมี

3.1 เครื่องมือวิทยาศาสตร์.....23

3.2 เคมีภัณฑ์.....24

บทที่ 4 วิธีดำเนินการวิจัย

4.1 ประชากร.....26

4.2 วิธีดำเนินการวิจัยด้านพันธุศาสตร์โมเลกุล

4.2.1 การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ (Genomic DNA) โดยใช้ DNeasy Tissue Kit

หน้า

(QIAGEN, Germany).....26
4.2.2 การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมบริเวณไซโทโครมบี.....26
4.2.3 การทำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ให้บริสุทธิ์โดยการสกัดออกจากแผ่นวุ้น.....27
4.2.4 การเชื่อมต่อผลิตภัณฑ์พีซีอาร์กับดีเอ็นเอพาหะและนำเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย.....27
4.2.5 การตรวจสอบการเชื่อมต่อของดีเอ็นเอพาหะกับผลิตภัณฑ์พีซีอาร์.....28
4.2.6 การสกัดพลาสมิดโดยใช้ชุดสกัดเพื่อส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์.....29
4.2.7 การวิเคราะห์ไฟโลเจเนติกทรี.....29
4.3 วิธีดำเนินการวิจัยด้านเซลล์พันธุศาสตร์
4.3.1 การศึกษาโครโมโซมโดยวิธีเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาว.....31
4.3.2 การศึกษาโครโมโซมโดยวิธีกดให้แบน (squash).....32
บทที่ 5 ผลการทดลอง
5.1 ชนิดปลาที่ใช้ในการศึกษา.....33
5.2 ผลการทดลองด้านพันธุศาสตร์โมเลกุล
5.2.1 การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ (Genomic DNA) โดยใช้ DNeasy Tissue Kit (QIAGEN, Germany).....34
5.2.2 การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมบริเวณไซโทโครมบีด้วยวิธีพีซีอาร์.....34
5.2.3 การทำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ให้บริสุทธิ์โดยการสกัดออกจากแผ่นวุ้น.....35
5.2.4 การนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย การสกัดพลาสมิดเพื่อศึกษาลำดับเบส.....36
5.2.5 การวิเคราะห์ไฟโลเจเนติกทรี.....37
5.3 ผลการทดลองด้านเซลล์พันธุศาสตร์.....51
บทที่ 6 อภิปรายและสรุปผลการทดลอง.....60
รายการอ้างอิง.....68
ภาคผนวก.....76
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....87

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 ขนาดไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของปลาบางชนิด.....10

ตารางที่ 2 ตำแหน่งของเซนโทรเมียร์ ชนิด อัตราส่วนของความยาวแขนและรูปแบบของโครโมโซมในระยะอะนาเฟส.....17

ตารางที่ 3 ลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง.....27

ตารางที่ 4 ชนิด จำนวน และสถานที่เก็บตัวอย่างปลาที่ใช้ในการทดลอง.....33

ตารางที่ 5 ลักษณะลำดับเบสบริเวณไซโทโครมบีบางส่วนของปลาสกุล *Chitala* 3 ชนิดและสิ่งมีชีวิตนอกกลุ่มรวม 18 ตัวอย่าง.....49

ตารางที่ 6 ค่าความห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) ของปลากราย ปลาตองลาย และปลาสะตือ รวม15 ตัวอย่าง (1-15) และสิ่งมีชีวิตนอกกลุ่ม (16-18) โดยใช้โปรแกรม PAUP* ver.4.0b10.....86

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 ปลากราย (*Chitala ornata*).....5
ภาพที่ 2 ปลาตองลาย (*Chitala blanci*)..... 5
ภาพที่ 3 ปลาสะตือ (*Chitala lopis*).....6
ภาพที่ 4 ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของปลาและตำแหน่งของไซโทโครมบี.....12
ภาพที่ 5 ส่วนประกอบของไฟโลเจเนติกทรี.....13
ภาพที่ 6 รูปร่างของโครโมโซม.....18
ภาพที่ 7 ผลการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์บริเวณไซโทโครมบีหลังจากแยกใน 1% agarose gel ใน 1X TBE ด้วยกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 50 นาที.....35
ภาพที่ 8 ผลการตรวจสอบการเชื่อมต่อของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์และดีเอ็นเอพาหะด้วย 1% agarose gel ใน 1X TBE ที่กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 50 นาที.....36
ภาพที่ 9 ตัวอย่างของลำดับเบสบริเวณไซโทโครมบีในรูปแบบของ FASTA 38
ภาพที่ 10 การเปรียบเทียบลำดับเบสบริเวณไซโทโครมบีของปลา 6 ชนิดโดยใช้โปรแกรม Clustal X มีความยาว 806 คู่เบส (สีน้ำเงิน-กลุ่มปลาสะตือ สีเขียว-กลุ่มปลากราย สีแดง-กลุ่มปลาตองลาย และสีชมพู-สิ่งมีชีวิตนอกกลุ่ม) เครื่องหมาย – (gap) แสดงการเกิดอินเซอร์ชันหรือดีลีชันของลำดับเบส.....44
ภาพที่ 11 ตัวอย่างรูปแบบ NEXUS ไฟล์ที่ใช้ในการวิเคราะห์และสร้างไฟโลเจเนติกทรี.....45
ภาพที่ 12 ไฟโลเจเนติกทรีจากวิธี neighbor-joining โดยใช้โปรแกรม PAUP* ของปลาสกุล *Chitala* 3 ชนิด อาศัยลำดับเบสไซโทโครมบีและใช้ *P. afer*, *X. nigri* และ *N. notopterus* เป็นสิ่งมีชีวิตนอกกลุ่ม.....47
ภาพที่ 13 ไฟโลเจเนติกทรีจากวิธี maximum parsimony และค่าบูทสแตรป (%) โดยใช้โปรแกรม PAUP* ver.4.0b10 ของปลาสกุล *Chitala* 3 ชนิด อาศัยลำดับเบสไซโทโครมบี และกำหนดให้ *P. afer*, *X. nigri* และ *N. notopterus* เป็นสิ่งมีชีวิตนอกกลุ่ม.....50
ภาพที่ 14 ลักษณะเม็ดเลือดขาวที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์โดยใช้อาหาร RPMI 1640 (GIBCO BRL, U.S.A.) 5% PHA 20% FBS ที่อุณหภูมิ 32°C ย้อมด้วยสีย้อม Giemsa.....51
ภาพที่ 15 ลักษณะเม็ดเลือดขาวอีกหนึ่งลักษณะที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์โดยใช้อาหาร RPMI 1640 5% PHA 20% FBS ที่อุณหภูมิ 32°C ย้อมด้วยสีย้อม Giemsa.....52

ภาพที่ 16 ลักษณะเม็ดเลือดขาวชนิด neutrophil (ลูกศรชี้) และเม็ดเลือดแดงที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์โดยใช้อาหาร Medium 199 (GIBCO BRL, U.S.A.) 5% PHA 20% FBS ที่อุณหภูมิ 30°C ย้อมด้วยสีย้อม Giemsa.....52
ภาพที่ 17 ลักษณะเม็ดเลือดขาวชนิด neutrophil (ลูกศรชี้) และเม็ดเลือดแดงที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์โดยใช้อาหาร Medium 199 5% PHA 20% FBS ที่อุณหภูมิ 30°C ย้อมด้วยสีย้อม Giemsa.....53
ภาพที่ 18 ลักษณะเม็ดเลือดขาวชนิด neutrophil (ลูกศรชี้) และเม็ดเลือดแดงที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์โดยใช้อาหาร Medium 199 5% PHA 20% FBS ที่อุณหภูมิ 30°C ย้อมด้วยสีย้อม Giemsa.....53
ภาพที่ 19 ลักษณะเม็ดเลือดขาวชนิด monocyte (ลูกศรชี้) และเม็ดเลือดแดงที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์โดยใช้อาหาร Medium 199 5% PHA 20% FBS ที่อุณหภูมิ 30°C ย้อมด้วยสีย้อม Giemsa.....54
ภาพที่ 20 ลักษณะเม็ดเลือดขาวชนิด Basophil ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์โดยใช้อาหาร Medium 199 5% PHA 20% FBS ที่อุณหภูมิ 30°C ย้อมด้วยสีย้อม Giemsa.....54
ภาพที่ 21 ผลการตรวจหาระยะเมทาเฟสโดยวิธีกดให้แบนโดยใช้ครีบหางของปลากราย (*C. ornata*) ย้อมด้วยสีย้อมอะซิโต-ออซีน มีจำนวนโครโมโซมประมาณ 2n = 42.....55
ภาพที่ 22-23 ผลการตรวจหาระยะเมทาเฟสโดยวิธีกดให้แบนโดยใช้ครีบหางของปลากราย (*C. ornata*) ย้อมด้วยสีย้อมอะซิโต-ออซีน.....56
ภาพที่ 24-25 ผลการตรวจหาระยะเมทาเฟสโดยวิธีกดให้แบนโดยใช้ครีบหางของปลากราย (*C. ornata*) ย้อมด้วยสีย้อมอะซิโต-ออซีน.....57
ภาพที่ 26-27 ผลการตรวจหาระยะเมทาเฟสโดยวิธีกดให้แบนโดยใช้ครีบหางของปลากราย (*C. ornata*) ย้อมด้วยสีย้อมอะซิโต-ออซีน.....58
ภาพที่ 29 อธิบายคำศัพท์เฉพาะที่เกี่ยวข้องกับสิ่งมีชีวิตและลักษณะที่ใช้ในการศึกษาคลาดิสติกส์.....85

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

bp	คู่เบส
C.	*Chitala* sp.
N.	*Notopterus* sp.
P.	*Papyrocranus* sp.
mM	มิลลิโมลาร์
µM	ไมโครโมลาร์
°C	องศาเซลเซียส
U	ยูนิต