คาริโอไทป์ของปลานิล ปลาหมอเทศ และปลานิลแดง

Karyotypes of *Oreochromis niloticus*, *O. mossambicus* and Red tilapia

<u>เกรียงไกร สีตะพันธุ์</u> และวรางคณา พระคุณ

<u>Kriengkrai Seetapan</u> and Warangkana Prakoon

บทคัดย่อ

การศึกษาโครโมโซมปลานิล (*Oreohcromis niloticus*) ปลาหมอเทศ (*O. mossambicus*) และปลานิลแดง (Red Tilapia) เตรียมเซลล์ระยะ metaphase จากไตและเหงือก พบว่าปลาทั้ง 3 ชนิดมีจำนวนโครโมโซม 2n=44 เท่ากัน อย่างไรก็ตามลักษณะคาริโอไทป์ของปลาทั้ง 3 ชนิดมีความแตกต่างกัน ปลานิลมีคาริโอไทป์ประกอบด้วยโครโมโซมแบบสับเมตาเซนตริก 1 คู่ สับทีโลเซนตริก 6 คู่ อะโครเซนตริก 15 คู่ จำนวนแขนโครโมโซมเท่ากับ 58 ปลาหมอเทศมีคาริโอไทป์ประกอบด้วยโครโมโซมแบบสับเมตาเซนตริก 6 คู่ สับทีโลเซนตริก 2 คู่ อะโครเซนตริก 14 คู่ จำนวนแขนโครโมโซมเท่ากับ 60 และปลานิลแดงมีคาริโอไทป์ประกอบด้วยโครโมโซมแบบสับเมตาเซนตริก 1 คู่ สับทีโลเซนตริก 3 คู่ อะโครเซนตริก 18 คู่ จำนวนแขนโครโมโซมเท่ากับ 52 ข้อมูลทางด้านเซลล์พันธุศาสตร์ของปลาทั้ง 3 ชนิด อาจมีประโยชน์ต่อการศึกษาเซลล์อนุกรมวิธาน ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของปลาและเป็นพื้นฐานของการศึกษาลักษณะทางจีโนมของปลาในวงศ์ปลานิล

ABSTRACT

Chromosome studied of *Oreohcromis niloticus*, *O. mossambicus* and Red tilapia. Metaphase chromosome were obtained from kidney and gill. The chromosome number of 3 species were 44 (2n=44), However, all species have different karyotypic morphology. *O. niloticus* comprises 1 pair of submetacentric chromosome, 6 pairs of subtelocentric chromosome and 15 pairs of acrocentric chromosome; *O. mossambicus* comprises 6 pairs of submetacentric chromosome, 2 pairs of subtelocentric chromosome and 14 pairs of acrocentric chromosome and Red tilapia comprises 1 pair of submetacentric chromosome, 3 pairs of subtelocentric chromosome and 18 pairs of acrocentric chromosome. *O. niloticus*, *O. mossambicus* and Red tilapia have the fundamental number of 58, 60 and 52 respectively. These cytogenetics data may be useful for cytotaxonomy, evolutionary relationship of fishes and provide basis for further analysis of tilapias genome.

Key Words: Chromosome, Karyotype, *Oreohcromis niloticus*, *Oreohcromis mossambicus*, Red tilapia

E-mail address: kook82@hotmail.com

สำนักวิชาเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวรวิทยาเขตสารสนเทศพะเยา 56000

School of Agriculture, Natural Resources and Environmental Science, Naresuan University, Phayao Campus 56000, Thailand.

คำนำ

ปลาในกลุ่มปลานิลหรือที่นิยมเรียกว่า Tilapias เป็นกลุ่มปลาที่อยู่ในวงศ์ Cichlidae ประกอบด้วยปลาในสกุล *Tilapia*, *Sarotherodon* และ *Oreohcromis* ส่วนใหญ่มีถิ่นกำเนิดในทวีปแอฟริกา ปลาในกลุ่มนี้สามารถอาศัยอยู่ได้ทั้งน้ำจืดและน้ำกร่อย (Nelson, 1994) ปัจจุบันปลาในกลุ่มนี้โดยเฉพาะปลานิล (*Oreohcromis niloticus*) ปลาหมอเทศ (*O. mossambicus*) และปลานิลแดง (Red Tilapia) จัดว่ามีความสำคัญทางเศรษฐกิจอย่างสูง จะเห็นได้จากมีคนนิยมนำมาเลี้ยงและบริโภคกันอย่างกว้างขวาง ซึ่งอาจจะมีสาเหตุจากปลาเหล่านี้เลี้ยงง่าย โตเร็ว และมีรสชาติดี ที่สำคัญปลาในกลุ่มนี้มีการปรับปรุงพันธุ์อย่างต่อเนื่องและเป็นเวลายาวนานไม่น้อยกว่า 20 ปีมาแล้ว เพื่อปรับปรุงให้ปลามีการเจริญเติบโตที่ดีและเพิ่มผลผลิตของปลา ซึ่งการปรับปรุงพันธุ์ที่พบในกลุ่มปลา Tilapias ได้แก่การทำปลาแอนโดรเจเนซิส (Androgenesis) การผสมข้ามชนิด (Hybridization) และการเหนี่ยวนำโพลี่พลอยด์ (Induction Polyploidy) เป็นต้น (Lutz, 2001) ปัจจุบันปลานิลแดงยังไม่มีรายงานที่ชัดเจนถึงชนิดที่แท้จริงโดย Matthew (1992) กล่าวว่าปลานิลแดงเป็นลูกผสมระหว่างปลาหมอเทศ (*O. mossambicus*) กับปลา *O. hornorum* แต่ปกรณ์ (2541) กล่าวว่าเกิดจากการกลายพันธุ์จากปลานิลปกติหรือการผสมข้ามสายพันธุ์ระหว่างปลานิลกับปลาหมอเทศ นอกจากนี้ Lutz (2001) ยังกล่าวว่าปลานิลแดงคือปลาหมอเทศที่มีสีแดง (หรือสีทอง) ซึ่งสีดังกล่าวเป็นการแสดงออกของสีในปลาหมอเทศซึ่งมีทั้งหมด 3 สี ได้แก่สีแดง (Gold) สีทองสัมฤทธิ์ (Bronze) และสีปกติ (Gray-Black)

ปลานิล ปลาหมอเทศ และปลานิลแดงเป็นปลาที่มีลักษณะภายนอกที่ค่อนข้างคล้ายคลึงกันมาก ดังนั้นหากเรานำความรู้ด้านเซลล์พันธุศาสตร์ (cytogenetic) มาประยุกต์ใช้เพื่อช่วยในการจัดจำแนกชนิดปลาจะทำให้ทราบถึงความแตกต่างของปลาทั้ง 3 ชนิดได้ เนื่องจากการวิเคราะห์โครโมโซมสามารถทำให้เราตอบคำถามเกี่ยวกับความแตกต่างของปลาที่มีลักษณะคล้ายคลึงกันได้ โดยดูจากความแตกต่างของจำนวนและรูปแบบของโครโมโซม ซึ่งข้อมูลที่ได้สามารถนำมาประกอบการศึกษาด้านวิวัฒนาการและความสัมพันธ์ของปลาได้ (Gary and Jane, 1990) การวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาคาริโอไทป์ของปลาทั้ง 3 ชนิดดังกล่าวเพื่อให้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการนำไปใช้ประโยชน์ด้านเซลล์อนุกรมวิธาน (cytotaxonomy) และศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของปลาในกลุ่มนี้ที่พบในประเทศไทย

อุปกรณ์และวิธีการ

ปลาที่ใช้ในการศึกษาประกอบด้วยปลานิลจำนวน 26 ตัว ปลาหมอเทศจำนวน 26 ตัว และปลานิลแดงจำนวน 10 ตัว น้ำหนักประมาณ 30-100 กรัม จากกว๊านพะเยา อ. เมือง จ. พะเยา นำปลาดังกล่าวมาเลี้ยงในตู้กระจกขนาด 60x120x60 เซนติเมตร จำนวน 3 ตู้ ให้ออกซิเจนตลอดเวลา ให้อาหารเม็ดวันละครั้ง การเตรียมโครโมโซมเพื่อศึกษาคาริโอไทป์ดัดแปลงมาจากวิธีของ Chen and Ebeling (1968) และ Nanda *et al.* (1995) โดยนำปลาที่ต้องการศึกษามาฉีดด้วย colchicine เข้มข้น 0.1% (ฉีด 0.7 มิลลิลิตรต่อน้ำหนักปลา 100 กรัม) ทิ้งไว้ 1-2 ชั่วโมง จากนั้นนำปลาดังกล่าวมาผ่าเอาไต และเหงือก นำมาแช่ในสารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) 0.075 M นาน 10 นาที (ขณะแช่ใช้มีดผ่าตัดสับไต และเหงือกให้เป็นชิ้นเล็กๆ) ดูดไต และเหงือกในสารละลายมาเก็บไว้ในหลอด centrifuge เมื่อครบ 10 นาที จึงนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 1,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 8-10 นาที แล้วดูดส่วนใสทิ้ง เติม 0.075 M KCl ปริมาณ 5 มิลลิลิตร อีกครั้งโดยใช้ vortex mixer ช่วยปั่น แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว และเวลาเท่าเดิม แล้วดูดส่วนใสทิ้ง จากนั้นนำหลอด centrifuge เดิมมาปั่นด้วย vortex

mixer ให้กระจายออกจากกัน แล้วค่อยๆ เติมสารทำให้คงสภาพ [fixative (Mathanal : Glacial acetic acid) 3:1] ปริมาณ 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว และเวลาเท่าเดิม ดูดส่วนใสทิ้ง ทำเช่นนี้อีก 2 ครั้ง ในขั้นตอนสุดท้ายดูดส่วนใสทิ้งให้เหลือสารทำให้คงสภาพในหลอดให้เหมาะสมกับการเตรียมสไลด์ จากนั้นนำตัวอย่างเซลล์ที่ได้มาหยดลงบนแผ่นสไลด์ 1 หยด และหยดน้ำยาทำให้คงสภาพตามลงไปอีก 1 หยด ทิ้งไว้ให้แห้ง จากนั้นจึงนำสไลด์ดังกล่าวมาย้อมใน 10 % Giemsa เมื่อเวลาครบ 10-15 นาที นำสไลด์ไปล้างด้วยน้ำกลั่นให้สะอาด และทิ้งไว้ให้แห้ง นำสไลด์ดังกล่าวมาตรวจหากลุ่มเซลล์ที่มีโครโมโซมกระจายตัวดีด้วยกล้องจุลทรรศน์

หาจำนวนโครโมโซมปลาแต่ละชนิดที่โดยนับจำนวนโครโมโซมในระยะเมทาเฟส (metaphase) ทั้งหมด 100 เซลล์ของปลาแต่ละชนิดที่ทำการศึกษา เมื่อนับโครโมโซมครบ 100 เซลล์แล้วจึงทำการเปรียบเทียบเป็นเปอร์เซ็นต์ โดยถือตามจำนวนโครโมโซมที่มีเปอร์เซนต์สูงสุดในแต่ละชนิดเป็นจำนวนโครโมโซมของปลาชนิดนั้นๆ

การจัดคาริโอไทป์ดัดแปลงจากวิธีของ Levan *et al.* (1964) โดยนำฟิล์มที่โครโมโซมกระจายตัวดี และชัดเจนที่สุดของปลาแต่ละชนิดมา 10 เซลล์ นำไปอัดขยาย วัดความยาวของแขนข้างสั้น (Ls) และความยาวของแขนข้างยาว (Ll) ซึ่งมีหน่วยเป็นความยาวเชิงสัมพัทธ์ โดยวัดจากตำแหน่ง centromere ไปยังปลายโครโมโซมทั้ง 2 ด้าน คำนวณค่า Centromeric index (C.I.) = Ll/Lt (โดยที่ Lt = total length) แบ่งชนิดโครโมโซม (ดังตาราง 1) จับคู่โครโมโซมโดยอาศัยค่า C.I. จากนั้นเลือกภาพโครโมโซมของปลาแต่ละชนิดในระยะ เมทาเฟสที่กระจายตัวดีมาทำคาริโอไทป์

Table 1 Fish chromosome classification by centromeric index (C.I.)

Chromosome type	Symbol	Centromeric Index
Metacentric	m	0.50-0.59
Submetacentric	sm	0.60-0.75
Subtelocentric	st	0.76-0.89
Acrocentric	a	มากกว่า 0.90

ผลการทดลอง

ผลการวิจัยพบว่าปลานิล ปลาหมอเทศ และปลานิลแดงทั้งเพศผู้และเพศเมีย มีจำนวนโครโมโซม 2n=44 เท่ากัน (ตาราง 2) และพบว่าในปลาชนิดเดียวกันจะมีรูปแบบคาริโอไทป์เหมือนกัน แต่ในปลาต่างชนิดกันรูปแบบคาริโอไทป์แตกต่างกัน (ตาราง 3 และภาพ 1-3)

Table 2 Chromosome of *Oreochromis niloticus*, *O. mossambicus* and Red tilapia

Species	Total cell count	Cell count number											
		37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
Male Nile tilapia	100	1		4	3	2	4	4	81				1
Female Nile tilapia	100			2	3	5	6	9	74		1		
Male mossambica	100			1	3		6	8	82	1			
Female mossambica	100				3	2	6	4	85				
Male red tilapia	100		2	3		5	7	3	80				
Female red tilapia	100	1			4	3	5	6	79	2			

Table 3 Chromosome number, karyotypes and number of biarmed in *Oreochromis niloticus*, *O. mossambicus* and Red tilapia

Species	2n	Karyotypes (pair)	Number of biarmed	NF
Male Nile tilapia	44	1sm+6st+14a	14	58
Female Nile tilapia	44	1sm+6st+14a	14	58
Male mossambica	44	6sm+2st+14a	16	60
Female mossambica	44	6sm+2st+14a	16	60
Male red tilapia	44	1sm+3st+18a	8	52
Female red tilapia	44	1sm+3st+18a	8	52

Note: NF = fundamental number

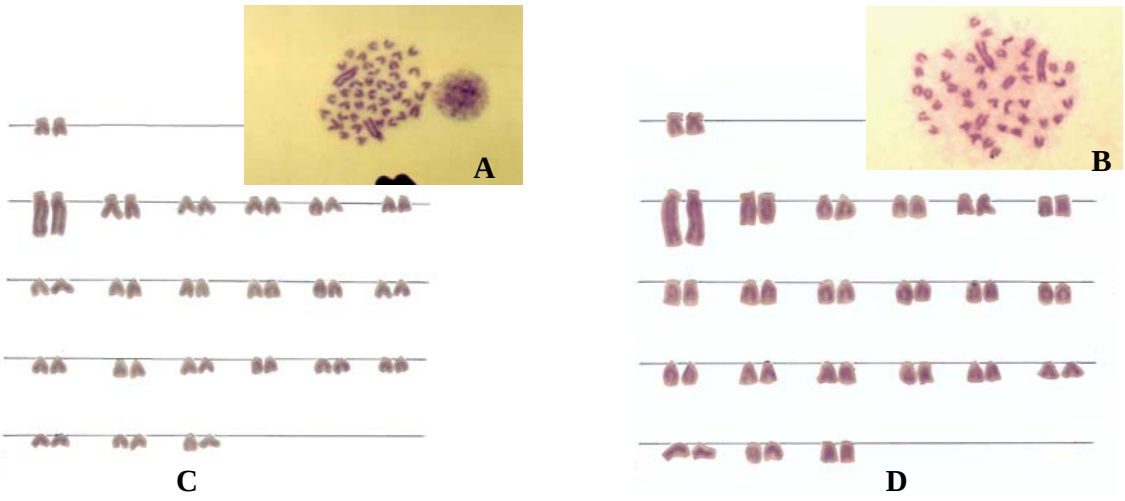

Figure 1 Chromosome at metaphase of male *O. niloticus* (A) and female (B)

Karyotypes of male *O. niloticus* (C) and female (D)

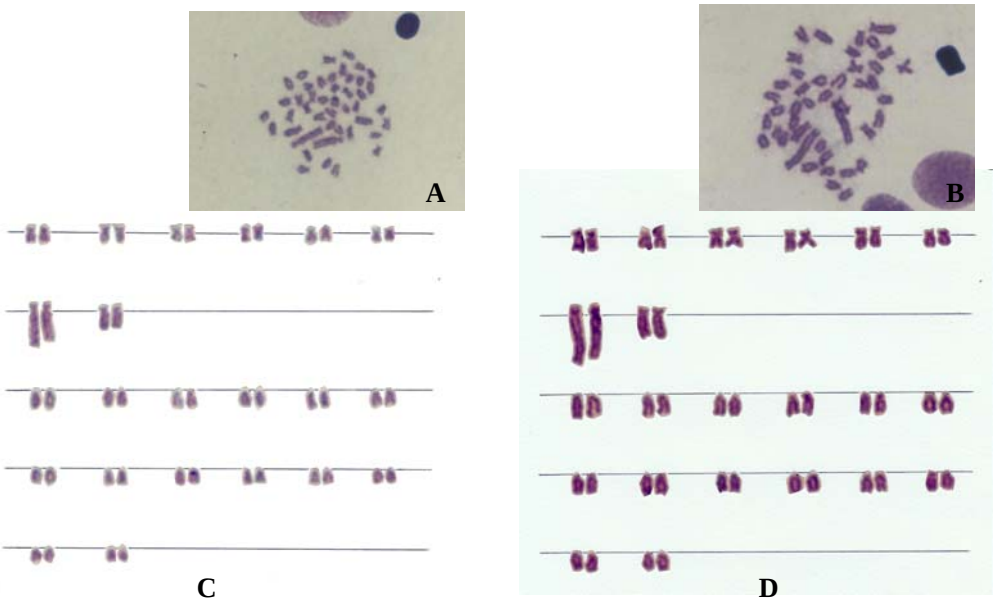

Figure 2 Chromosome at metaphase of male *O. mossambicus* (A) and female (B)

Karyotypes of male *O. mossambicus* (C) and female (D)

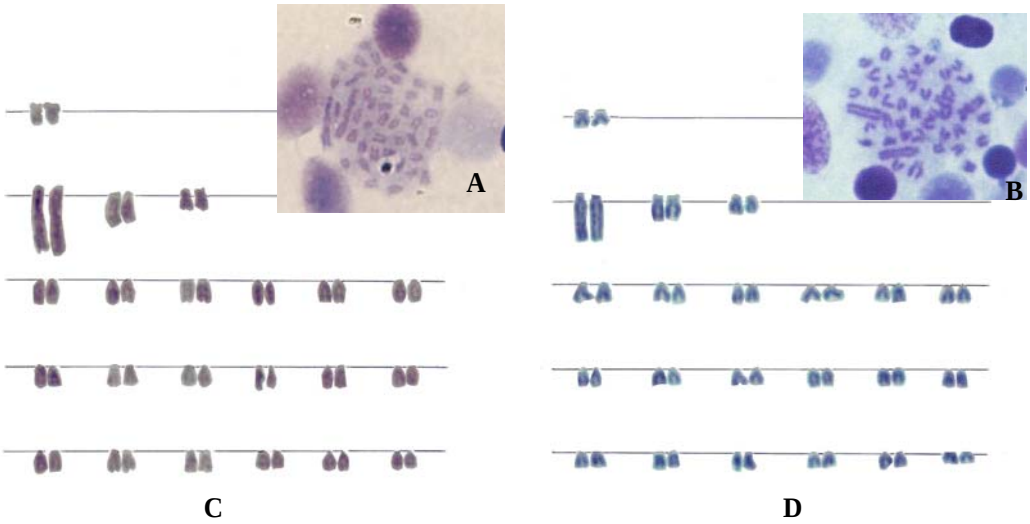

Figure 3 Chromosome at metaphase of male Red tilapia (A) and female (B)

Karyotypes of male Red tilapia and female (D)

วิจารณ์

จากการศึกษาปลาทั้ง 3 ชนิดทั้งเพศผู้และเพศเมีย พบว่ามีจำนวนโครโมโซม 2n=44 เท่ากัน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าปลาในกลุ่ม Tilapias มีจำนวนโครโมโซม 2n=44 ถึง 2n=48 (Chew *et al.*, 2002) นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยอีกเป็นจำนวนมากระบุว่าปลาในสกุล *Oreohcromis* ส่วนใหญ่มีจำนวนโครโมโซม 2n=44 (ตาราง 4) และการศึกษาครั้งนี้ยังพบว่าปลาเพศผู้และเพศเมียของปลาแต่ละชนิดมีคาริโอไทป์เหมือนกัน และไม่พบโครโมโซมเพศ จากข้อมูลที่ได้นี้ไม่ได้หมายความว่าปลานิลไม่มีโครโมโซมเพศ ซึ่งสาเหตุดังกล่าวเป็นเพราะระบบการควบคุมเพศในปลากลุ่มปลานิลไม่อาจตรวจสอบได้โดยคาริโอไทป์ แต่จะตรวจสอบได้โดยใช้เทคนิคการ

เปลี่ยนเพศ โดยนำปลาเพศเมียปกติ (XX หรือ ZW) มาผสมพันธุ์กับปลาเพศผู้ที่เกิดจากการเปลี่ยนเพศ (XX หรือ ZW) แล้วศึกษาสัดส่วนเพศของลูกที่ได้ ซึ่งสัดส่วนของลูกที่ได้จะค่อนข้างแน่นอน (อุทัยรัตน์, 2543) ซึ่งจากรายงานก่อนหน้านี้ระบุว่าปลานิลและปลาหมอเทศมีโครโมโซมเพศระบบ XY คือเพศเมียมีโครโมโซมเพศเป็นแบบ XX และเพศผู้มีโครโมโซมเพศแบบ XY (Carrasco *et al*., 1999; Campos-Ramos *et al*., 2003) เกิดการเปลี่ยนแปลงของโครโมโซมในปลาได้

Table 4 Comparative study on karyotypes and number of biarmed

Species	2n	คาริโอไทป์	NF	number of biarmed	เอกสารอ้างอิง
O. niloticus	44	1m+8sm+1st	62	18	Arai and Koike (1980)
	44	-	-	14	Crosetti *et al.* (1988)
	44	9st+13a	62	-	Keravit (2547)
	44	1sm+6st+15a	58	14	Present trial
O. mossambicus	44	3sm+4st+15a	50	6	Majumdar and McAndrew (1986)
	44	-	-	6	Crosetti *et al.* (1988)
	44	3sm+5st+14a	60	-	Keravit (2547)
	44	6sm+2st+14a	60	16	Present trial
Red tilapia	44	1sm+3st+18a	52	-	Keravit (2547)
	44	1sm+3st+18a	52	8	Present trial
Hybrid (*O. niloticus* X *O.mossambicus*)	44	-	-	10	Crosetti *et al.* (1988)

นอกจากนี้ยังพบอีกว่าในปลาชนิดเดียวกันจะมีรูปแบบคาริโอไทป์แตกต่างกัน (ตาราง 4) สาเหตุดังกล่าวอาจเนื่องมาจากปลาที่นำมาทำการศึกษาเป็นปลาต่างกลุ่มประชากรกัน ดังเช่นการศึกษาของ Stivari and Martins-Santos (2004) ในปลา *Rhamdia quelen* จากต่าง 2 แหล่งน้ำ คือ แม่น้ำ Taquarussu และลำธาร Maringá ในประเทศบราซิล พบว่ามีจำนวนโครโมโซม 2n=58 เท่ากัน แต่มีรูปแบบคาริโอไทป์ต่างกันคือ 26m+20sm+6st+6a และ 26m+22sm+6st+4a ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบความแตกต่างของรูปแบบคาริโอไทป์ แต่มีจำนวนโครโมโซมเท่ากัน ในปลาชนิดเดียวกันที่พบรายงานในประเทศไทยอีก 3 ชนิด ได้แก่ ปลาพรม (*Osteochilus melanopleura*) ซึ่งมีคาริโอไทป์ประกอบด้วย 36m+10sm+2st+2a (ธวัช และวิเชียร, 2538) และ 36m+10sm+4t (ธวัช และคณะ, 2544) ปลาสร้อยนกเขา (*O. hasselti*) มีคาริโอไทป์ประกอบด้วย 30m+14sm+6st (Magtoom and Arai, 1990) และ 26m+14sm+6st+4a (ธวัช และคณะ, 2544) และปลาร่องไม้ตับ (*O. vittatus*) มีคาริโอไทป์ประกอบด้วย 16m+30sm+4st (Magtoom and Arai, 1990) และ

26m+10sm+14a (ธวัช, 2540) และที่สำคัญอีกประการคือปลาในกลุ่ม Tilapias โดยเฉพาะปลาปลาทั้ง 3 ชนิดนี้ถูกปรับปรุงพันธุ์โดยมนุษย์เป็นระยะเวลาที่นานมากแล้ว และปลาที่ผ่านการปรับปรุงพันธุ์บางส่วนยังอาจจะไปผสมพันธุ์กับปลาในธรรมชาติได้ โดยการปล่อยสู่แหล่งน้ำโดยตรงหรือหลุดออกจากบ่อเลี้ยง สาเหตุเหล่านี้ล้วนส่งผลทำให้เกิดการปนเปื้อนทางพันธุกรรมในปลากลุ่มนี้ ซึ่งสอดคล้องกับคำกล่าวของ Devlin and Nagahama (2002) ซึ่งกล่าวว่าปลาที่มีการปรับปรุงพันธุ์เป็นระยะเวลาที่ยาวนานอาจจะส่งผลทำให้มีพันธุกรรมที่แตกต่างกัน นอกจากนี้สิ่งแวดล้อมต่างๆ ภายนอกร่างกาย เช่น อุณหภูมิ และมลพิษภายนอกร่างกายต่างๆ ล้วนส่งผลทำให้

การศึกษาครั้งนี้พบว่าปลานิลแดงมีคาริโอไทป์ตรงกับการศึกษาของกีรวิชญ์ (2547) คือ 1sm+3st+18a ซึ่งปลานิลแดงที่นำมาศึกษาเป็นปลาต่างกลุ่มประชากรกัน โดยการศึกษาครั้งนี้ใช้ปลานิลแดงจากจังหวัดพะเยาส่วนการศึกษาของกีรวิชญ์ (2547) ใช้ปลานิลแดงจากจังหวัดกาฬสินธุ์ ดังนั้นจึงอาจกล่าวได้ว่าปลานิลแดงมีความหลากหลายของคาริโอไทป์น้อยกว่าปลานิลและปลาหมอเทศ

สรุปผลการทดลอง

ปลานิล ปลาหมอเทศ และปลานิลแดง มีจำนวนโครโมโซม 2n=44 เท่ากัน และในปลาเพศผู้และเพศเมียที่เป็นชนิดเดียวกันมีคาริโอไทป์เหมือนกัน แต่ในปลาต่างชนิดกันพบว่ารูปแบบของคาริโอไทป์ต่างกัน ดังนี้ 2sm+12st+30a (NF=58), 12sm+4st+28a (NF=60) และ 2sm+6st+36a (NF=52) ข้อมูลคาริโอไทป์ที่ได้จากการศึกษานี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ด้านเซลล์อนุกรมวิธานและการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของปลาได้

เอกสารอ้างอิง

กีรวิชญ์ เพชรจุล. 2547. Karyotypic analysis of Tilapias in Thailand. วิจัยและส่งเสริมวิชาการเกษตร 22 (ฉบับพิเศษ): 102-107.

ปกรณ์ อุ่นประเสริฐ. 2541. การเลี้ยงปลาหมอเทศ. [ออนไลน์]. http://web.ku.ac.th2agri/f_ mor/index 1.html. สืบค้น 28 มิถุนายน 2548.

ธวัช ดอนสกุล. 2540. การศึกษาโครโมโซมของปลาสร้อยขาว ปลาร่องไม้ตับ ปลาเขยา และปลาซิวใบไผ่ที่พบในประเทศไทย. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 35. สาขาประมง: 155-164.

ธวัช ดอนสกุล และ วิเชียร มากตุ่น. 2538. คารีโอไทป์ของปลาพรม ปรากระมัง ปลาแปบ และปลาซิวควายที่พบในประเทศไทย. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 33. สาขาประมง : 128-138.

ธวัช ดอนสกุล วิเชียร มากตุ่น และอนันต์ พู่พิทยาสถาพร. 2544. คาริโอไทป์ของปลาร่องไม้ตับ ข้างลาย สร้อย-นกเขา และปลาพรม ที่พบในประเทศไทย. สัมมนาวิชาการพันธุศาสตร์ ครั้งที่ 12, 28-30 มีนาคม 2544, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ: 218-221.

อุทัยรัตน์ ณ นคร. 2543. พันธุศาสตร์สัตว์น้ำ. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 203 น.

Arai, R. and A. Koike. 1980. A karyotype study of two species of freshwater fishes transplanted into Japan. Bull. Nat. Sci. Mus. (Tokyo) 7: 87-100.

Campos-Ramos, R., S.C. Harvey, B.J. McAndrew and D.J. Penmam. 2003. An investigation of sex determination in the Mozambique tilapia, *Oreochromis mossambicus*, using synaptonemal complex analysis, FISH, sex reversal and gynogenesis. Aquaculture 221: 125-140.

Carrasco, L.A.P., D.J. Penman and N. Bromage. 1999. Evidence for the presence of sex chromosomes in the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from synaptonemal complex analysis of XX, XY and YY genotypes. Aquaculture 173: 207-218.

Chen, T. R. and A. W. Ebeling. 1968. Karyological evidence of female heterogamety in the mosquito fish, *Gambusia affinis*. Copeia. 1: 70-75.

Chew, J.S.K., C. Oliveira, J.M. Wright and M.J. Dobson. 2002. Molecular and cytogenetic analysis of the telomeric (TTAGGG)n repetitive sequences in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Teleostei: Cichlidae). Chromosoma 111: 45-52.

Crosetti, D., Sola, L., Brunner, P. and Cataudella, S. 1998. Cytogenetic characterization of *Oreochromis nilotica, O. mossambicus* and their hybrid: P. 143-151. *In* Pullin, R.S.V. Bhukaswan, T., Tonguthai, K. and Maclean, J. L. The second international symposium on Tilapia in aquaculture. Department of Fisheries, Bangkok, Thailand, and Intenational Center for Living Aquatic Resources Management, Manila, Philippines.

Devlin, R.H. and Y. Nagahama. 2002. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. Aquaculture 208: 191-364.

Gary, H.T. and E.D. Jane. 1990. Chromosome preparation and analysis: p. 171-190. *In* Schreck, C. B. and P. B. Moyle. Methods for fish biology. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland, USA.

Levan, A., K. Fredga and A.A. Sandberg. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. Hereditas 52: 201-220.

Lutz, C.G. 2001. Practical genetics for aquaculture. MPG Books Ltd, Bodmin, Cornwall, UK. 235 p.

Magtoon, W. and R. Arai. 1990. Karyotype of three Cyprinid fishes, *Osteochilus husselti*, *O. vittatus*, and *Labiobarbus lineatus*, from Thailand. Japan. J. Ichthyol. 36(4): 483-486.

Matthew, L. 1992. Introduction to aquaculture. John, W. and Sons, Inc. USA.

Nanda, I., M. Schsrtl, W. Fiechtinger, I. Schlupp, J. Parzefall, and M. Schmid. 1995. Chromosomal evidence for laboratory synthesis of triploid hybrid between the gynogenetic teleost *Poecilia Formosa* and its host species. J. Fish Biol. 47: 619-623.

Nelson, J. 1994. Fishes of the world. 3rd ed. John Wiley & Sons., New York. 600 p.

Stivari, M. K. and I. C. Martins-Santos. 2004. Karyotype diversity in two populations of *Rhamdia quelen* (Pisces, Heptapteridae). Cytologia. 69 (1): 25-34.