กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม ที่เห็นคุณค่าของงานวิจัยเรื่องพันธุศาสตร์เซลล์ของปลาทะเลสวยงามในประเทศไทยและได้สนับสนุนทุนวิจัยเพื่อการดำเนินงานโครงการวิจัยในครั้งนี้ ขอบคุณศูนย์วิทยาศาสตร์ และ สาขาวิชาชีววิทยา สาขาชีววิทยาศึกษา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ในการทำวิจัย

ขอบคุณทีมงานและนักวิจัยทุกท่าน ในความเสียสละในการทำงานวิจัยครั้งนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ผู้วิจัย

2561

ชื่อเรื่อง : พันธุศาสตร์เซลล์ของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกบางชนิดในพื้นที่มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม

ผู้วิจัย : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พรณรงค์ สิริปิยสิงห์
นางสาวจิรการนต์ ศรีหาบุตร
นางสาวชลธิชา อุ่นบุญ
นางสาวช่อเพชร ย่อมสวัสดิ์

หน่วยงาน : มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม

ปีที่แล้วเสร็จ : พ.ศ. 2561

บทคัดย่อ

การวิจัยครั้งนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกบางชนิดในพื้นที่มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม ซึ่งครั้งนี้สำรวจพบสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก 6 ชนิด ได้แก่ อึ่งอ่างบ้าน อึ่งเพ้า อึ่งก้นขีด กบนา เขียดโม่ และคางคกบ้าน ได้ทำการศึกษาคาริโอไทป์สำเร็จ 3 ชนิด มีผลการวิจัยดังนี้ คาริโอไทป์ของกบนา เขียดโม่ และคางคกบ้านที่พบในมหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม ผลจากการเตรียมโครโมโซมโดยตรงด้วยเซลล์ไขกระดูก พบว่ากบนาเพศผู้และเพศเมีย มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ คือ 26 แท่ง (13 คู่) มีจำนวนโครโมโซมพื้นฐาน (NF) เท่ากับ 52 แท่ง คาริโอไทป์ของกบนาเพศผู้ประกอบด้วยโครโมโซมชนิดเมทาเซนทริกขนาดใหญ่ 2 แท่ง ซับเมทาเซนทริกขนาดใหญ่ 1 แท่ง เมทาเซนทริกขนาดกลาง 2 แท่ง เมทาเซนทริกขนาดเล็ก 7 แท่ง ซับเมทาเซนทริกขนาดเล็ก 1 แท่ง มีสูตรคาริโอไทป์ ดังนี้ 2n (26) = L^{m}_{2} + L^{sm}_{1} + M^{m}_{2} + S^{m}_{7} + S^{sm}_{1} และกบนาเพศเมียประกอบด้วยโครโมโซมชนิดเมทาเซนทริกขนาดใหญ่ 3 แท่ง ซับเมทาเซนทริกขนาดใหญ่ 1 แท่ง เมทาเซนทริกขนาดกลาง 2 แท่ง เมทาเซนทริกขนาดเล็ก 6 แท่ง และซับเมทาเซนทริกขนาดเล็ก 1 แท่ง มีสูตรคาริโอไทป์ ดังนี้ 2n (26) =L^{m}_{3} + L^{sm}_{1} + M^{m}_{2}+ S^{m}_{6} + S^{sm}_{1} เขียดโม่เพศผู้และเพศเมีย มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์คือ 26 แท่ง (13 คู่) มีจำนวนโครโมโซมพื้นฐาน (Fundamental number , NF) เท่ากับ 52 แท่ง เขียดโม่เพศผู้ประกอบด้วยโครโมโซมชนิด เมทาเซนทริกขนาดใหญ่ 1 แท่ง ซับเมทาเซนทริกขนาดใหญ่ 3 แท่ง เมทาเซนทริกขนาดกลาง 2 แท่ง เมทาเซนทริกขนาดเล็ก 4 แท่ง ซับเมทาเซนทริกขนาดเล็ก 3 แท่ง เมื่อนำค่าจากการวัดขนาดของโครโมโซม 10 เซลล์ มาเฉลี่ยทำให้สามารถทำอิดิโอแกรมของเขียดโม่เพศผู้ชนิดนี้ได้ การศึกษาครั้งนี้ทำให้ได้สูตรคาริโอไทป์ของเขียดโม่เพศผู้ ดังนี้ 2n (26) = L^{m}_{1} + L^{Sm}_{3} + M^{m}_{2} + S^{Sm}_{3} + S^{m}_{4} และเขียดโม่เพศเมียประกอบด้วยโครโมโซมชนิด เมทาเซนทริกขนาดใหญ่ 3 แท่ง ซับเมทาเซนทริกขนาดใหญ่ 1 แท่ง เมทาเซนทริกขนาดกลาง 1 แท่ง เมทาเซนทริกขนาดเล็ก 8 แท่ง เมื่อนำค่าจากการวัดขนาดของโครโมโซม 10 เซลล์ มาเฉลี่ยทำให้สามารถทำอิดิโอแกรมของเขียดโม่เพศเมียชนิดนี้ได้ การศึกษาครั้งนี้ทำให้ได้สูตรคาริโอไทป์ของเขียดโม่เพศเมีย ดังนี้ 2n (26) = L^{m}_{3} + L^{St}_{1} + M^{m}_{1} + S^{m}_{8} และคางคกบ้านเพศผู้และเพศเมีย มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์คือ 22 แท่ง (11 คู่) มีจำนวนโครโมโซมพื้นฐาน (Fundamental number , NF) เท่ากับ 44 แท่ง คางคกเพศผู้ประกอบด้วยโครโมโซมชนิด เมทาเซนทริกขนาดใหญ่ 4 แท่ง เมทาเซนทริกขนาดกลาง 1 แท่ง เมทาเซนทริกขนาด

เล็ก 6 แท่ง มาเฉลี่ยทำให้สามารถทำอิดิโอแกรมของคางคกเพศผู้ชนิดนี้ได้ การศึกษาครั้งนี้ทำให้ได้สูตรคาริโอไทป์ของคางคกเพศผู้ ดังนี้ 2n (22) = L^{m}_{4} + M^{m}_{1} + S^{m}_{6} และเพศเมียประกอบด้วยโครโมโซมชนิด เมเซนทริกขนาดใหญ่ 4 แท่ง เมทาเซนทริกขนาดกลาง 2 แท่ง เมทาเซนทริกขนาดเล็ก 5 แท่ง มาเฉลี่ยทำให้สามารถทำอิดิโอแกรมของคางคกเพศผู้ชนิดนี้ได้ การศึกษาครั้งนี้ทำให้ได้สูตร คาริโอไทป์ของคางคกเพศผู้ ดังนี้ 2n (22) = L^{m}_{4} + M^{m}_{2} + S^{m}_{5}

TITLE : Cytogenetics of Some Amphibians in Rajabhat Mahasarakam University.
AUTHOR : Asst. Prof. Dr. Pornarong Siripiyasing
Miss Chirakan Sihabut
Miss Chonthicha Auboon
Miss Chorpet Yomsawad
ORGANIZATION : Biology, Faculty of Science and Technology
Rajabhat Mahasarakham University
PRINTED : 2018

Abstract

The purpose of this research was to expolve some amphibians in Rajabhat Maha Sarakham University. This research found 6 species as following *Kaloula pulchra, Glyphoglossus molossus, Kaloula mediolineata, Hoplobatrachus rugulosus, Ferjervaya limnocharis, Duttaphrynus melanostictus* and successful to karyotypes of 3 amphibians, namely *Hoplobatrachus rugulosus*, *Ferjervaya limnocharis* and *Duttaphrynus melanostictus*. For the result of chomosomes which was prepared from bone marrow cells, it was found that *Hoplobatrachus rugulosus*, both male and female, had number of diploid chromosome 26 (13 pairs) and the fundamental number (NF) was 52 .The chormosomes from *Hoplobatrachus rugulosus* male presences of 2 large metacentric, 1 large submatacentric, 2 medium submatacentric, 7 small metacentric and 1 sub small metacentric. The karyotype formulas could be decuced as : 2n (26) = L^{m}_{2} + L^{sm}_{1} + M^{m}_{2} + S^{m}_{7} + S^{sm}_{1}. The chormosomes from *Hoplobatrachus rugulosus* females presences of 3 large metacentric, 1 large submetacentric, 2 medium metacentric, 6 small metacentric and 1 small submetacentric. The karyotype formulas could be decuced as : 2n (26) = L^{m}_{3} + L^{sm}_{1} + M^{m}_{2}+ S^{m}_{6} + S^{sm}_{1}. The results from *Ferjervaya limnocharis* presences the diploid chromosome number (2n) was 2n=26 and the fundamental number (NF) was 52. The chormosomes from *Ferjervaya limnocharis* males presences of 1 large metacentric, 3 large submetacentric, 2 medium metacentric, 4 small metacentric and 3 small submetacentric. The karyotype formulas could be decuced as : 2n (26)= L^{m}_{1} + L^{Sm}_{3} + M^{m}_{2} + S^{Sm}_{3} + S^{m}_{4}. The chormosomes from. *Ferjervaya limnocharis* females presences of 3 large metacentric , 1 large submetacentric , 1 medium metacentric 8 small metacentric. The karyotype formulas could be decuced as : 2n (26) = L^{m}_{3} + L^{Sm}_{1} + M^{M}_{1} + S^{m}_{8} and the results from *Duttaphrynus melanostictus* showed that the

diploid chromosome number (2n) was 2n=22 and the fundamental number (NF) was 44 . The chormosomes from *Duttaphrynus melanostictus* males presences of 4 large metacentric, 1 medium matacentric and 6 small metacentric.The karyotype formulas could be decuced as : 2n (22) = L^{m}_{4} + M^{m}_{1} + S^{m}_{6} and the chormosomes from *Duttaphrynus melanostictus* females presences. Of 4 large metacentric, 2 medium matacentric and 5 small metacentric. The karyotype formulas could be be decuced as : 2n (22) = L^{m}_{4} + M^{m}_{2} + S^{m}_{5}.

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการทำวิจัย

ปัจจุบันการใช้ทรัพยากรธรรมชาติอย่างไม่มีขอบเขตจำกัด ขาดการอนุรักษ์ การรักษา และการควบคุมอย่างเหมาะสม ทำให้ทรัพยากรธรรมชาติและมีจำนวนลดลงอย่างรวดเร็วประกอบกับประเทศไทยมีประชากรเพิ่มขึ้นมาก จำเป็นต้องอาศัยพื้นดินและแหล่งน้ำในการทำเกษตรกรรม พื้นที่ป่าถูกบุกรุกมากขึ้นและมีการปล่อยของเสียลงสู่แหล่งน้ำทำให้เกิดมลพิษขึ้นในสิ่งแวดล้อมส่งผลกระทบต่อประชากรพืชและสัตว์โดยเฉพาะกลุ่มสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก (amphibians) ได้แก่ กบ เขียด อึ่งอ่าง คางคก และปาด ซึ่งในช่วงวัยอ่อนต้องอาศัยแหล่งน้ำเป็นที่อยู่อาศัย สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกมีประโยชน์ต่อมนุษย์ทั้งทางตรงและทางอ้อม กบ เขียด อึ่งอ่าง เป็นแหล่งอาหารโปรตีน โดยเฉพาะกับประชากรที่อาศัยในชนบท คางคก และปาด ถึงใช้เป็นอาหารไม่ได้แต่ก็มีส่วนช่วยในการกำจัดแมลงศัตรูพืชไม่ให้แพร่ระบาดมากจนเกินไป ตัวอ่อนหรือลูกอ๊อดที่อาศัยอยู่ในน้ำก็เป็นตัวช่วยควบคุมปริมาณของสัตว์น้ำขนาดเล็กให้อยู่ในภาวะสมดุล และลูกอ๊อดเองก็เป็นอาหารเป็นอาหารของสัตว์น้ำชนิดอื่นๆ นอกจากนี้สภาพความสมบูรณ์ของตัวเต็มวัยยังเป็นดัชนีบ่งบอกถึงสภาวะมลพิษในอากาศและสิ่งแวดล้อมได้เป็นอย่างดี สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกเป็นประโยชน์ต่อการเกษตรกรรมแผนใหม่ที่ลดการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืช โดยปล่อยให้สัตว์ในธรรมชาติควบคุมแทน คางคกบ้านหนึ่งตัวสามารถกำจัดปลวกได้นับพันตัวในช่วงเวลาคืนเดียว กบอื่น ๆ ก็สามารถกำจัดแมลงทั้งที่อยู่ในน้ำและบนบกได้เป็นจำนวนมาก (ธัญญา จั่นอาจ,2546)

สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกกลุ่มอึ่งอ่าง คางคกมีโอกาสเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ เนื่องจากการทำลายป่าต้นน้ำ ลำธาร ซึ่งเป็นแหล่งที่อยู่อาศัยตามธรรมชาติที่สำคัญอย่างยิ่ง คือ ขาดความรู้พื้นฐานที่จะนำไปใช้ในการจัดการอย่างเหมาะสมเพื่อประโยชน์ในแนวทางการอนุรักษ์ (จารุจินต์ นภีตะภัฎ, 2531) ปัจจุบันกรมป่าไม้ออกพระราชบัญญัติให้คางคก 3 ชนิด คือ จงโครง (*Phrynoidis aspera*) คางคกหัวราบ (*Bufo macrotis*) และคางคกแคระ (*Bufo parvas*) เป็นสัตว์ป่าคุ้มครองประเภทที่ 1 คือ เป็นสัตว์ป่าปกติไม่นิยมใช้บริโภคเป็นอาหารหรือไม่ล่าเป็นเกมกีฬา แต่เป็นสัตว์ที่ช่วยกำจัดศัตรูพืช ขจัดสิ่งปฏิกูลหรือเป็นสัตว์ป่าที่ควรสงวนไว้เพื่อมิให้จำนวนลดลง (สมชาย เลี้ยงพรพรรณ, 2540) กบหลายชนิดมีการแพร่กระจายทั่วทุกภาคของประเทศไทย มีประโยชน์หลายด้าน เช่น ประโยชน์ทางตรงเป็นอาหาร เนื้อเป็นที่นิยมบริโภคกันมากในปัจจุบัน เนื่องจากมีโปรตีนที่มีคุณค่าทางอาหารสูง และทางการค้าสามารถเพิ่มพูนรายได้ให้กับครอบครัวและประเทศชาติ หนังสามารถนำไปทำกระเป๋ารองเท้า เครื่องดนตรี และของชำรวยต่าง ๆ ส่วนหัวอวัยวะระบบทางเดินอาหารและกระดูกที่ตัดชำแหละแล้ว นำไปใช้เป็นอาหารเลี้ยงสัตว์ได้ ประโยชน์ทางอ้อม คือ ในระบบนิเวศวิทยา กบช่วยทำลายแมลง (ภาณุวัฒน์ นาคสิงห์, 2546)

ปัจจุบันได้มีการนำเอาความรู้ทางด้านพันธุศาสตร์เซลล์ (cytogenetics) ซึ่งเกี่ยวกับโครโมโซม (chromosome) และคาริโอไทป์ (karyotype) ด้านชีวเคมี (biochemistry) วิทยาภูมิคุ้มกัน (immunology) ตลอดจนชีววิทยาระดับโมเลกุล (molecular biology) เข้ามาช่วยในการ

จัดจำแนก ทำให้ข้อผิดพลาดด้านอนุกรมวิธาน ลดน้อยลง (ธวัช ดอนสกุล, 2546) กบบางชนิดซึ่งมีรูปร่างลักษณะลวดลาย สีสัน ภายนอกคล้ายคลึงกันมาก ซึ่งคาริโอไทป์สามารถที่จะช่วยบ่งบอกถึงความแตกต่างของกบแต่ละชนิดได้ ความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) เกิดจากความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) ของสิ่งมีชีวิต ส่งผลให้เกิดความแตกต่างในระดับรหัสพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต ทำให้สิ่งมีชีวิตชนิดเดียวหรือต่างชนิดกันที่มียีนที่แตกต่างกัน เกิดโปรตีนและกระบวนการชีวเคมีที่ต่างกันออกไป สิ่งมีชีวิตจึงมีความหลากหลายในทางพันธุกรรมที่ปรากฏออกมา ความหลากหลายทางพันธุกรรมปรากฏออกมาใน 2 ระดับ คือ ระดับโครโมโซม และระดับโมเลกุล ในระดับโครโมโซมสามารถตรวจสอบด้วยเทคนิคทางพันธุศาสตร์เซลล์ ส่วนในระดับโมเลกุล ซึ่งได้แก่ ดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอ และโปรตีน สามารถตรวจสอบได้โดยเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุลเช่น polymerase chain reaction (PCR), electrophoresis, Southem blotting, Northem blotting, Westem blotting เป็นต้น (ประดิษฐ์ พงษ์ทองคำ, 2546; สมพร ประเสริฐส่งสกุล, 2547)

พันธุศาสตร์เซลล์เป็นการศึกษาโครโมโซมซึ่งเป็นหน่วยโครงสร้างที่สำคัญในการถ่ายทอดพันธุกรรมของเซลล์ การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโครโมโซมย่อมมีผลโดยตรงต่อการถ่ายทอดทางพันธุกรรม ทำให้เกิดการแสดงออกในสิ่งมีชีวิตในรูปแบบที่แตกต่างกัน มีผลต่อการเจริญพัฒนา และวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต (อมรา คัมภิรานนท์, 2546) เนื่องจากสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดจะมีจำนวน และรูปร่างของโครโมโซมที่จำเพาะ สิ่งมีชีวิตบางกลุ่มที่มีความใกล้ชิดกันทางสายวิวัฒนาการเมื่อตรวจสอบโครโมโซมพบว่ามีโครโมโซมหลายๆคู่ที่เหมือนกันในบางครั้งจำนวนโครโมโซมและลักษณะคาริโอไทป์ถูกนำมาใช้เป็นข้อมูลที่สำคัญประกอบการจัดจำแนกสัตว์ ที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology) คล้ายกันจนไม่สามารถแยกความแตกต่างได้ (Giessmann, 2002) การศึกษาสิ่งมีชีวิตด้านพันธุศาสตร์เซลล์มีค่อยข้างน้อย ถึงแม้ว่าข้อมูลพื้นฐานที่ได้จากการศึกษาจะมีความสำคัญในการนำไปประยุกต์ใช้ด้านต่างๆ เช่น ด้านอนุกรมวิธาน การศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ การปรับปรุงพันธุ์ นอกจากนี้ยังใช้ประโยชน์ด้านการศึกษาโรคทางพันธุกรรมที่เกิดจากความผิดปกติของโครโมโซม

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม มีเนื้อที่ทั้งหมด 800 ไร่ เป็นพื้นป่าซึ่งมีความอุดมสมบูรณ์และความหลากหลายของชนิดพันธุ์ทั้งพืชและสัตว์ สัตว์ในกลุ่มสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกก็มีจำนวนที่หลากหลาย ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อระบบนิเวศ แต่ปัจจุบันพื้นที่ป่าส่วนใหญ่ภายในมหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคามกำลังถูกบุกรุก ทำให้สัตว์เหล่านั้นไม่มีที่อยู่อาศัยและทำให้ปริมาณลดน้อยลงในอัตราที่รวดเร็ว เสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ ปัจจุบันมีการศึกษาชีววิทยาของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในแง่ต่างๆ อย่างหลากหลาย เนื่องจากสัตว์กลุ่มนี้มีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมสามารถเป็นตัวบ่งชี้ทางชีววิทยา (biological indicator) เช่น ในแหล่งอุตสาหกรรมมักพบสัตว์จำพวกนี้น้อย เนื่องจากในบริเวณที่เป็นกรดจะทำให้ลูกอ๊อดที่เกิดมาเมื่อเจริญเป็นตัวเต็มวัยแล้วจะมีร่างกายพิการ เช่น แขนขากุด เป็นต้น การศึกษาในประเทศไทยส่วนใหญ่เป็นการศึกษาอนุกรมวิธานเพื่อจัดจำแนกโดยใช้ลักษณะลวดลายสีสัน และลักษณะทางสัณฐานวิทยาเป็นหลัก รวมทั้งในพื้นที่มหาวิทยาลัยขอนแก่น ซึ่งประชากรของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกแต่ละสกุล แต่ละชนิดย่อมมีจำนวนโครโมโซมและรูปร่างของโครโมโซมที่ต่างกัน ขณะเดียวกันประชากรในชนิดเดียวกันแต่อยู่ในแหล่งอาศัยต่างกันก็อาจมีรูปร่างของโครโมโซมที่ต่างกันได้ ทั้งนี้เนื่องจากอิทธิพลของความแตกต่างทาง

พันธุกรรม และสิ่งแวดล้อม การศึกษาในครั้งนี้จึงต้องจัดการศึกษาความเหมือนและแตกต่างของโครโมโซมดังกล่าว เพื่อใช้ในการจำแนกชนิด ขณะเดียวกันก็ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสิ่งแวดล้อมกับชนิดของโครโมโซม เพื่อเป็นข้อมูลในการประเมินหรือติดตามผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงของสิ่งมีชีวิต ซึ่งจะทำให้เกิดการบริหารจัดการความหลากหลายทางชีวภาพที่ยั่งยืนต่อไป

การศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกที่ผ่านมาในพื้นที่ของมหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคามยังไม่มีการศึกษาดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจเลือกศึกษาในพื้นที่นี้เพราะมีความสำคัญต่อการจัดการทรัพยากรสัตว์ การอนุรักษ์ การจัดการทรัพยากรท้องถิ่นอย่างยั่งยืน นอกจากนี้ข้อมูลทางด้านพันธุศาสตร์เซลล์ยังมีความสำคัญอย่างยิ่ง ที่ทำให้เราทราบถึงข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับโครโมโซม และนำไปใช้ร่วมกับการศึกษาด้านอนุกรมวิธาน และเชื่อมโยงความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการกับสัตว์กลุ่มอื่นๆ เป็นข้อมูลพื้นฐานทางด้านการปรังปรุงพันธุ์สัตว์เพื่อช่วยอนุรักษ์และขยายพันธุ์ รวมถึงการปรับปรุงพันธุ์เพื่อการค้าและเป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาด้านพิษวิทยาในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาโครโมโซมของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกบางชนิดในพื้นที่มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม โดยใช้เทคนิคการย้อมสีโครโมโซมแบบธรรมดา (conventional staining) การย้อมแถบสีแบบนอร์ (NOR-banding) และการย้อมสีแบบจี (G-banding)
2. เพื่อศึกษาระยะต่างๆ ของการแบ่งเซลล์เพื่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (meiosis) ของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกบางชนิดในพื้นที่มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
3. เพื่อศึกษาเปรียบเทียบจำนวน รูปร่าง และโครโมโซมเครื่องหมาย (chromosome marker) ของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกบางชนิดในพื้นที่มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
4. เพื่อจัดคาริโอไทป์ และอิดิโอแกรม (idiopram) มาตรฐานของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกบางชนิดในพื้นที่มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม และนำมาเปรียบเทียบกันระหว่างสัตว์แต่ละชนิด
5. เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาพันธุศาสตร์ด้านอื่น ๆ

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทำให้ทราบจำนวน รูปร่าง และโครโมโซมเครื่องหมายของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกบางชนิดในพื้นที่มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
2. ทำให้ทราบลักษณะคาริโอไทป์ของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกบางชนิดในพื้นที่มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม ข้อมูลนี้สามารถบ่งบอกความสัมพันธ์ในเชิงวิวัฒนาการ และใช้ประโยชน์สำหรับข้อมูลประกอบการจัดจำแนกสิ่งมีชีวิต (cytotaxonomy) ได้
3. ทำให้ทราบความเหมือนและแตกต่างระหว่างโครโมโซมของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกบางชนิดในพื้นที่มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม ข้อมูลนี้บ่งบอกความสัมพันธ์ระหว่างสัตว์ในกลุ่มนี้
4. เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาพันธุกรรมด้านอื่นๆ ของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก

1.4 ขอบเขตและข้อจำกัดการวิจัย

1. การศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกบางชนิดในพื้นที่มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม

2. การเตรียมโครโมโซมโดยใช้เทคนิคการเตรียมจากไขกระดูก

3. การย้อมสีโครโมโซมด้วยเทคนิคการย้อมสีแบบธรรมดา

4. ศึกษาจำนวน รูปร่างโครโมโซม ตรวจสอบหาเครื่องหมายของโครโมโซม จัดคาริโอไทป์ และทำอิดิโอแกรม โดยใช้เซลล์ระยะเมทาเฟสที่มีโครโมโซมกระจายตัวดี ชนิดละ 20 เซลล์

5. เปรียบเทียบคาริโอไทป์ และอิดิโอแกรมของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกบางชนิดในพื้นที่มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม

1.5 สถานที่ทำการวิจัย

1. ศูนย์วิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม

2. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

3. สถานที่เก็บตัวอย่าง คือ ภายในพื้นที่มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม อำเภอเมือง จังหวัดมหาสารคาม

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ลักษณะทั่วไปของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก

สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก (Amphibians) เป็นสัตว์ที่มีกระดูกสันหลังพวกแรกที่ขึ้นจากน้ำมาอยู่บนบก โดยวิวัฒนาการตัวเองมาจากปลาในยุคปลายดีโวเนียน (406 ล้านปีก่อน) ในปลาชั้น Sarcopterygii โดยเฉพาะปลาในชั้นย่อย Tetrapodomorpha ที่ปัจจุบันได้สูญพันธุ์และวิวัฒนาการมาเป็นสัตว์อย่างอื่นไปแล้ว ก่อนที่จะวิวัฒนาการเป็นสัตว์เลื้อยคลานต่อไป

ลักษณะสำคัญของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก คือ ผิวหนังมีต่อมเมือกทำให้ผิวหนังชุ่มชื้นตลอดเวลา ผิวหนังเปียกลื่นอยู่เสมอ ไม่มีเกล็ดตัวไม่แห้งหรือไม่มีขน มีขา 2 คู่ มีเหงือกไม่เป็นคู่ มีช่องจมูก 2 ช่องติดต่อถึงช่องปาก กะโหลกศีรษะมีปุ่มออกซิปิทอล (occipital condyle) 2 ปุ่ม หัวใจมี 3 ห้อง หายใจด้วยผิวหนัง เหงือก ปอด โดยชั้นผิวหนังนั้นมีลักษณะพิเศษสามารถแลกเปลี่ยนออกซิเจนได้เนื่องจากมีโครงข่ายหลอดเลือดฝอยจำนวนมาก เพื่อใช้ในการหายใจสืบพันธุ์โดยการผสมพันธุ์ภายนอกลำตัว สืบพันธุ์เมื่ออายุ 2–3 ปี วางไข่เป็นกลุ่มในน้ำมีสารเป็นวุ้นหุ้ม ไม่มีเปลือก ตัวอ่อนอาศัยอยู่ในน้ำ ตัวเต็มวัยอาศัยอยู่ในน้ำหรือในที่มีความชื้นบนบก พบตั้งแต่ยุคดีโวเนียนจนถึงปัจจุบัน มีอยู่ประมาณ 2,500 ชนิด (Taylor, 1962; Storer and Usinger, 1957) จากการสำรวจสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในประเทศไทยตั้งแต่ต้นจนถึงปี 2544 พบ 107 ชนิด (จารุจินต์, 2531) และ (ธัญญา จั่นอาจ, 2546) ได้รายงานไว้ 141 ชนิด

ลักษณะทั่วไปของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในอันดับกบเขียด (Order Anura) หรือกบ เขียด อึ่งอ่าง และคางคก มีดังนี้

ลักษณะลำตัวคอนข้างสั้น มี 4 ขา มีหลายกลุ่ม และมีรูปร่างแตกต่างกันหลายแบบ มีทั้งลำตัวขนาดเล็กจนถึงขนาดใหญ่ เช่น สกุลเขียดน้ำนองมีขนาดเล็กจนถึงขนาดใหญ่ บางกลุ่มมีตัวแบนเรียว เช่น ในสกุลกบเวียดนาม ปัจจุบันมีการค้นพบและอนุกรมวิธานแล้วกว่าเกือบ 4,800 ชนิด นับว่ามีความหลากหลายที่สุดของสัตว์ในชั้นนี้ มีด้วยกัน 14 วงศ์ แต่ในประเทศไทยพบด้วยกันทั้งหมด 6 วงศ์ (ธัญญา จั่นอาจ, 2546) ได้แก่

2.1.1. วงศ์อึ่งกราย (Family Megophryidae)

สกุล : *Leptobrachium*

ชื่อสามัญ : Smith's litter frog

ชื่ออื่น : อึ่งกรายลายเลอะ

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Leptobrachium smithi*

ภาพที่ 2.1 อึ่งผี หรือ งกรายหมอสมิธ (*Leptobrachium smithi*)

ที่มา: Matsui, et al, 1999

ลักษณะ : มีกระดูกสันหลังหน้ากระดูกก้นกบ 8 ปล้อง กระดูกสันหลังมีเซนทรัมเป็นแบบอย่างของแอมฟิซีลัส กระดูกหัวไหล่เป็นแบบอย่างของอาร์กซิฟเอรัล กระดูกแอสทรากาลัสและกระดูกแคลคาเนียมเชื่อมรวมกันเฉพาะส่วนต้นและส่วนปลาย ไม่มีชิ้นกระดูกแทรกระหว่างกระดูกนิ้ว 2 ชิ้นสุดท้าย ผิวหนังลำตัวมีต่อมเป็นจำนวนมาก นอกจากนี้แล้วหลายชนิดของทั้งตัวผู้และตัวเมียยังมีกลุ่มของต่อมบริเวณขาหนีบและซอกขาหน้า (Matsui, et al, 1999.)

2.1.2 วงศ์ปาด (Family Rhacophoridae)

สกุล : *Polypedates*

ชื่อสามัญ : -

ชื่ออื่น : ขี้ตะปาด

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Polypedates leucomystax*

ภาพที่ 2.2 ปาดบ้าน (*Polypedates leucomystax*)

ที่มา : Matsui, et al, 1999

ลักษณะ : มีความสามารถปรับเปลี่ยนสีได้ตามสภาพแวดล้อมที่อยู่อาศัยทั้งขาว, เหลือง, เทา, ชมพู, น้ำตาล จนถึงน้ำตาลเข้มออกดำ ปลายนิ้วทั้งหมดเป็นปุ่มกลม มีแผ่นยืดเป็นพังผืดระหว่างนิ้วเฉพาะขาหลังเท่านั้น ตีนเหนียวสามารถเกาะติดกับผนังได้ บริเวณด้านหลังระหว่างลูกตาผิวหนังจะแบนราบจนติดกับกะโหลก และมีลายเข้มคล้ายนาฬิกาทรายอยู่บนท้าย

ทอยพาดมาจนถึงหัวไหล่ (Matsui, et al, 1999.)

2.1.3 วงศ์ปาดเมืองจีน (Family Hylidae)

สกุล : *Hyla*

ชื่อสามัญ : Chinese tree Frog

ชื่ออื่น : ผีเสื้อเณรส่าหรี

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Hyla annectans*

ภาพที่ 2.3 ปาดเมืองจีน (*Hyla annectans*)

ที่มา : Matsui, et al, 1999

ลักษณะ : คล้ายผีเสื้อเณรธรรมดา ปีกบน พื้นปีกสีเหลืองขอบปีกมีสีดำ สีดำที่ต่อกับสีเหลืองบริเวณขอบปีกด้านข้างของปีกคู่หน้าหยักเว้า สีดำที่ขอบปีกนี้มีลักษณะแตกต่างจากผีเสื้อเณรธรรมดา ปีกล่างพื้นปีกสีเหลือง มุมปลายปีกหน้าของปีกคู่หน้ามีสรน้ำตาล กลางปีกทั้งสองคู่มีจุดและขีดสีดำเล็ก ๆ (Matsui, et al, 1999.)

2.1.4 วงศ์กบเขียด (Family Ranidae)

สกุล : *Limnonectes*

ชื่อสามัญ : Kuhl's creek frog

ชื่ออื่น : กบฑูต

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Limnonectes blythii*

ภาพที่ 2.4 กบภูเขา หรือเขียดแลว (*Limnonectes blythii*)

ที่มา : Matsui, et al, 1999

ลักษณะ : ปลายปากเรียวแหลมจนเห็นได้ชัด ส่วนลำตัวอ้วนใหญ่ ผิวเป็นตุ่มเล็ก ๆ ไม่สะดุดตาดูคล้ายเป็นผิวหนังเรียบ เมื่อโตเต็มที่ลำตัวจะมีสีน้ำตาลแดง ริมฝีปากดำ มีขีดดำจากท้ายตาลากมาจนถึงเหนือวงแก้วหู บริเวณสีข้างอาจมีลาย หรือจุดสีดำ น้ำตาลเข้ม ส่วนขามีลายเข้มคาด เป็นระยะ ๆ นอกจากนี้ ยังพบว่าสามารถปรับเปลี่ยนสีผิวไปตามที่อยู่อาศัย เช่น ลำตัวจะมีสีน้ำตาลแดงเมื่ออาศัยอยู่ตามพงหญ้าแห้ง หรือมีสีดำเมื่อหลบซ่อนอยู่ในโพรงไม้ (Matsui, et al, 1999.)

2.1.5 วงศ์อึ่งอ่าง (Family Microhylidae)

สกุล : *Microhyla*

ชื่อสามัญ : Ornate Narrow-mouthed Frog

ชื่ออื่น : -

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Microhyla ornate*

ภาพที่ 2.5 อึ่งน้ำเต้า (*Microhyla ornate*)

ที่มา : Matsui, et al, 1999

ลักษณะ : หัวเล็ก หน้าสั้น ลำตัวด้านบนสีน้ำตาลเทา น้ำตาลเข้ม น้ำตาลเหลือง หรือสีน้ำตาลแดง มีลายรูปน้ำเต้าสีน้ำตาลเข้ม มีเส้นสีดำข้างจมูกผ่านตาต่อเนื่องไปตามสีข้าง ขามีลายพาดขวางสีน้ำตาลเข้มหรือเหลือง ตัวผู้คางสีดำ ท้องสีขาวออกเหลือง ปลายนิ้วเรียว เท้าหลังมีพังผืดเต็ม ความยาวนิ้ว (Matsui, et al, 1999.)

2.1.6 วงศ์คางคก (Family Bufonidae)

สกุล : *Phrynoidis*

ชื่อสามัญ : Giant jungle toad

ชื่ออื่น : หมาน้ำ, กง, กระทาหอง,

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Phrynoidis aspera*

ภาพที่ 2.6 จงโคร่ง (*Phrynoidis aspera*)

ที่มา: Matsui, et al, 1999

ลักษณะ : บริเวณหลังมีน้ำพิษเห็นเป็นปุ่มชัดเจน ตาใหญ่ ตัวมีสีน้ำตาลดำ ตัวผู้มักปรากฏลายสีเข้มเป็นแถบทั้งขาหน้า และขาหลัง บริเวณใต้ท้องมีสีขาวหม่น สามารถเปลี่ยนสีลำตัวได้ตามสภาพแวดล้อม โดยตัวเมียมีขนาดใหญ่กว่าตัวผู้ (Matsui, et al, 1999.)

2.2 พันธุศาสตร์เซลล์

พันธุศาสตร์เซลล์ (Cytogenetics) เป็นวิทยาศาสตร์สาขาหนึ่งที่ให้ความรู้เกี่ยวกับหน้าที่และพฤติกรรมของสารพันธุกรรมในนิวเคลียสภายในเซลล์ มาจากคำว่า cytology+genetics เนื่องจากโครโมโซมเป็นสารพันธุกรรมในนิวเคลียส ที่สำคัญในการถ่ายทอดทางพันธุกรรม การเปลี่ยนโครงสร้างของโครโมโซมในรูปแบบใดก็ตามย่อมมีผลโดยตรงต่อการถ่ายทอดทางพันธุกรรมด้วย การศึกษาวิชานี้จึงเน้นพฤติกรรมต่างๆของโครโมโซม อธิบายได้จากการมองเห็นภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จากการศึกษาโครโมโซมในระดับหนึ่งสามารถบอกถึงพฤติกรรมและองค์ประกอบภายในระดับโมเลกุลของยีนได้ การค้นคว้าทางพันธุศาสตร์เซลล์ร่วมกับความรู้ในสาขาอื่นๆ อันได้แก่ เคมี ฟิสิกส์ และชีววิทยาโมเลกุลทำให้เกิดความเข้าใจถึงพฤติกรรมโครโมโซมมากขึ้น

พันธุศาสตร์เซลล์ เริ่มต้นในปี ค.ศ. 1920 โดยมีการกำเนิดมาจากการศึกษาทางพันธุศาสตร์เซลล์ ได้เริ่มในศตวรรษที่ 19 มีการศึกษาพฤติกรรมของโครโมโซมจากการแบ่งเซลล์ชนิดไมโทซิสและไมโอซิส ทราบระบบการสร้างเซลล์สืบพันธุ์แบบต่างๆ ของสิ่งมีชีวิต และความเข้าใจทางด้านวิทยาเอ็มบริโอและสรีรวิทยาของเซลล์ และเป็นเวลาใกล้เคียงกันงานของเมนเดล (Mendel) ในการ

ปรับปรุงพันธุ์พืชโดยศึกษาจากลักษณะที่ปรากฏจากคู่ผสมพ่อแม่ที่กำหนดเป็นความรู้ genetics ความรู้นี้ช่วยอธิบายหน่วยควบคุมพันธุกรรมและแบบแผนการถ่ายทอดของหน่วยดังกล่าว เมื่อความรู้ทั้ง cytology และ genetics ถูกนำมาศึกษาร่วมกันมีผลทำให้เข้าใจองค์ประกอบและพฤติกรรมของโครโมโซมซึ่งมีผลต่อไปจนเกิดความเข้าใจในระดับการทำงานของยีน

ปัจจุบันเทคนิคที่ใช้ทางพันธุศาสตร์เซลล์ระดับโมเลกุล มีหลายชนิดที่สำคัญดังจะยกตัวอย่างบางส่วนต่อไปนี้

1. วิธีการตรวจตำแหน่งต่างๆของดีเอ็นเอ (หรือยีนที่สนใจ) บนแท่งโครโมโซมโดยเทคนิค in situ hybrization (ISH) และได้มีการปรับปรุงเทคนิคนี้ให้มีประโยชน์โดยตรงเฉพาะงานมากมายอันได้แก่ เทคนิค FISH (fluorescence in situ hybridization) เทคนิค CGH (comparative genomic hybridization) เทคนิคPRINS (primed in situ labeling) และเทคนิค chromosome microdissection ร่วมกับ chromosome reverse painting เป็นต้น ด้วยวิธีการเหล่านี้ร่วมกับการนำเทคนิค high-resolution banding ทำให้สามารถตรวจความผิดปกติชนิดขาดหายไปหรือเกินมาของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (บนแท่งโครโมโซม) ซึ่งมีขนาดเล็กมากถึง 50-100 kb (1 กิโลเบส หรือ kb=1000 คู่เบส หรือ bp)

2. การใช้เทคนิค somatic cell genetics ร่วมกับการใช้เทคนิค chromosome translocation และ Southern blot และ PCR ทำให้สามารถตรวจหาตำแหน่งของยีนมากมายบนแท่งโครโมโซม

3. เทคนิคการสร้างโครโมโซมเทียมของยีสต์ และเมื่อใช้เทคนิคอื่นๆมาช่วย (chromosome walking, chromosome jumping, chromosome landing) แล้วทำให้ค้นพบตำแหน่งที่มนุษย์เป็นจำนวนมากโดยผ่านการทำแผนที่แบบ physical mapping เริ่มในปี ค.ศ. 1990 กำเนิดโครงการอันยิ่งใหญ่ของโลกคือโครงการศึกษาจีโนมมนุษย์ (Human Genome Project = HGP) โดยมีประเทศสหรัฐอเมริกาเป็นแกนนำเป็นโครงการยาวนานถึง 15 ปีมีจุดมุ่งหมาย ในการหาแผนที่ของยีนทุกยีนในจีโนมมนุษย์ถอดรหัสสายพันธุกรรมทั้งหมดของมนุษย์ซึ่งมีความยาว 3.2 ล้านคู่เบสบอกจากนั้นสร้างฐานข้อมูลคอมพิวเตอร์ เก็บรหัสทั้งหมดนี้ไว้เพื่อให้โอกาสทุกคนเข้ามาสืบค้นได้ จุดประสงค์ของโครงการนี้คือเพื่อให้เข้าใจโรคทางพันธุกรรมทุกชนิดเพื่อให้ง่ายในการวินิจฉัยป้องกันและรักษาให้หายขาดได้และประโยชน์อื่นๆทางด้านวิทยาศาสตร์ชีวภาพ การปรับปรุงพันธุ์และวิวัฒนาการของชีวิต (อมรา คัมภิรานนท์, 2546)

2.2.1 เทคนิคการศึกษาโครโมโซม

เนื่องจากโครโมโซมเป็นตำแหน่งที่อยู่บนยีนซึ่งเป็นตัวควบคุมพฤติกรรมต่างๆของสิ่งมีชีวิต การเจริญเติบโตอย่างปกติย่อมเกิดจากการควบคุมของยีนในสภาพสมดุล ถ้าสิ่งมีชีวิตใดมีจำนวนโครโมโซมเปลี่ยนไปจากเดิมย่อมก่อให้เกิดผลต่างๆตามมา การศึกษารูปร่างและลักษณะของ

โครโมโซมจึงจำเป็นอย่างยิ่งสิ่งมีชีวิตแต่ละสปีชีส์มีจำนวนโครโมโซมและลักษณะคงที่ สิ่งมีชีวิตที่สืบพันธุ์โดยใช้เพศมีจำนวนโครโมโซม 2 แบบในเซลล์ต่างชนิดกัน เซลล์ร่างกายเป็นแบบดิพลอยด์ (2n) และเซลล์สืบพันธุ์เป็นแบบแฮพลอยด์ (n) สิ่งมีชีวิตสืบพันธุ์แบบไม่ใช้เพศมีเพียงแบบเดียว คือ อาจเป็นดิพลอยด์หรือแฮพลอยด์ขึ้นกับการกำเนิดวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ (อมรา คัมภิรานนท์, 2546)

2.2.2 การเตรียมโครโมโซมโดยวิธีทางตรง (direct method)

สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกทุกชนิด จะถูกนำมาเตรียมโครโมโซมโดยตรงจากเซลล์ไขกระดูกโดยวิธี in vivo colcemid treatment ตามวิธีของถาวร (2541) โดยสังเขป คือ ชั่งน้ำหนักสัตว์ตัวอย่างจากนั้นฉีดสารโคลชิซิน (Colchicine) เข้มข้น 0.01% (ฉีด 1 มิลลิลิตร/100 กรัม) เข้าที่ช่องท้อง (intraperitoneal cavity)ทิ้งไว้ประมาณ 16-18 ชั่วโมง จากนั้นสลบสัตว์ตัวอย่างด้วยน้ำแข็งและผ่าเอาไขกระดูก ดันเอาไขกระดูกมาจากโพรงกระดูกด้วยสารละลาย KCl เข้มข้น 0.075 M ที่บรรจุในกระบอกฉีดยาที่มีเข็มติดอยู่ สับให้ละเอียดในสารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ เมื่อไขกระดูกละเอียดดีแล้วเติมสารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ให้ได้ปริมาณ 8 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 1 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1,600 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ปั่นเสร็จดูดส่วนที่ใสทิ้งแล้วเติมน้ำยาคงสภาพ (fixative) ทีละน้อยจนได้ปริมาตร 8 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วและเวลาเท่าเดิม จากนั้นดูดสารละลายส่วนบนทิ้งแล้วเติมน้ำยาคงสภาพอีกในปริมาตรเท่าเดิม ทำซ้ำจนกว่าสารละลายจะใส (ประมาณ 2-3 ครั้ง) ในการปั่นเหวี่ยงครั้งสุดท้ายให้ดูดน้ำยาคงสภาพเก่าออกให้หมดแล้วเติมใหม่ลงไปประมาณ 1-2 มิลลิลิตร ขึ้นกับตะกอนเซลล์ที่ได้ แล้วนำไปเตรียมโครโมโซมบนสไลด์

2.2.3 การย้อมแถบสีโครโมโซม

การเตรียมโครโมโซมโดยการเพาะเลี้ยง เก็บเกี่ยวเซลล์และหยดเซลล์ลงบนสไลด์ทำการย้อมสี โดยเลือกวิธีตามจุดประสงค์ของการศึกษา (Halnan, 1989) มีดังนี้

2.2.3.1 การย้อมสีโครโมโซมแบบธรรมดา (conventional staining)

ในช่วงเริ่มแรกของการศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ของสิ่งมีชีวิต จะใช้วิธีการย้อมสีแบบธรรมดาหรือแบบดั้งเดิม ใช้สีย้อมที่ติดกรดนิวคลีอิกจึงเห็นโครโมโซมติดสีเข้มทั้งแท่ง โดยสีที่นิยมใช้ได้แก่ ออร์ซีน (orcein) คาร์มีน (carmine) และสีที่นิยมมากที่สุด คือจิมซ่า (Giemsa's) สามารถบอกจำนวน และชนิดของโครโมโซมประจำสิ่งมีชีวิตนั้นๆ ได้ และอาจบอกลักษณะบางอย่างของโครโมโซม เช่น รอยคอดที่หนึ่ง รอยคอดที่สอง และแซทเทลไลท์ การติดสีของโครโมโซมดังกล่าวบางครั้งอาจพบว่ามีการติดสีได้ไม่เท่ากัน เช่น ในขณะที่โครโมโซมผ่านเข้าสู่ชีพของเซลล์จะมีการยืดหดตัวไม่เท่ากัน ระยะใดที่หดตัวมากจะติดสีเข้มมาก แต่ถ้าหดตัวน้อยก็จะติดสีจางกว่าอีกทั้งในโครโมโซมแท่งเดียวกันยังติดสีได้ไม่เท่ากันขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของเฮเทอโรโครมาทิน (heterochromatin) และยูโครมาทิน (euchromatin) การย้อมสีโครโมโซมแบบธรรมดา ในบางกรณี

นั้นอาจจะไม่สามารถจำแนกโครโมโซมได้เท่าที่ควร คือไม่สามารถระบุแน่ชัดได้ว่าเป็นโครโมโซม แท่งที่เท่าใด และจับคู่ไม่ได้ (วรรณภา กสิฤกษ์ และคณะ, 2557)

2.2.3.2 การย้อมแถบสีแบบ Ag-NORs banding

เป็นเทคนิคที่ทำให้ส่วน nucleolar organizer regions (NORs) ติดสีเข้ม เรียกอีกอย่างหนึ่งว่าเทคนิค silver staining เพราะใช้สารละลายซิลเวอร์ไนเตรต (silver nitrate) ซึ่งจะเลือกติดบริเวณนี้เท่านั้น (Halnan, 1989) เทคนิคนี้ใช้ตรวจหา NORs ซึ่งในสัตว์มีกระดูกสันหลังส่วนที่มียีน สำหรับสังเคราะห์ไรโบโซมเอ็นอาร์เอ็นเอชนิด 18S และ 28S อยู่ในมนุษย์จะอยู่ในบริเวณรอยคอดที่สองของโครโมโซมคู่ที่ 13, 14, 15, 21 และ 22 ตำแหน่งของ NORs นี้ อยู่บริเวณก้านของแซทเทิลไลท์โครโมโซม NORs มีความหลากหลาย (polymorphism) ได้ในโครโมโซมแท่งเดียวกันของบุคคลต่างกันซึ่งใช้เป็นโครโมโซมเครื่องหมาย (marker chromosome หรือ marked chromosome) ได้และใช้ในการติดตามดูพฤติกรรมการถ่ายทอดบางลักษณะของสิ่งมีชีวิตต่างๆ ได้ ซึ่งการถ่ายทอดเป็นไปตามกฎของเมนเดล (วรรณภา กสิฤกษ์ และคณะ, 2557)

2.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การศึกษาเซลล์พันธุศาสตร์เกี่ยวกับโครโมโซมและคาริโอไทป์ของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในต่างประเทศนั้น Mahony, M.J. (1991). ได้ศึกษาโครโมโซมของคางคก *Bufo bufo, B. viridis, B. bufo* x *B. viridis* และ *B. calameta* พบว่าคางคกมีโครโมโซม ทั้งหมด 2n=22 เท่ากัน

Bogart, 1974 ศึกษาคาริโอไทป์ของกบสกุล *Leptodactylus* ทั้งหมด 18 ชนิด ได้แก่ *L.bufonis , L fuscus , L.melanotus , L.ocellatus , L.insularum , L.pentadactylus , L.lobiolis , L.albilobris , L.mystaceus , L.gracilis , L.mystacinus , L.rhodonotus , L.latinosus , L.wagneri , L.podicipinus* มีโครโมโซม 2n=22 เท่ากันทั้งหมด ส่วน *L.marmoratus* มีโครโมโซม 2n=24 และอีก 2 ชนิดคือ *L.hylaelactylus* และ *L.andreae* มีโครโมโซม 2n=26 เท่ากัน จากการศึกษาดังกล่าวเขาได้แบ่งกบออกเป็น 3 กลุ่มคือ กลุ่มที่มีโครโมโซม 22, 24 และ 26 และได้ให้ข้อเสนอแนะว่ากลุ่มที่มีโครโมโซม 26 น่าจะเป็นบรรพบุรุษของพวกที่มีโครโมโซม 22 และ 24 และพวกที่อาศัยอยู่บนบก มีแนวโน้มที่จะไปอาศัยอยู่ในน้ำ ไม่ใช่พวกที่อาศัยอยู่ในน้ำขึ้นมาอาศัยอยู่บนบกตามข้อเสนอของ (Heyer , 1969) และของ (Lynch , 1971; 1973)

Formas, 1978 ศึกษาโครโมโซมของกบ *Alsodes vauzolinii* และ A. *verucosus* พบว่ามีจำนวนโครโมโซม 2n=26 เท่ากันแต่มีคาริโอไทป์ต่างกันและไม่พบโครโมโซมเพศ

Kuramoto , 1980 ศึกษาโครโมโซมของกบเขียด 6 ชนิดได้แก่ *Rana amurensis-coreana*, R. *planceyi chosenica* , R. *latouchi* , R. *marina* , *Occidozyga laevis* พบว่ามีจำนวนโครโมโซม 2n=26 และ R. *kuhlii* มีโครโมโซม 2n=22 อึ่ง *Kaloula picta* มีโครโมโซม

2n=28 นอกจากนี้ยังพบว่าโครโมโซมคู่ที่ 8 ของ R. *marina* มีขนาดไม่เท่ากันมีแนวโน้มที่เป็นไปได้ว่ามีโครโมโซมเพศในกบชนิดนี้

Iturra and Veloso , 1989 ศึกษาโครโมโซมในกบ Eupsophus migueli และ E. roseus พบว่ากบทั้งสองชนิดมีโครโมโซม 2n=30 เท่ากัน และพบโครโมโซมเพศชนิด xy ในกบชนิดแรกคือโครโมโซมคู่ที่ 14 เป็นโครโมโซมชนิด xy โดยโครโมโซม x และ y มีขนาดเท่ากันแต่โครโมโซม x มีรูปร่างเป็นแบบเทโลเซนทริก (telocentric) ส่วนโครโมโซม y มีรูปร่างเป็นแบบเมทาเซนทริก (metacentric) สำหรับกบ E. roseus เมื่อย้อมแถบซีพบว่าโครโมโซมคู่ที่ 14 เป็นโครโมโซมแบบ xy โดยทั้งโครโมโซม x และ y มีรูปร่างเป็นแบบเมทาเซนทริกแต่ในโครโมโซม y ไม่มี constitutive heterochromatin บริเวณเซนโทเมียร์ ส่วนโครโมโซม x มี constitutive heterochromatin บริเวณเซนโทร์เมียร์

Schmid , 1978 ศึกษาสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในวงศ์คางคก (Family Bufonidae) และวงค์ปาดเมืองจีน (Family Hylidae) 22 ชนิด ได้แก่ คางคก *Bufo bufo, B.calamita , B.parvus , B.viridis , B.americanus , B.boreas , B.campactilis , B.fowleri , B. punctatus , B.terrestris , B.valliceps , B.arenarum , B.marinus , B.mouritaricus* และ *Pedostibes hosii* มีโครโมโซม 2n=22 อีก 4 ชนิด ได้แก่ ปาด *Hala arborea* , *H.cinerea , H.septentrionalis* และ *Pseudacris ornata* มีโครโมโซม 2n=24 ส่วนคางคกอีก 3 ชนิดคือ *B.gamani , B.poweri* และ *B.regularis* มีโครโมโซม 2n=20 ซึ่งคางคกและปาดบ้านทั้ง 22 ชนิดดังกล่าวมีโครโมโซมที่ไม่สามารถบ่งบอกความแตกต่างทางเพศได้

Schmid et al.,1988 ศึกษาโครโมโซมในกบ Centrolenella antisthensi พบว่ามีโครโมโซม 2n=20 และพบโครโมโซมเพศชนิด xy โดยโครโมโซม x และ y โครโมโซมมีความยาวของโครโมโซมเท่ากันแต่มีอัตราส่วนของแขนโครโมโซมระหว่างแขนยาวต่อแขนสั้นต่างกัน คือ โครโมโซม y มีแขนข้างสั้น สั้นกว่าโครโมโซม x

Schmid et al., 1982 ศึกษาคาริโอไทป์ของกบ Buergeria buergeria ด้วยการย้อมสีแบบซีและย้อมด้วยซิลเวอร์ไนเตรท พบว่ามีโครโมโซม 2n=26 และพบโครโมโซมเพศในโครโมโซมคู่ที่ 7 ซึ่งเป็นแบบ zw ซึ่งโครโมโซมทั้ง z และ w เป็นแบบซับเทโลเซนทริก แต่พบว่าโครโมโซม w มี NORs บริเวณดังกล่าวนี้เป็น constitutive heterochromatin ซึ่งทั้งสองลักษณะนี้ไม่พบในโครโมโซม z

Nishioka et al., 1987 ศึกษาโครโมโซมของ *Rana nigromaculata , R.brevipoda , R.plancyi chosenica , R.plancyi fukiensis , R.pipines , R.japonica , R.tsushinensis , R.armuensis , R.temporaria , R.sylvatica* พบว่ามีจำนวนโครโมโซม 2n=26 เท่ากัน และศึกษาโครโมโซมของ *R.omativentris , R.chensinensis* และ *R.dyboskii* พบว่ามีจำนวนโครโมโซม 2n=24 ทั้ง 3 ชนิด จากการศึกษากบเหล่านี้ไม่พบโครโมโซมเพศ

Mahony , 1991 ศึกษาโครโมโซมของกบ *Crinia bilingual* พบว่ามีจำนวนโครโมโซม 2n=24 และพบว่ามีโครโมโซมเพศ โดยโครโมโซมคู่ที่ 12 เป็นโครโมโซมเพศแบบ zw โดยโครโมโซม w มีรูปร่างเป็นแบบซับเมทาเซนทริก (submetacentric) ส่วนโครโมโซม z มีรูปร่างแบบซับเทโลเซนทริก (subtelocentric) และมีขนาดเล็กกว่าโครโมโซม w

Ohta and Matsui, 1995 ศึกษาโครโมโซมของกบ *Platymantis pelewensis* พบว่ามีจำนวนโครโมโซม 2n=22 และไม่สามารถบ่งบอกถึงความแตกต่างของโครโมโซมเพศได้

Tymoska and Fischberg,1973 ศึกษาโครโมโซมของกบสกุล Xenopus 11 ชนิดได้แก่ X.*laevis laevis* , X.*laevis peltersi* , X.*laevis victoreanus* , X.*(laevis) borealis* , X.*gelli* , X.*muelleri* และ X.*fraseri* พบว่ามีโครโมโซม 2n=36 เท่ากันและ X.*tropicalis* มีโครโมโซม 2n=20 X.*(laevis) bunyoniensis* มีโครโมโซม 2n=72 X.*rumenzoriensis* มีโครโมโซม 2n=108 ผลการศึกษาไม่พบขนาดโครโมโซมเพศที่แตกต่างกัน

Wasserman and Bogart, 1968 ศึกษาโครโมโซมของคางคก *Scaphiopus holbrookii hurterii* และ S.*couchii* พบว่าคางคกทั้งสองชนิดมีโครโมโซม 2n=26 เท่ากัน แต่มีคาริโอไทป์แตกต่างกัน นอกจากนี้ยังได้ศึกษาลูกผสมชั่วที่หนึ่งได้จากการผสมระหว่างคางคก 2 ชนิด (S.*couchii* x S.*holbrookii*) พบว่ามีโครโมโซม 2n=26 เช่นเดียวกัน

การศึกษาเซลล์พันธุศาสตร์ของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในประเทศไทยมีการศึกษากันน้อยเพียงไม่กี่คน และเริ่มศึกษากันเมื่อไม่นานมานี้เอง โดย นงลักษณ์ นาคเกษม (2518) ศึกษาโครโมโซมของอึ่งน้ำเต้า *Microhyla ornata* เขียนอีโม่ *Rana limnocharis* และคางคกบ้าน *Bufo melanostictus* พบว่ามีโคโมโซม 2n=24,26และ22 ตามลำดับ

ถาวร สุภาพรม และประภาพร กัลยาประสิทธิ์ (2533) ศึกษาโครโมโซมของอึ่ง *Kaloula pulchra* และคางคกบ้าน *Bufo melanostictus* พบว่ามีโคโมโซม 2n=28 และ 22 ตามลำดับ

ถาวร สุภาพรม และคณะ (2535) ศึกษาโครโมโซมปากขวด *Glyphoglossus molossus* และปาดบ้าน *Rhacophorus leucomystax* พบว่ามีโคโมโซม 2n=26 เท่ากันแต่มีคาริโอไทป์ต่างกัน

ถาวร สุภาพรม และคณะ (2535) ศึกษาโครโมโซมและคาริโอไทป์ของเขียดเหลือง *Rana lateralis* และอึ่งแว่น *Calluella guttulata* พบว่ามีโคโมโซม 2n=6 เท่ากัน แต่มีรูปแบบของโครโมโซมต่างกัน

ถาวร สุภาพรม และคณะ (2537) ศึกษาโครโมโซมของอึ่งขาดำ *Microhyla pulchra* และอึ่งก้นขีด *Kaloula mediolineata* พบว่ามีโครโมโซม 2n=24และ28 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังได้ศึกษาโครโมโซมของกบจุก *Rana pileata* โดยการย้อมสีแบบแถบซี พบว่ามีโครโมโซม 2n=26

ถาวร สุภาพรม (2541) ศึกษาโครโมโซมด้วยการย้อมแถบสีของอึ่งปากขวด *Glyphoglossus molossus* และอึ่งบ้าน *Kaloula pulchra* พบว่ามีโครโมโซม 2n=26 และ 28 ตามลำดับ แต่มีคาริโอไทป์ที่แตกต่างกัน

ถาวร สุภาพรม และประจักษ์ จันทร์ศรี (2542) ศึกษาโครโมโซมของเขียดจิกปากแหลม *Rana macrodactylus* และอึ่งกรายเอวจุด *Kalophrynus pleurostigma* พบว่ามีโครโมโซม 2n=26 เท่ากันแต่มีคาริโอไทป์แตกต่างกัน

วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล และคณะ (2544) ศึกษาโครโมโซมกบนา *Rana rugulosus* โดยการย้อมสีแบบธรรมดา ย้อมแถบซี ย้อมแถบจี ย้อม Ag-NOR และย้อมแบบ BrdU replication banding พบว่ามีโครโมโซม 2n=26 แต่ไม่พบโครโมโซมเพศ นอกนี้ยังได้ศึกษาโครโมโซมของคางคก 4 ชนิดคือ คางคกบ้าน *Bufo malanostictus* จงโคร่ง *B.asper* คางคกหัวราบ *B. macrotis* และคางคกแคระ *B. parvus* พบว่าคางคกทั้ง 4 ชนิดมีโครโมโซม 2n=22 เท่ากัน และมีรูปแบบของโครโมโซมคล้ายๆกัน

ปัจจุบันการศึกษาโครโมโซมของสิ่งมีชีวิตนับวันจะมีความสำคัญมากขึ้นด้วยได้เห็นถึงคุณค่าของข้อมูลพื้นฐานเหล่านี้ที่มีความสำคัญและจำเป็นต่อการนำไปประยุกต์ใช้ในการคัดเลือกพันธุ์หรือปรับปรุงพันธุ์ เพื่อให้พันธุ์ที่มีคุณภาพตามที่ต้องการข้อมูลพื้นฐานที่ได้นี้ยังเป็นประโยชน์โดยตรงต่อการศึกษาทางวิทยาศาสตร์พื้นฐาน นำไปใช้เป็นข้อมูลประกอบในการจำแนกชนิดของสิ่งมีชีวิต (Cytotaxonomy) ได้ละเอียดลึกซึ่งยิ่งขึ้นช่วยในการศึกษาทางด้วนความสัมพันธ์และวิวัฒนาการของสัตว์

ในประเทศไทยการศึกษาโครโมโซมของสัตว์ยังมีการศึกษากันน้อยมากโดยเฉพาะในสัตว์ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ ปัจจุบันบางท้องถิ่นมีการเพาะเลี้ยงสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกบางชนิด เช่น กบนา ซึ่งสามารถทำรายได้ให้แก่เกษตรกรเป็นอย่างดีแต่สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกชนิดอื่นๆ เช่น เขียดอึ่งอ่าง และปาด ชาวไทยนิยามจับมาบริโภคบางฤดูการซึ่งถ้าหากมีการศึกษาข้อมูลพื้นฐานอย่างพอเพียงอาจส่งเสริมให้เกษตรกรทำการเพาะเลี้ยงเป็นอาชีพเช่นเดียวกันกับกบนาได้

ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้ก็เพื่อศึกษาข้อมูลพื้นฐานทางด้านเซลล์พันธุศาสตร์ของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกส่วนใหญ่คนไทยคุ้นเคยและนำมาบริโภคนอกจากนี้สัตว์ในกลุ่มนี้ยังเกี่ยวข้องกับบทบาทในการควบคุมรักษาสมดุลของระบบนิเวศในธรรมชาติ เช่น ช่วยกำจัดแมลงศัตรูพืชหลายชนิดและเป็นตัวบงชี้ทางชีวภาพอย่างหนึ่งที่บงบอกถึงสภาพแวดล้อมของระบบนิเวศเป็นอย่างไร

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

การดำเนินงานวิจัยแบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอน คือ การเก็บตัวอย่าง การเตรียมโครโมโซม และการตรวจสอบโครโมโซม

3.1 การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในมหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม โดยการสุ่มเก็บตัวอย่างสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกแต่ละชนิด เพื่อนำมาศึกษาโครโมโซมในห้องปฏิบัติการพันธุศาสตร์ ศูนย์วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม

3.2 การเตรียมโครโมโซม

3.2.1 เตรียมโดยวิธีทางตรง (direct method)

1. ชั่งน้ำหนักตัวของสัตว์ตัวอย่างเพื่อทำการฉีดโคลซิซิน (colchicine) ความเข้มข้น 0.01 % ปริมาณ 1 ml. ต่อ 100 g ของน้ำหนักตัวของสัตว์ทดลอง

2. ฉีดโคลซิซินความเข้มข้น 0.01 % เพื่อยับยั้งการทำงานของเส้นใยสปินเดิล (spindle fiber) ฉีดเข้าที่บริเวณช่องท้องของสัตว์ตัวอย่างทิ้งไว้นาน 18 – 20 ชั่วโมง

3. จากนั้นใช้กรรไกรผ่าตัด ตัดกระดูกขาหน้าและขาหลัง พยายามเลาะกล้ามเนื้อออกจากกระดูกให้หมด จากนั้นตัดกระดูกส่วน อิพิไฟซิส (Epiphysis) ออกดันเอาไขกระดูกมาจากโพรงกระดูกด้วยสารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ (KCL) 0.075 M ที่บรรจุอยู่ในกระบอกฉีดยาที่มีเข็มติดอยู่ออก แล้วแช่ไขกระดูกที่ได้ไว้ในโพแทสเซียมคลอไรด์ ที่เตรียมไว้ในจานเพาะเชื้อ (Petri dish)

4. ใช้กรรไกรผ่าตัดสับเซลล์ไขกระดูกให้ละเอียดอย่างน้อย 15 นาที แล้วจึงบ่มเซลล์ไขกระดูกในโพแทสเซียมคลอไรด์ที่อุณภูมิห้องต่ออีก 1-2 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์บวมซึ่งจะทำให้โครโมโซมกระจายตัวดี

5. นำเอาไขกระดูกที่ได้ใส่ในหลอดปั่นเหวี่ยง (Centrifuge tube) ขนาด 14 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ได้ 7 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,600 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เพื่อแยกตะกอนเซลล์ออกจากสารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ ดูดส่วนที่ใส (Supematant) ทิ้งให้เหลือปริมาณ 1-2 มิลลิลิตร เหลือเฉพาะตะกอนสีขาว

6. ทำการตรึงเซลล์ (Fixative) ที่มีอัตราส่วนของ metanol : acetic acid เป็น 3:1 ที่เตรียมใหม่และเย็น (Fresh cold fixative) ใช้หลอดหยดน้ำยาตรึงเซลล์ทีละหยด ผสมให้เข้ากันแล้ว

ปรับปริมาตรจนได้ปริมาตร 8 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1,600 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ทำซ้ำอีก 2-3 รอบ เพื่อล้างตะกอนเซลล์จนกว่าจะได้ตะกอนสีขาวที่ก้นหลอด

7. ดูดสารละลายตะกอนเซลล์ หยดลงสไลค์ที่สะอาดและเย็น โดยหยดให้สูงจากสไลค์ 2-3 ฟุต เพื่อให้เซลล์แตก และโครโมโซมแผ่กระจายดี ทำการผึ่งสไลด์ให้แห้ง

8. นำไปย้อมด้วยสีจิมซ่า 20 % แช่สไลค์นาน 20-45 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำสะอาด ผึ่งไว้ให้แห้ง แล้วนำไปศึกษาโครโมโซมต่อไป

3.3 การตรวจสอบโครโมโซม

3.3.1 การตรวจสอบโครโมโซม การจัดคาริโอไทป์ และอิดิโอแกรมมาตรฐาน

ประกอบด้วยขั้นตอนการตรวจสอบโครโมโซม จัดคาริโอไทป์ และสร้างอิดิโอแกรมมาตราฐานดัดแปลงจากวิธีการของกันยารัตน์ ไชยสุต (2532)

1) การตรวจสอบโครโมโซมเลือกเซลล์ที่มีโครโมโซมระยะเมทาเฟสกระจายตัวดีไม่ซ้อนทับกันนำมาถ่ายภาพโครโมโซมโดยใช้เลนส์วัตถุ (objective lens) กำลังขยาย 100X โดยใช้ชุดถ่ายภาพที่ต่อกับกล้องจุลทรรศน์ หรือใช้กล้องดิจิตอล เพื่อตรวจนับจำนวนโครโมโซมจากภาพถ่ายโครโมโซมจำนวน 100 เซลล์ ความถี่ของจำนวนโครโมโซมที่พบมากที่สุด จะเป็นค่าของจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ของสิ่งมีชีวิตนั้น ๆ จากนั้นจับคู่โครโมโซมที่เหมือนกัน (homologous chromosome) และศึกษาโครโมโซมโดยการหาค่าความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาว (long arm; Ll) ความยาวของแขนโครโมโซมข้างสั้น (short arm; Ls) และคำนวณหาความยาวของโครโมโซมแต่ละแท่ง (total length; LT , LT = Ll + Ls) คำนวณค่า relative length (RL) และ centromeric index (Cl) เพื่อระบุชนิดของโครโมโซม และนำค่าที่ได้ไปใช้ประกอบในการจัดทำคาริโอไทป์ และอิดิโอแกรม

2) การจัดทำคาริโอไทป์ ใช้รูปถ่ายที่ได้ในการจับคู่โครโมโซมที่เหมือนกัน โดยการกำหนดตำแหน่งเซนโทรเมียร์ของโครโมโซมแต่ละแท่งในเซลล์ วัดค่าความยาวของโครโมโซมข้างยาว ค่าความยาวของแขนโครโมโซมข้างสั้น นำค่าที่ได้มาคำนวณหาความยาวของโครโมโซมแต่ละแท่ง จัดเรียงคาริโอไทป์ ให้เรียงตามเรียงตามความยาวของโครโมโซมแต่ละคู่จากมากไปหาน้อย ยกเว้นโครโมโซมเพศจะวางเป็นคู่สุดท้ายมุมล่างซ้ายเสมอ ต้องบอกหมายเลขของโครโมโซมแต่ละคู่ด้านล่าง วางแท่งโครโมโซมให้แขนข้างสั้นอยู่ด้านบน แขนข้างยาวอยู่ด้านล่าง

3.2.3 การจัดทำคาริโอไทป์มาตราฐาน

1) เลือกเซลล์ในระยะเมทาเฟส ที่มีขนาดของโครโมโซมไม่ยาวหรือสั้นเกินไป มีการกระจายที่ดีไม่ซ้อนทับกัน และนับจำนวนโครโมโซมได้ครบเท่ากับจำนวนโครโมโซมของสิ่งมีชีวิตชนิดนั้น ถ่ายภาพเซลล์ที่เลือกไว้โดยใช้เลนส์วัตถุกำลังขยาย 100X เลือกมาจัดจำนวนชนิดละ 10 เซลล์

2) ใช้รูปถ่ายที่ได้ในการจับคู่โครโมโซมที่เหมือนกัน โดยการกำหนดตำแหน่งของเซนโทรเมียร์ของโครโมโซมแต่ละแท่งในเซลล์ จากนั้นวัดค่าความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาว ค่าความยาวของแขนโครโมโซมสั้น นำค่าที่ได้มาคำนวณหาความยาวของโครโมโซมแต่ละแท่ง การวัดค่าความยาวของโครโมโซมอาจจะใช้วิธีตัดโครโมโซมออกมาจากรูปถ่ายทีละแท่ง กำหนดหมายเลยให้โครโมโซมทุกแท่งก่อนการวัด เมื่อวัดความยาวเสร็จแล้วจึงจับคู่โครโมโซมที่มีความยาวของแขนแต่ละข้างและความยาวทั้งแท่งใกล้เคียงกันมากที่สุด

3) การคำนวณหาค่า relative length (RL) คำนวณได้จากสูตร ดังนี้

$$\text{ค่า relative length (RL)} = \frac{\text{ความยาวของโครโมโซมแต่ละแท่ง (LT)}}{\text{ความยาวทั้งหมดของโครโมโซมทุกแท่ง } (\sum LT)}$$

การใช้ค่า RL นี้สามารถช่วยในการจับคู่โครโมโซมได้แน่นอนกว่าการใช้ค่าความยาวของโครโมโซมเพราะค่า RL ของโครโมโซมแต่ละแท่งจะคงที่ในทุก ๆ เซลล์ ส่วนค่าความยาวของโครโมโซมจะแตกต่างกันไปในเซลล์แต่ละเซลล์

4) การคำนวณหาค่า centromeric index (CL) คำนวณได้จากสูตร ดังนี้

$$\text{ค่า centromeric index (CL)} = \frac{\text{ความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาว (Ll)}}{\text{ความยาวของโครโมโซมแต่ละแท่ง (LT)}}$$

นำค่า Cl ที่ได้มาระบุชนิดของโครโมโซม โดยใช้เกณฑ์ดังนี้

ค่า Cl อยู่ระหว่าง 0.500-0.599 จัดเป็นโครโมโซมชนิดเมทาเซนตริก

ค่า Cl อยู่ระหว่าง 0.600-0.699 จัดเป็นโครโมโซมชนิดซับเมทาเซนตริก

ค่า Cl อยู่ระหว่าง 0.700-0.899 จัดเป็นโครโมโซมชนิดอะโครเซนทริก

ค่า Cl อยู่ระหว่าง 0.900-1.000 จัดเป็นโครโมโซมชนิดเทโลเซนทริก

5) การกำหนดขนาดของโครโมโซม แบ่งขนาดของโครโมโซมออกเป็น 3 ขนาด โดยกำหนดให้ โครโมโซมคู่ที่ยาวที่สุดเป็นโครโมโซมคู่ที่ 1 และโครโมโซมคู่ที่สั้นที่สุดเป็นโครโมโซมคู่สุดท้าย

โครโมโซมขนาดใหญ่ (large = L) คือ โครโมโซมที่มีความยาวมากกว่าครึ่งหนึ่งของผลบวกความยาวเฉลี่ยของโครโมโซมใหญ่สุด รวมกับโครโมโซมคู่เล็กที่สุด

$$\text{ดังนั้น} \quad L > \frac{LT \text{ เฉลี่ยคู่ที่ } 1 + LT \text{ เฉลี่ยคู่สุดท้าย}}{2}$$

โครโมโซมขนาดกลาง (medium=M) คือ โครโมโซมที่มีค่าความยาวน้อยกว่าครึ่งหนึ่งของความยาวเฉลี่ยของโครโมโซมใหญ่สุด รวมกับโครโมโซมคู่เล็กที่สุด

$$\text{ดังนั้น} \quad M < \frac{\text{LT เฉลี่ยคู่ที่ 1} + \text{LT เฉลี่ยคู่สุดท้าย}}{2}$$

โครโมโซมขนาดเล็ก (small=S) ได้แก่ โครโมโซมที่มีความยาวน้อยกว่าครึ่งหนึ่งของความยาวเฉลี่ยของโครโมโซมคู่ใหญ่สุด

$$\text{ดั้งนั้น} \quad S < \frac{\text{LT เฉลี่ยคู่ที่ 1}}{2}$$

6) จัดเรียงคาริโอไทป์ ให้เรียงตามชนิดของโครโมโซมก่อน แล้วค่อยเรียงตามความยาวของ โครโมโซม แต่ละคู่จากมากไปหาน้อยยกเว้นโครโมโซมเพศจะวางเป็นคู่สุดท้ายมุมล่างซ้าย ต้องบอกหมายเลยของโครโมโซมแต่ละคู่ด้านล่างวางแท่งโครโมโซมให้แขนข้างสั้นอยู่ด้านบน แขนข้างยาวอยู่ด้านล่าง และนิยมวางแท่งโครโมโซมให้ตำแหน่งเซนโทรเมียร์ตรงกัน

3.3.3 การทำอิดิโอกรมมาตรฐาน

อิดิโอแกรม คือ ไดอะแกรมแสดงคาริโอไทป์ ของโครโมโซม 1 ชุดแฮพลอยด์ ซึ่งประกอบด้วยโครโมโซมร่างกาย และโครโมโซมเพศ โดยใช้ข้อมูลค่าเฉลี่ยความยาวของโครโมโซม รูปร่างโครโมโซม และตำแหน่งเซนโทรเมียร์อิดิโอแกรมจากเทคนิคการย้อมสีโครโมโซมแบบธรรมดา ใช้เซลล์ระยะเมทาเฟสชนิดละ 10 เซลล์ นำมาจัดคาริโอไทป์ แล้ววัดความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาว และแขนโครโมโซมข้างสั้นของโครโมโซมทุกคู่ด้วยเวอร์เนียร์ (vernier) จัดทำภาพวาดอิดิโอแกรมด้วยคอมพิวเตอร์ โดยการนำค่าเฉลี่ยความยาวของโครโมโซมแต่ละคู่มาสร้างกราฟโดยใช้โปรแกรม Microsoft Excel XP/2003 ให้แกนตั้ง (Y) เป็นความยาวของโครโมโซมแต่ละคู่ และแกนนอน (X) เป็นลำดับของโครโมโซมคู่ที่ใหญ่ที่สุดไปหาคู่ที่เล็กที่สุด ยกเว้นโครโมโซมเพศจัดเป็นคู่สุดท้าย แล้วนำมาปรับรูปร่างของโครโมโซมโดยใช้โปรแกรม Microsoft Word XP/2003 หรือ Microsoft Powerpoint XP/2003

บทที่ 4

ผลการวิจัย

จากการศึกษาสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกบางชนิด ในบริเวณมหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม ซึ่งครั้งนี้สำรวจพบสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก 6 ชนิด ได้แก่ อึ่งอ่างบ้าน อึ่งเพ้า อึ่งก้นขีด กบนา เขียดโม่ และคางคกบ้าน และได้ทำการศึกษาสำเร็จ 3 ชนิด คือ กบนา เขียดโม่ และคางคกบ้าน โดยทำการแยกเพศและทำการวัดขนาดเพื่อหาค่าเฉลี่ยทางด้านสัณฐานวิทยาของสัตว์ตัวอย่างแต่ละชนิด ได้ผลการศึกษาดังนี้

4.1 ลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกของกบนา *(Hoplobatrachus rugulosus)*

ภาพที่ 4.1 ลักษณะภายนอกของกบนา *(Hoplobatrachus rugulosus)*

สกุล : *Hoplobatrachus*

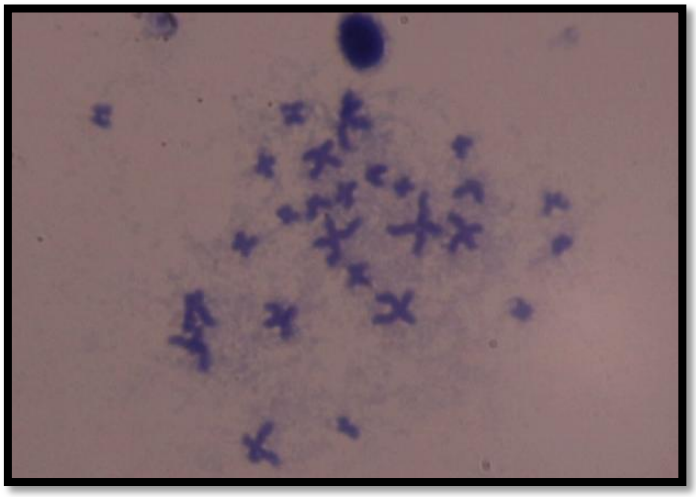
ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Hoplobatrachus rugulosus*

ชื่อสามัญ : Rugosed Frog

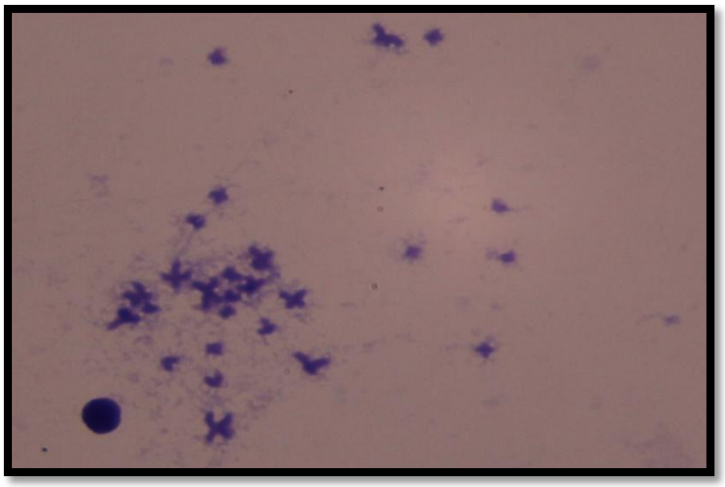
ชื่ออื่น : -

ลักษณะทั่วไป : ผิวด้านหลังมีสีน้ำตาลจุดดำ ผิวหนังขรุขระมีรอยย่น ที่ริมฝีปากมีแถบดำ ใต้คางมีจุดดำ หรือแถบลายดำ กบนาตัวเมีย มีขนาดโตกว่าตัวผู้ เมื่อโตเต็มที่และพร้อมที่จะผสมพันธุ์จะมองเห็นถุงเสียง เป็นรอยย่นสีดำที่ใต้คาง (วิรยุทธ์ เลาหะจินดา, 2552)

4.2 ผลการศึกษาจำนวน ขนาด รูปร่างของโครโมโซมกบนาด้วยการย้อมสีแบบธรรมดา



ก. กบนาเพศผู้ (Male *H.rugulosus*)

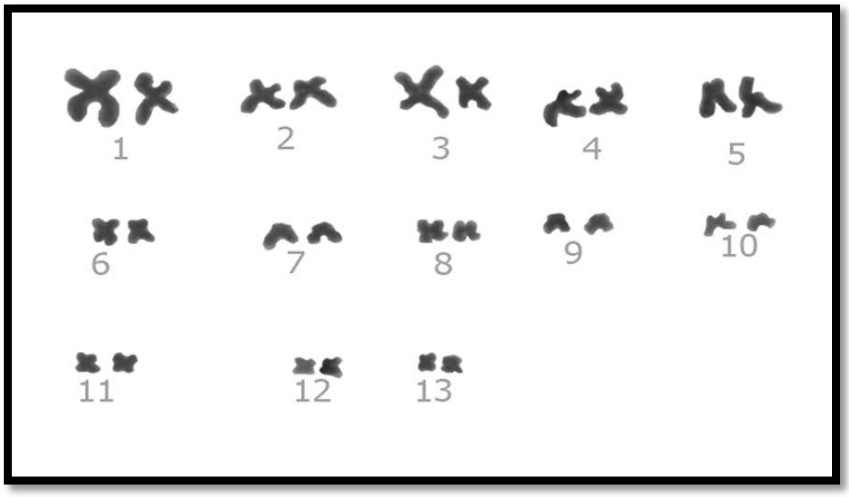


ข. กบนาเพศเมีย (Female *H.rugulosus*)

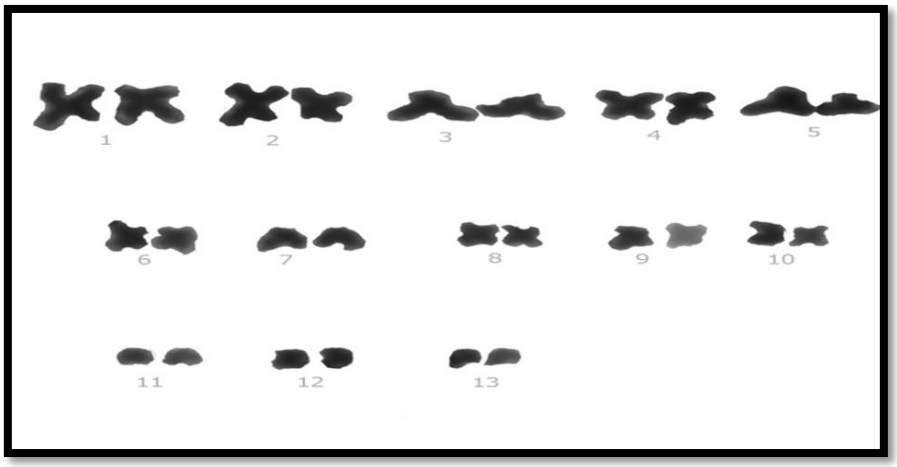
ภาพที่ 4.2 แสดงเมทาเฟสโครโมโซมของกบนา (*Hoplobatrachus rugulosus*)

ก.เพศผู้ ข.เพศเมีย 2n=26 ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา

4.3 คาริโอไทป์ อิดิโอแกรม และสูตรโครงสร้างมาตรฐานของกบนา โดยการย้อมสีแบบธรรมดา

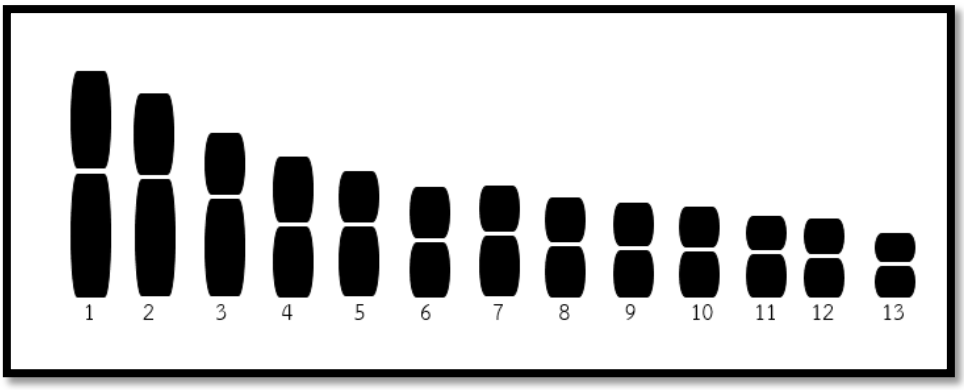


ก. กบนาเพศผู้ (Male *H.rugulosus*)

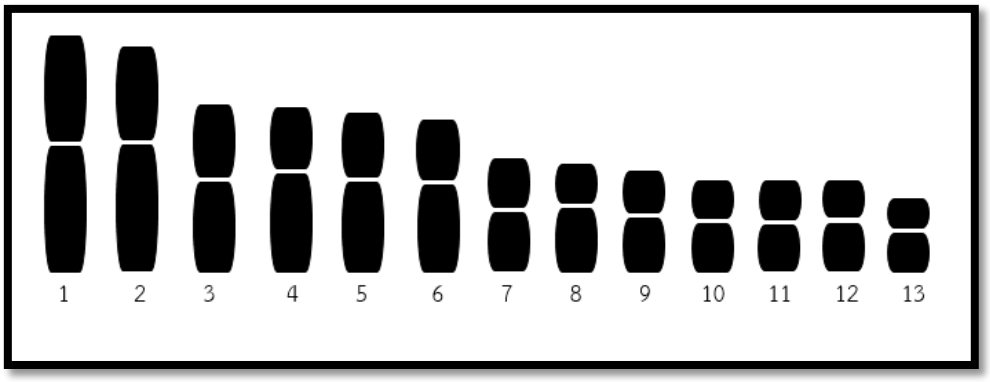


ข. กบนาเพศเมีย (Female *H.rugulosus*)

ภาพที่ 4.3 แสดงคาริโอไทป์ของกบนา (*Hoplobatrachus rugulosus*) ก.เพศผู้ ข.เพศเมีย 2n=26 ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา



ก . กบนาเพศผู้ (Male *H.rugulosus*)



ข . กบนาเพศเมีย (Female *H.rugulosus*)

ภาพที่ 4.4 แสดงอิดิโอแกรมของกบนา (*Hoplobatrachus rugulosus*) ก.เพศผู้ ข. เพศเมีย 2n=26 ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา

ตารางที่ 4.1 ค่าเฉลี่ยความยาวของแขนโครโมโซมข้างสั้น (Short arm; Ls) ความยาวของโครโมโซมข้างยาว (Long arm; Ll) ความยาวทั้งหมดของโครโมโซมแต่ละคู่ (Total length; LT)ค่า Relative length (RL) ค่า Centromeric index (CI) ขนาดและชนิดของโครโมโซมของกบนาเพศผู้แต่ละแท่งจากเซลล์ระยะเมทาเฟสจำนวน 10 เซลล์ (2n=26)

โครโมโซมคู่ที่	LS	LL	Lt	CI ± SD	RL ± SD	ขนาด	ชนิด
1	0.818	1.004	1.822	0.551 ± 0.007	0.135 ± 0.017	L	M
2	0.721	0.002	1.723	0.581 ± 0.001	0.128 ± 0.015	L	M
3	0.48	0.801	1.281	0.625 ± 0.014	0.095 ± 0.005	L	Sm
4	0.567	0.734	1.301	0.564 ± 0.003	0.097 ± 0.006	L	M
5	0.473	0.696	1.169	0.595 ± 0.005	0.087 ± 0.003	M	M
6	0.498	0.74	1.238	0.598 ± 0.006	0.092 ± 0.004	M	M
7	0.311	0.516	0.827	0.624 ± 0.013	0.061 ± 0.004	S	Sm
8	0.36	0.444	0.804	0.552 ± 0.006	0.060 ± 0.004	S	M
9	0.342	0.422	0.764	0.552 ± 0.006	0.057 ± 0.005	S	M
10	0.298	0.389	0.687	0.566 ± 0.002	0.051 ± 0.007	S	M
11	0.282	0.367	0.649	0.565 ± 0.003	0.048 ± 0.008	S	M
12	0.297	0.369	0.666	0.554 ± 0.006	0.049 ± 0.007	S	M
13	0.234	0.311	0.545	0.570 ± 0.00	0.040 ± 0.010	S	M

ตารางที่ 4.2 ค่าเฉลี่ยความยาวของแขนโครโมโซมข้างสั้น (Short arm; Ls) ความยาวของโครโมโซมข้างยาว (Long arm; Ll) ความยาวทั้งหมดของโครโมโซมแต่ละคู่ (Total length; LT) ค่า Relative length (RL) ค่า Centromeric index (CI) ขนาดและชนิดของโครโมโซมของกบนาเพศเมียแต่ละแท่ง จากเซลล์ระยะเมทาเฟสจำนวน 10 เซลล์ (2n=26)

โครโมโซมคู่ที่	LS	LL	Lt	CI ± SD	RL ± SD	ขนาด	ชนิด
1	0.754	0.944	1.689	0.559 ± 0.008	0.144 ± 0.019	L	M
2	0.63	0.899	1.529	0.588 ± 0.007	0.130 ± 0.015	L	M
3	0.504	0.764	1.268	0.603 ± 0.011	0.108 ± 0.009	L	Sm
4	0.491	0.549	1.04	0.528 ± 0.009	0.088 ± 0.003	M	M
5	0.399	0.532	0.931	0.571 ± 0.002	0.079 ± 0.008	M	M
6	0.359	0.465	0.824	0.564 ± 0.005	0.070 ± 0.001	S	M
7	0.399	0.423	0.822	0.515 ± 0.013	0.070 ± 0.001	S	M
8	0.336	0.396	0.732	0.541 ± 0.006	0.062 ± 0.004	S	M
9	0.306	0.354	0.66	0.536 ± 0.007	0.056 ± 0.005	S	M
10	0.323	0.377	0.7	0.539 ± 0.006	0.059 ± 0.004	S	M
11	0.255	0.326	0.581	0.623 ± 0.017	0.049 ± 0.007	S	Sm
12	0.256	0.297	0.553	0.537 ± 0.007	0.047 ± 0.008	S	M
13	0.204	0.236	0.44	0.536 ± 0.007	0.037 ± 0.011	S	M

4.4 ลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกของเขียดโม่ (*Ferjervaya limnocharis*)

ภาพที่ 4.5 ลักษณะภายนอกเขียดโม่ *(Ferjervaya limnocharis)*

สกุล : *Fejervarya*

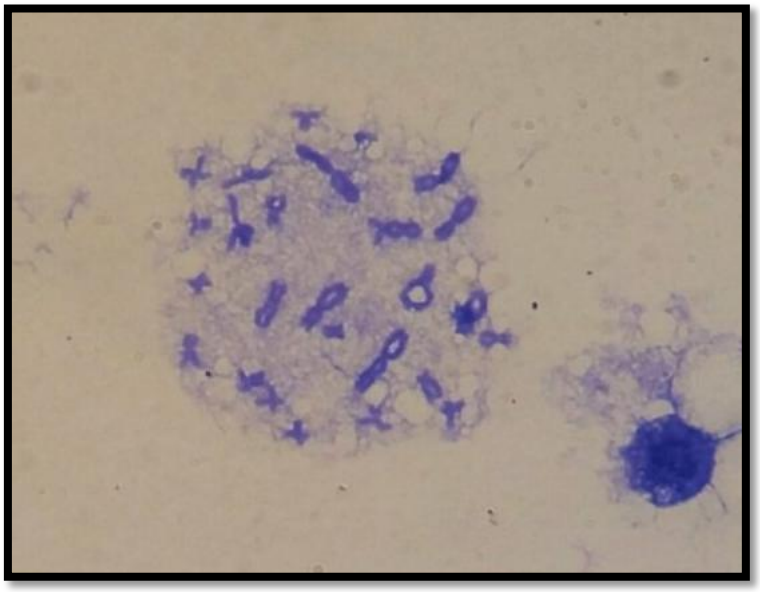
ชื่อวิทยาศาสตร์ : *(Ferjervaya limnocharis)*

ชื่อสามัญ : Grass frog, Rice field frog

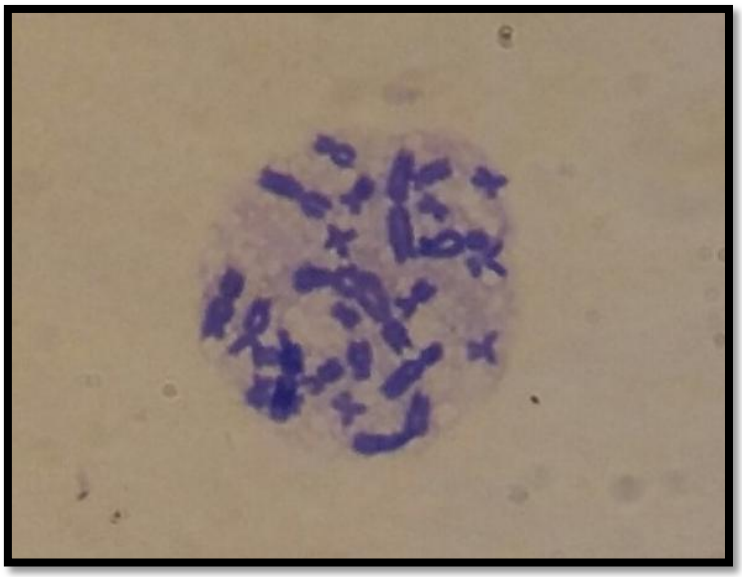
ชื่ออื่น : กบหนอง, เขียดอีโม้, เขียดบักโม้, เขียดตาโอด, เขียดหลังขีด, เขียดน้ำนอง, เขียดนา

ลักษณะทั่วไป : ลำตัวยาวประมาณ 30-61 มิลลิเมตร หัวเล็กรูปสามเหลี่ยม มีจมูกแหลม รูจมูกอยู่ชิดปลายปาก ระหว่างตา และจมูก มีสันนูนเด่น มีตาทั้งสองอยู่ใกล้กัน มีขอบที่เยื่อหู มีฟันบริเวณด้านบนเพดานปาก และบริเวณบนกระดูกขากรรไกร มีลิ้นใหญ่ ยืดหดได้ดี ผิวหนังด้านหลังใกล้กับหัวเรียบ ด้านหลัง และด้านข้างมีตุ่มขนาดเล็ก ผิวหนังมีสีเหลืองแกมน้ำตาล และแกมด้วยจุดลายสีน้ำตาลเข้มกระจายทั่วผิวหนัง บริเวณกลางหลังมีเส้นสีเหลืองลากผ่านจากปลายจมูกจนถึงก้น บางตัวมีแถบใหญ่ สีครีมหรือเหลือง หรือส้ม บริเวณด้านหลังของขาหลัง และขาหน้ามีตุ่มเล็กๆ สีเหลืองแกมน้ำตาล ผิวหนังที่คาง หน้าอก และท้องเรียบ ส่วนผิวหนังของต้นขาหลังมีตุ่มสีขาวกระจายทั่ว เขียดอีโม้เพศผู้ คางจะมีถุงเสียงใต้คางเป็นผิวหนังย่น และมีสีดำ (อนงค์ หัมพานนท์, 2526)

4.5 ผลการศึกษาจำนวน ขนาด รูปร่างของโครโมโซมเขียดโม่ด้วยการย้อมสีแบบธรรมดา



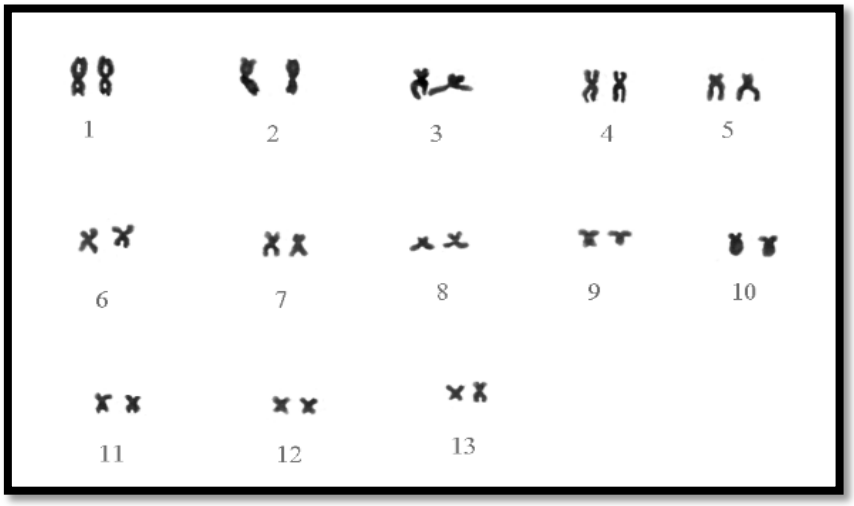
ก.เขียดโม่เพศผู้ (Male *F. limnocharis*)



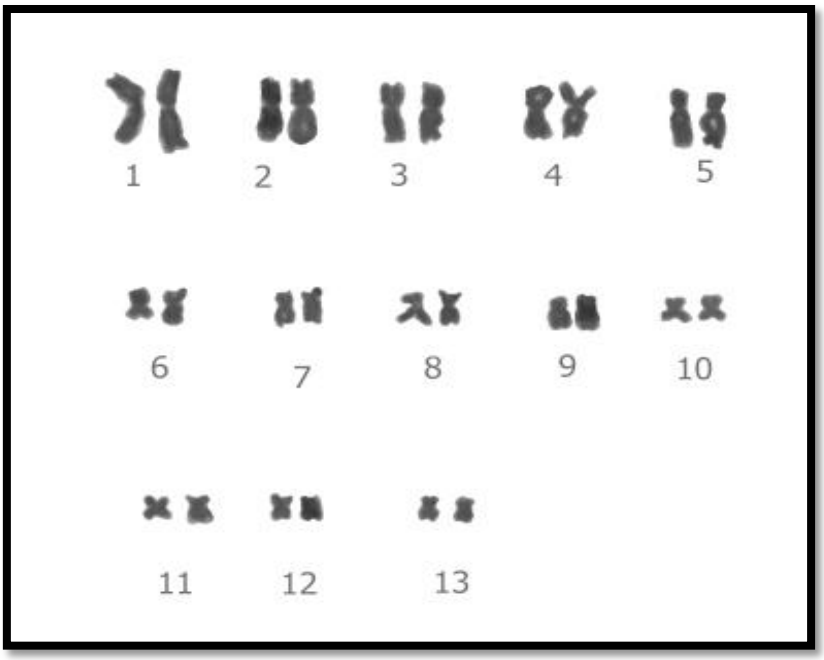
ข. เขียดโม่เพศเมีย *(*Female *F. limnocharis)*

ภาพที่ 4.6 แสดงเมทาเฟสโครโมโซมของเขียดโม่ *(Ferjervaya limnocharis)* ก.เพศผู้ ข.เพศเมีย 2n=26 ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา

4.6 คาริโอไทป์ อิดิโอแกรม และสูตรโครงสร้างมาตรฐานของเขียดโม่ โดยการย้อมสีแบบธรรมดา

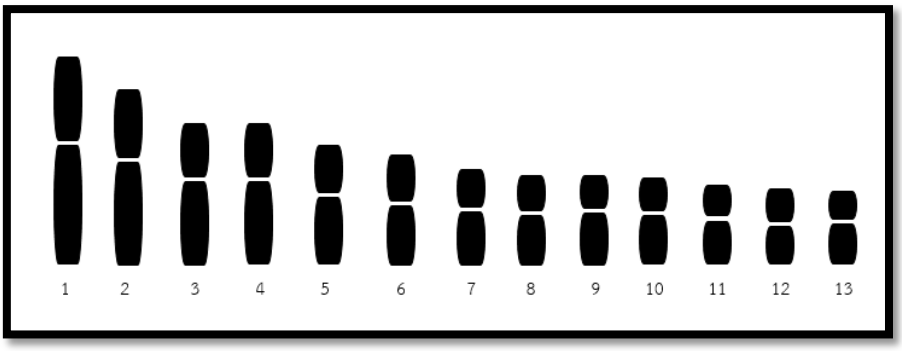


ก. เขียดโม่เพศผู้ (Male *F. limnocharis*)



ข. เขียดโม่เพศเมีย *(*Female *F. limnocharis)*

ภาพที่ 4.7 แสดงคาริโอไทป์ของเขียดโม่ *(Ferjervaya limnocharis)* ก.เพศผู้ ข.เพศเมีย 2n=26 ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา



ก. เขียดโม่ผู้ (Male *F. limnocharis*)

ข. เขียดโม่เมีย *(*Female *F. limnocharis)*

ภาพที่ 4.8 แสดงอิดิโอแกรมของเขียดโม่ *(Ferjervaya limnocharis)*

ก.เพศผู้ ข. เพศเมีย 2n=26 ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา

ตารางที่ 4.3 ค่าเฉลี่ยความยาวของแขนโครโมโซมข้างสั้น (Short arm; Ls) ความยาวของโครโมโซมข้างยาว (Long arm; Ll) ความยาวทั้งหมดของโครโมโซมแต่ละคู่ (Total length; LT) ค่า Relative length (RL) ค่า Centromeric index (CI) ขนาดและชนิดของโครโมโซมของเขียดโม่เพศผู้แต่ละแท่งจากเซลล์ระยะเมทาเฟสจำนวน 10 เซลล์ (2n=26)

โครโมโซมคู่ที่	LS	LL	Lt	CI ± SD	RL ± SD	ขนาด	ชนิด
1	0.541	0.768	1.309	0.587±0.0008	0.140±0.018	L	M
2	0.447	0.764	1.121	0.601±0.003	0.120±0.012	L	Sm
3	0.354	0.553	0.907	0.609±0.005	0.100±0.006	L	Sm
4	0.341	0.549	0.89	0.616±0.007	0.094±0.004	L	Sm
5	0.319	0.439	0.758	0.579±0.003	0.081±0.001	M	M
6	0.299	0.392	0.691	0.567±0.006	0.074±0.0008	M	M
7	0.24	0.381	0.621	0.613±0.006	0.066±0.003	S	Sm
8	0.225	0.344	0.569	0.604±0.004	0.061±0.004	S	Sm
9	0.233	0.334	0.567	0.589±0.0002	0.060±0.004	S	M
10	0.22	0.334	0.554	0.602±0.003	0.059±0.005	S	Sm
11	0.208	0.288	0.496	0.580±0.02	0.053±0.006	S	M
12	0.193	0.268	0.461	0.581±0.002	0.049±0.008	S	M
13	0.20	0.238	0.438	0.543±0.013	0.047±0.008	S	M

ตารางที่ 4.4 ค่าเฉลี่ยความยาวของแขนโครโมโซมข้างสั้น (Short arm; Ls) ความยาวของโครโมโซมข้างยาว (Long arm; Ll) ความยาวทั้งหมดของโครโมโซมแต่ละคู่ (Total length; LT) ค่า Relative length (RL) ค่า Centromeric index (CI) ขนาดและชนิดของโครโมโซมของเขียดโม่เพศเมียแต่ละแท่ง จากเซลล์ระยะเมทาเฟสจำนวน 10 เซลล์ (2n=26)

โครโมโซมคู่ที่	LS	LL	Lt	CI ± SD	RL ± SD	ขนาด	ชนิด
1	0.71	0.823	1.533	0.536 ± 0.007	0.144 ± 0.009	L	M
2	0.49	0.75	1.24	0.605 ± 0.012	0.116 ± 0.001	L	Sm
3	0.525	0.703	1.228	0.572 ± 0.002	0.115 ± 0.001	L	M
4	0.42	0.62	1.04	0.596 ± 0.009	0.098 ± 0.001	L	M
5	0.393	0.58	0.973	0.596 ± 0.009	0.091 ± 0.005	M	M
6	0.328	0.418	0.746	0.560 ± 0.008	0.070 ± 0.011	S	M
7	0.265	0.361	0.626	0.577 ± 0.004	0.059 ± 0.015	S	M
8	0.27	0.35	0.62	0.565 ± 0.005	0.058 ± 0.015	S	M
9	0.25	0.34	0.59	0.576 ± 0.003	0.055 ± 0.016	S	M
10	0.255	0.32	0.545	0.587 ± 0.006	0.051 ± 0.017	S	M
11	0.245	0.285	0.53	0.538 ± 0.007	0.050 ± 0.017	S	M
12	0.23	0.26	0.49	0.531 ± 0.009	0.046 ± 0.018	S	M
13	0.25	0.24	0.49	0.490 ± 0.006	0.046 ± 0.024	S	M

4.7 ลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกของคางคกบ้าน *(Duttaphrynus melanostictus)*

ภาพที่ 4.9 ลักษณะภายนอกของคางคกบ้าน ***(Duttaphrynus melanostictus)***

สกุล : *Duttaphrynus*

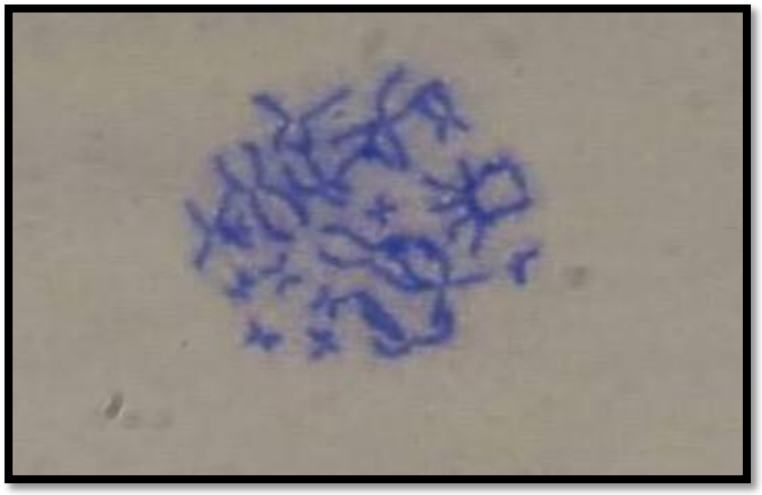
ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Duttaphrynus melanostictus*

ชื่อสามัญ : Asian common toad, Black-spined toad

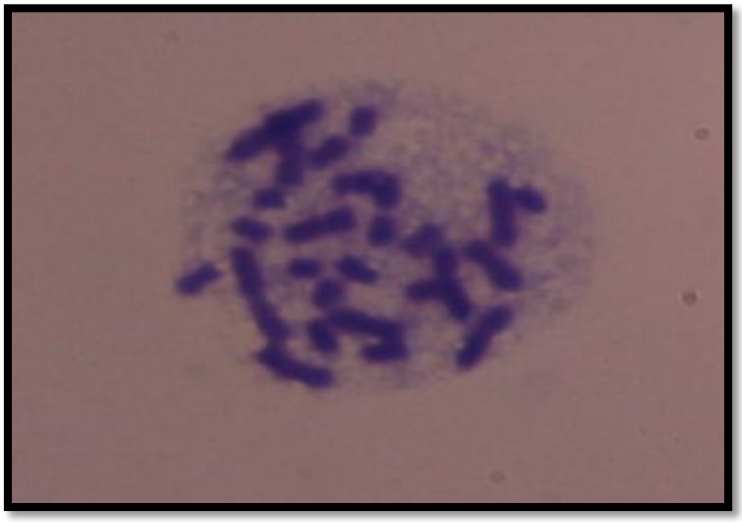
ชื่ออื่น : ขี้คันคาก (อีสาน), เข้าเย็น, เข้าเห็น (ลำปาง), ยางมอน (เชียงราย), มาตับละกวาย(เชียงใหม่), หญ้าเมา (เงี้ยว), ผีเสื้อ (โคราช)

ลักษณะทั่วไป : มีผิวหนังที่แห้งและมีปุ่มปมทั้งตัว ที่เป็นปุ่มพิษ โดยเฉพาะหลังลูกตา มีรูปทรงกลมคล้ายเมล็ดถั่วขนาดยาวประมาณ 25 มิลลิเมตร กว้าง 10 มิลลิเมตร แผ่นหูมีลักษณะเห็นได้ชัดเจน ขนาดเล็กกว่าลูกตาเล็กน้อย มีสีผิวหนังเป็นสีน้ำตาลหรือสีเทาตลอดทั้งลำตัว บริเวณรอบปุ่มพิษจะมีสีเข้มกว่าบริเวณอื่น ๆ ใต้ท้องเป็นสีน้ำตาลเหลืองอ่อน ในขณะที่ยังเป็นวัยอ่อนจะเป็นสีขาวซีดกว่า (วิรยุทธ์ เลาหะจินดา, 2552)

4.8 ผลการศึกษาจำนวน ขนาด รูปร่างของโครโมโซมคางคกด้วยการย้อมสีแบบธรรมดา



ก. คางคกบ้านเพศผู้ (Male *D.melanostictus*)

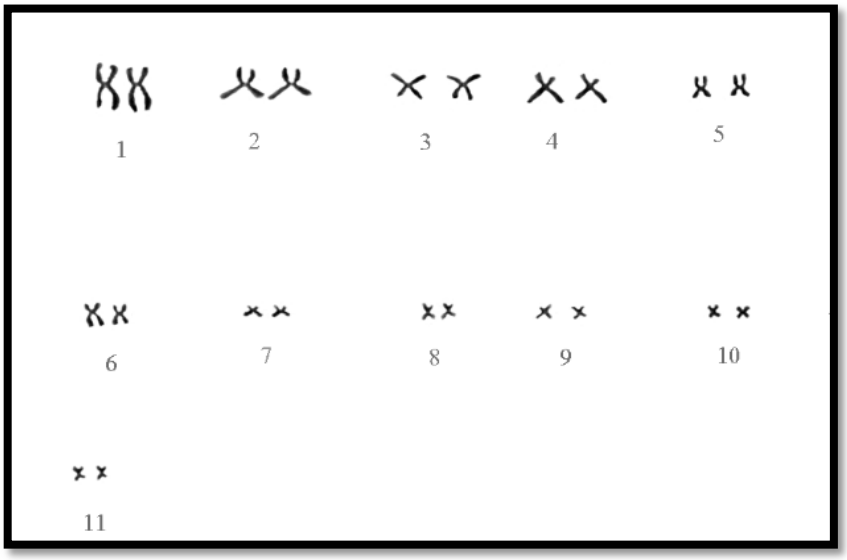


ข. คางคกบ้านเพศเมีย (Female *D.melanostictus*)

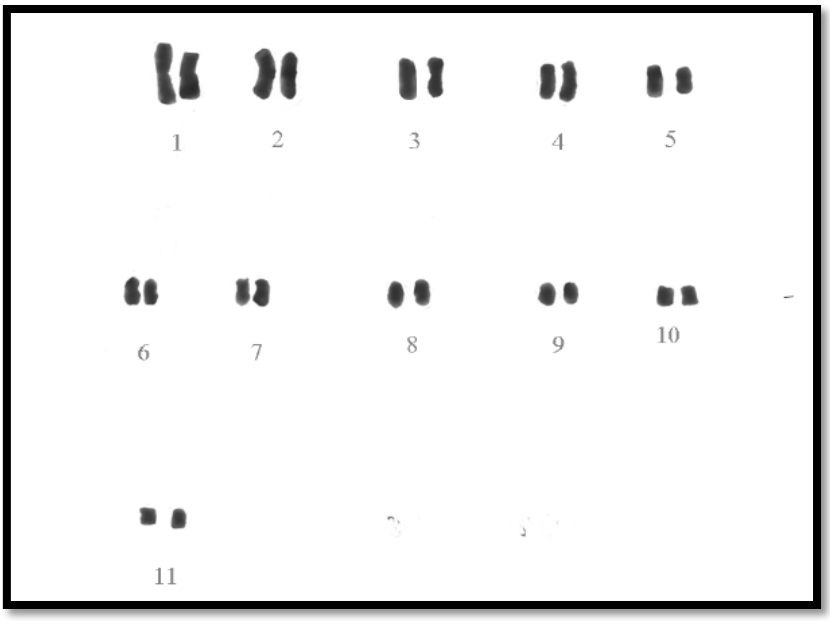
ภาพที่ 4.10 แสดงเมทาเฟสโครโมโซมของคางคกบ้าน *(Duttaphrynus melanostictus)*

ก.เพศผู้ ข.เพศเมีย 2n=22 ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา

4.9 คาริโอไทป์ อิดิโอแกรม และสูตรโครงสร้างมาตรฐานของคางคกบ้าน โดยการย้อมแบบสีธรรมดา



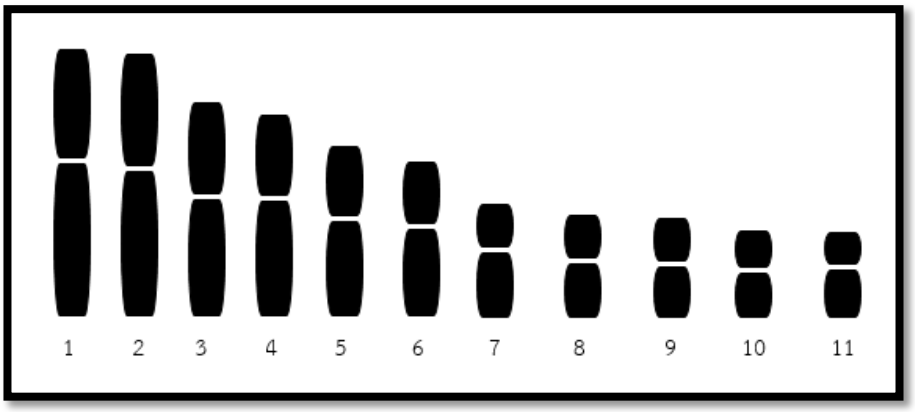
ก. คางคกบ้านเพศผู้ (Male *D.melanostictus*)



ข. คางคกบ้านเพศเมีย (Female *D.melanostictus*)

ภาพที่ 4.11 แสดงคาริโอไทป์ของคางคกบ้าน (Duttaphrynus melanostictus)
ก.เพศผู้ ข.เพศเมีย 2n=22 ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา

ก. คางคกบ้านเพศผู้ (Male *D.melanostictus*)



ข. คางคกบ้านเพศเมีย (Female *D.melanostictus*)

ภาพที่ 4.12 แสดงคาริโอไทป์ของคางคกบ้าน *(Duttaphrynus melanostictus)*

ก.เพศผู้ ข.เพศเมีย 2n=22 ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา

ตารางที่ 4.5 ค่าเฉลี่ยความยาวของแขนโครโมโซมข้างสั้น (Short arm; Ls) ความยาวของโครโมโซมข้างยาว (Long arm; Ll) ความยาวทั้งหมดของโครโมโซมแต่ละคู่ (Total length; LT) ค่า Relative length (RL) ค่า Centromeric index (CI) ขนาดและชนิดของโครโมโซมของคางคกบ้านเพศผู้แต่ละแท่ง จากเซลล์ระยะเมทาเฟสจำนวน 10 เซลล์ (2n=22)

โครโมโซมคู่ที่	LS	LL	Lt	CI ± SD	RL ± SD	ขนาด	ชนิด
1	0.618	0.923	1.604	0.575 ± 0.007	0.170 ± 0.02	L	M
2	0.568	0.72	1.288	0.586 ± 0.01	0.136 ± 0.01	L	M
3	0.51	0.681	1.191	0.571 ± 0.006	0.126 ± 0.01	L	M
4	0.439	0.59	1.029	0.573 ± 0.006	0.109 ± 0.007	L	M
5	0.368	0.551	0.919	0.599 ± 0.01	0.097 ± 0.003	M	M
6	0.341	0.449	0.79	0.568 ± 0.005	0.084 ± 0.0004	S	M
7	0.313	0.39	0.703	0.554 ± 0.006	0.074 ± 0.003	S	M
8	0.268	0.275	0.543	0.506 ± 0.01	0.001 ± 0.02	S	M
9	0.245	0.245	0.49	0.5 ± 0.01	0.052 ± 0.01	S	M
10	0.208	0.243	0.451	0.538 ± 0.004	0.048 ± 0.01	S	M
11	0.21	0.205	0.205	0.5 ± 0.01	0.044 ± 0.01	S	M

ตารางที่ 4.6 ค่าเฉลี่ยความยาวของแขนโครโมโซมข้างสั้น (Short arm; Ls) ความยาวของโครโมโซมข้างยาว (Long arm; Ll) ความยาวทั้งหมดของโครโมโซมแต่ละคู่ (Total length; LT) ค่า Relative length (RL) ค่า Centromeric index (CI) ขนาดและชนิดของโครโมโซมของคางคกบ้านเพศเมียแต่ละแท่ง จากเซลล์ระยะเมทาเฟสจำนวน 10 เซลล์ (2n=22)

โครโมโซมคู่ที่	LS	LL	Lt	CI ± SD	RL ± SD	ขนาด	ชนิด
1	0.803	1.1	1.903	0.578 ± 0.001	0.155 ± 0.01	L	M
2	0.808	1.04	1.848	0.563 ± 0.003	0.151±0.001	L	M
3	0.66	0.85	1.51	0.563 ± 0.003	0.123 ± 0.02	L	M
4	0.583	0.835	1.418	0.589 ± 0.004	0.116 ± 0.02	L	M
5	0.513	0.69	1.203	0.574 ± 0.001	0.098 ± 0.02	M	M
6	0.445	0.618	1.063	0.581 ± 0.002	0.087 ± 0.03	M	M
7	0.315	0.47	0.785	0.599 ± 0.007	0.064 ± 0.03	S	M
8	0.29	0.373	0.663	0.562 ± 0.003	0.054 ± 0.04	S	M
9	0.24	0.353	0.593	0.595 ± 0.006	0.048 ± 0.04	S	M
10	0.268	0.335	0.603	0.556 ± 0.005	0.049 ± 0.04	S	M
11	0.3	0.37	0.67	0.552 ± 0.006	0.055 ± 0.04	S	M

บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผลวิจัย

5.1 สรุปผลการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้สรุปผลได้ว่า กบนาเพศผู้และเพศเมีย มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์คือ 26 แท่ง (13 คู่) มีจำนวนโครโมโซมพื้นฐาน (Fundamental number , NF) เท่ากับ 52 แท่ง เขียดโม่เพศผู้และเพศเมีย มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์คือ 26 แท่ง (13 คู่) มีจำนวนโครโมโซมพื้นฐาน (Fundamental number , NF) เท่ากับ 52 แท่ง และคางคกบ้านเพศผู้และเพศเมีย มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์คือ 22 แท่ง (11 คู่) มีจำนวนโครโมโซมพื้นฐาน (Fundamental number , NF) เท่ากับ 44 แท่ง

การศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ คาริโอไทป์ และอิดิโอแกรมของกบนาเพศผู้เพศเมีย เขียดโม่เพศผู้เพศเมีย และคางคกบ้านเพศผู้เพศเมีย ในพื้นที่มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม อำเภอเมือง จังหวัดมหาสารคาม โดยวิธีการเตรียมโครโมโซมโดยตรงจากเซลล์ไขกระดูกด้วยวิธีการสับให้ละเอียด ย้อมสีโครโมโซมด้วยสี Giemsa's ความเข้มข้น 10 % คาริโอไทป์ของกบนาเพศผู้ประกอบด้วยโครโมโซม 3 ขนาดคือ ขนาดใหญ่ ขนาดกลาง และขนาดเล็ก ซึ่งประกอบไปด้วย 2 ชนิดคือ ชนิดเมทาเซนทริกและซับเมทาเซนทริก แบ่งได้เป็น ชนิดเมทาเซนทริกขนาดใหญ่ 2 แท่ง ซับเมทาเซนทริกขนาดใหญ่ 1 แท่ง เมทาเซนทริกขนาดกลาง 2 แท่ง เมทาเซนทริกขนาดเล็ก 7 แท่ง ซับเมทาเซนทริกขนาดเล็ก 1 แท่ง จากการวิเคราะห์คาริโอไทป์ของกบนาเพศผู้ในครั้งนี้ พบว่ามีโครโมโซมจัดเป็น 3 ขนาด คือ ขนาดใหญ่ คู่ที่ 1-3 ขนาดกลาง คู่ที่ 4 และขนาดเล็ก คู่ที่ 5-13 และสามารถแบ่งโครโมโซมได้เป็น 2 ชนิด คือ เมทาเซนทริก คู่ที่ 1-2, 4-13 ซับเมทาเซนทริก คู่ที่ 3 มีสูตรคาริโอไทป์ ดังนี้ $2n(26) = L^{m}_{2} + L^{sm}_{1} + M^{m}_{2} + S^{m}_{7} + S^{sm}_{1}$ คาริโอไทป์ของกบนาเพศเมียประกอบด้วยโครโมโซม 3 ขนาดคือ ขนาดใหญ่ ขนาดกลาง และขนาดเล็ก ซึ่งประกอบไปด้วย 2 ชนิดคือ ชนิดเมทาเซนทริกและซับเมทาเซนทริก แบ่งได้เป็น ชนิดเมทาเซนทริกขนาดใหญ่ 3 แท่ง ซับเมทาเซนทริกขนาดใหญ่ 1 แท่ง เมทาเซนทริกขนาดกลาง 2 แท่ง เมทาเซนทริกขนาดเล็ก 6 แท่ง ซับเมทาเซนทริกขนาดเล็ก 1 แท่ง จากการวิเคราะห์คาริโอไทป์ของกบนาเพศเมียในครั้งนี้ พบว่ามีโครโมโซมจัดเป็น 3 ขนาด คือ ขนาดใหญ่ คู่ที่ 1-4 ขนาดกลาง คู่ที่ 5-6 และขนาดเล็ก คู่ที่ 7-13 และสามารถแบ่งโครโมโซมได้เป็น 2 ชนิด คือ เมทาเซนทริก คู่ที่ 1-2, 4-6, 8-13 ซับเมทาเซนทริก คู่ที่ 3, 7 มีสูตรคาริโอไทป์ ดังนี้ $2n(26) = L^{m}_{3} + L^{sm}_{1} + M^{m}_{2} + S^{m}_{6} + S^{sm}_{1}$ คาริโอไทป์ของเขียดโม่เพศผู้ ประกอบด้วยโครโมโซม 3 ขนาดคือ ขนาดใหญ่ ขนาดกลาง และขนาดเล็ก ซึ่งประกอบไปด้วย 2 ชนิดคือ ชนิดเมทาเซนทริกและซับเมทาเซนทริก แบ่งได้เป็น ชนิดเมทาเซนทริกขนาดใหญ่ 1 แท่ง ซับเมทาเซนทริกขนาดใหญ่ 3 แท่ง เมทาเซนทริกขนาดกลาง 2 แท่ง เมทาเซนทริกขนาดเล็ก 4 แท่ง ซับเมทาเซนทริกขนาดเล็ก 3 แท่ง จากการวิเคราะห์คาริโอไทป์ของเขียดโม่เพศผู้ในครั้งนี้ พบว่ามีโครโมโซมจัดเป็น 3 ขนาด คือ

ขนาดใหญ่ คู่ที่ 1-4 ขนาดกลาง คู่ที่ 5-6 และขนาดเล็ก คู่ที่ 7-13 และสามารถแบ่งโครโมโซมได้เป็น 2 ชนิด คือ เมทาเซนทริก คู่ที่ 1, 5-6, 9, 11-13 ซับเมทาเซนทริก คู่ที่ 2-4, 7-8, 10 มีสูตรคาริโอไทป์ ดังนี้ 2n (26) = L^{m}_{1} + L^{Sm}_{3} + M^{m}_{2} + S^{Sm}_{3} + S^{m}_{4} คาริโอไทป์ของเขียดโม่เพศเมีย ประกอบด้วยโครโมโซม 3 ขนาดคือ ขนาดใหญ่ ขนาดกลาง และขนาดเล็ก ซึ่งประกอบไปด้วย 2 ชนิดคือ ชนิดเมทาเซนทริกและซับเมทาเซนทริก แบ่งได้เป็น ชนิดเมทาเซนทริกขนาดใหญ่ 3 แท่ง ซับเมทาเซนทริกขนาดใหญ่ 1 แท่ง เมทาเซนทริกขนาดกลาง 1 แท่ง เมทาเซนทริกขนาดเล็ก 8 แท่ง จากการวิเคราะห์คาริโอไทป์ของเขียดโม่เพศเมียในครั้งนี้ พบว่ามีโครโมโซมจัดเป็น 3 ขนาด คือ ขนาดใหญ่ คู่ที่ 1-4 ขนาดกลาง คู่ที่ 5 และขนาดเล็ก คู่ที่ 6-13 และสามารถแบ่งโครโมโซมได้เป็น 2 ชนิด คือ เมทาเซนทริก คู่ที่ 1, 3-13 ซับเมทาเซนทริก คู่ที่ 2 มีสูตรคาริโอไทป์ ดังนี้ 2n (26) = L^{m}_{3} + L^{Sm}_{1} + M^{m}_{1} + S^{m}_{8} คาริโอไทป์ของคางคกบ้านเพศผู้ ประกอบด้วยโครโมโซม 3 ขนาดคือ ขนาดใหญ่ ขนาดกลาง และขนาดเล็ก ซึ่งประกอบไปด้วย 2 ชนิดคือ ชนิดเมทาเซนทริกและซับเมทาเซนทริก แบ่งได้เป็น ชนิดเมทาเซนทริกขนาดใหญ่ 4 แท่ง เมทาเซนทริกขนาดกลาง 1 แท่ง เมทาเซนทริกขนาดเล็ก 6 แท่ง จากการวิเคราะห์คาริโอไทป์ของคางคกบ้านเพศผู้ในครั้งนี้ พบว่ามีโครโมโซมจัดเป็น 3 ขนาด คือ ขนาดใหญ่ คู่ที่ 1-4 ขนาดกลาง คู่ที่ 5 และขนาดเล็ก คู่ที่ 6-11 และสามารถแบ่งโครโมโซมได้เป็น 2 ชนิด คือ เมทาเซนทริก คู่ที่ 1-11 มีสูตรคาริโอไทป์ ดังนี้ 2n (22) = L^{m}_{4} + M^{m}_{1} + S^{m}_{6} คาริโอไทป์ของคางคกบ้านเพศเมีย ประกอบด้วยโครโมโซม 3 ขนาดคือ ขนาดใหญ่ ขนาดกลาง และขนาดเล็ก ซึ่งประกอบไปด้วย 2 ชนิดคือ ชนิดเมทาเซนทริกและซับเมทาเซนทริก แบ่งได้เป็น ชนิดเมทาเซนทริกขนาดใหญ่ 4 แท่ง เมทาเซนทริกขนาดกลาง 2 แท่ง เมทาเซนทริกขนาดเล็ก 5 แท่ง จากการวิเคราะห์คาริโอไทป์ของคางคกบ้านเพศเมียในครั้งนี้ พบว่ามีโครโมโซมจัดเป็น 3 ขนาด คือ ขนาดใหญ่ คู่ที่ 1-4 ขนาดกลาง คู่ที่ 5-6 และขนาดเล็ก คู่ที่ 7-11 และสามารถแบ่งโครโมโซมได้เป็น 2 ชนิด คือ เมทาเซนทริก คู่ที่ 1-11 มีสูตรคาริโอไทป์ ดังนี้ 2n (22) = L^{m}_{4} + M^{m}_{2} + S^{m}_{5}

5.2 อภิปรายผลการวิจัย

งานวิจัยครั้งนี้เป็นงานวิจัยที่ได้ทำการเปรียบเทียบ โครโมโซมของกบนาเพศผู้เพศเมีย เขียดโม่เพศผู้เพศเมีย คางคกบ้านเพศผู้เพศเมีย ดังนี้

5.2.1 จำนวนโครโมโซมดิพลอยด์

กบนาเพศผู้และเพศเมีย มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ 2n=26 แท่ง เท่ากันสามารถนับจำนวนได้ จัดทำคาริโอไทป์และอิดิโอแกรมต่างกันและไม่พบโครโมโซมเพศ ซึ่งผลการศึกษาครั้งนี้สอดคล้องกับรายงานของ (Formas and Vera , 1983) ที่รายงานว่า พบว่ามีจำนวนโครโมโซม 2n=26 แท่ง เท่ากันแต่มีคาริโอไทป์ต่างกันและไม่พบโครโมโซมเพศ

เขียดโม่เพศผู้และเพศเมีย มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ 2n=26 แท่ง เท่ากันสามารถนับจำนวนได้ จัดทำคาริโอไทป์และอิดิโอแกรมต่างกันและไม่พบโครโมโซมเพศ ซึ่งผลการศึกษาครั้งนี้

สอดคล้องกับรายงานของ ถาวร สุภาพรม และประจักษ์ จันทร์ศรี (2542) พบว่ามีโครโมโซม 2n=26 เท่ากันแต่มีคาริโอไทป์แตกต่างกันและไม่พบโครโมโซมเพศ

คางคกบ้านเพศผู้เพศเมีย มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ 2n=22 เท่ากันสามารถนับจำนวนได้ จัดทำคาริโอไทป์และอิดิโอแกรมต่างกันและไม่พบโครโมโซมเพศ ซึ่งผลการศึกษาสอดคล้องกับรายงานของ (Schmid , 1978a)พบว่ามีโครโมโซม 2n=22 เท่ากันแต่มีคาริโอไทป์แตกต่างกันและโครโมโซมไม่สามารถบ่งบอกความแตกต่างทางเพศได้

5.2.2 ชนิด รูปร่าง และขนาดของโครโมโซมร่างกายและโครโมโซมเพศ

กบนาเพศผู้เพศเมีย เขียดโม่เพศผู้เพศเมีย และคางคกบ้านเพศผู้เพศเมีย มีจำนวนโครโมโซมร่างกาย 2 ชนิด ได้แก่ ชนิดเมทาเซนทริก และชนิดซับเมทาเซนทริก ไม่พบชนิดอโครเซน-ทริก และชนิดเทโลเซนทริก โดยโครโมโซมขนาดใหญ่ พบชนิดเมทาเซนทริกและซับเมทาเซนทริก โครโมโซมขนาดกลางพบชนิดเมทาเซนทริก และโครโมโซมขนาดเล็ก พบชนิดเมทาเซนทริกและซับเมทาเซนทริก ซึ่งผลการศึกษาครั้งนี้สอดคล้องกับรายงานของ (ถาวร สุภาพรม และคณะ 2535) (Schmid , 1978a) (Formas and Vera , 1983) ศึกษาโครโมโซมและคาริไทป์ของกบนา เขียดโม่ และคางคกบ้าน พบโครโมโซม 2 ชนิด ได้แก่ ชนิดเมทาเซนทริกและซับเมทาเซนทริก

5.3 ข้อเสนอแนะ

ควรจะได้นำเทคนิคและวิธีการต่างๆ ไปประยุกต์ใช้กับการศึกษาสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกชนิดอื่น ตลอดจนสัตว์กระดูกสันหลังชนิดอื่นด้วย และควรมีการศึกษาการย้อมแถบสีแบบต่าง ๆ ควบคู่กันไปกับการนำเทคนิคด้านชีวโมเลกุลมาใช้ในการศึกษาการจัดจำแนก และความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในประเทศไทย โดยเฉพาะพวกที่มีรูปร่างลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายคลึงกัน ยากต่อการจัดจำแนกโดยใช้ลักษณะภายนอกแต่เพียงอย่างเดียว

บรรณานุกรม

กันยารัตน์ ไชยสุต. (2532). **เซลล์พันธุศาสตร์และเซลล์อนุกรมวิธานของพืชสกุล Zephyranthes.** กรุงเทพฯ: ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

จารุจินต์ นภีตะภัฎ. (2531). **สัตว์สะทินน้ำสะเทินบก** . กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์คุรุสภาลาดพร้าว.

ถาวร สุภาพรม และคณะ. 2534. **การศึกษาการเจริญเติบโตและคาริโอไทป์ของเขียดจิกและเขียดอิโม่**. การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 17. ขอนแก่น. B-060 .หน้า 450-451.

ถาวร สุภาพรม และประภาพร กัลยาประสิทธิ์. (2535). **การศึกษาโครโมโซมของอึ่งบ้านและคางคกบ้าน. บทคัดย่อการสัมมนาวิชาการพันธุศาสตร์** ครั้งที่ 7. [ม.ป.ท.: ม.ป.พ.].

ถาวร สุภาพรม และคณะ. 2537. **รายงานครั้งแรกเกี่ยวกับจำนวนโครโมโซมและคาริโอไทป์ของอึ่งขาคำ** (*Microhyla pulchra* Hollowell) **และอึ่งก้นขีด** (*Kaloula mediolineata* Smith). การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 20 กรุงเทพฯ . B-36 . หน้า 326-327.

ถาวร สุภาพรม. 2541. **การวิเคราะห์โครโมโซมที่ย้อมแถบซี (C-banding) ในอึ่งบ้าน.** การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 24 กรุงเทพฯ . B-031. หน้า 488-489.

ถาวร สุภาพรม และประจักษ์ จันทร์ศรี . 2542. **การศึกษาโครโมโซมและคาริโอไทป์ของเขียดจิกปากแหลมและอึ่งกรายเอวจุด.** การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 25. กรุงเทพฯ. B-028. หน้า 614-615.

ธัญญา จั่นอาจ. (2546). **คู่มือสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในเมืองไทย.** กรุงเทพฯ: ด่านสุธาการพิมพ์.

ธวัช ดอนสกุล. 2552. คาริโอไทป์ของเซลล์ตับในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก 7 ชนิด ที่พบในประเทศไทย. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 43 กรุงเทพฯ. B-035. หน้า 544 – 551.

ธวัช ดอนสกุล และอัจฉริยา รังษิรุจิ.2548a. คาริโอไทป์ของเซลล์ตับในกบภูเขา เขียดบัว เขียดกาญจนบุรี เขียดน้ำนอง และอึ่งเผ้า. **ในเรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 43**. สาขาวิทยาศาสตร์. หน้า 544 - 551.

นงลักษณ์ นาคเกษม. (2544). **การศึกษาการเจริญเติบโตและคาริโอไทป์ของกบหนอง อึ่งอ่างและคางคกไทย**.วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพฤกษศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. (เอกสารอัดสำเนา).

นงลักษณ์ นาคเกษม. 2518. การศึกษาการเจริญเติบโต และคาริโอไทป์ของกบ อึ่งอ่าง และคางคกไทย. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ.

ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ. (2546). **พันธุศาสตร์**. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ: ภาควิชาพันธุศาสตร์คณะวิทยาศาลตร์มหาวิทยาลัยเกษตรศาลตร์.

ภาณุวัฒน์ นาคสิงห์. (2546). **คู่มือการเพาะเลี้ยงกบเชิงพานิชย์**. กรุงเทพฯ : เพชรกะรัต สตูดิโอ.

วิโรจน์ นุตพันธ์. (2544). **สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในประเทศไทย**. กรุงเทพฯ : บ้านและสวน.

วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล และคณะ. 2544. การศึกษาคาริโอไทป์ของสิ่งมีชีวิต. รายงานการวิจัยโครงการ BRT. หน้า 360-378 .

วรรณภา กสิฤกษ์, ณัฐวุฒิ เหลืองอ่อน และอลงกลด แทนออมทอง. 2557. **พันธุศาสตร์เซลล์ของปลาแมนดาริน**. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์. สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา. ชลบุรี.

สมชาย เลี้ยงพรพรรณ. (2540). **การอนุรักษ์ทรัพยากรสัตว์ป่าในประเทศไทย**. กรุงเทพฯ: ภาควิชาภูมิศาสตร์ คณะมนุษย์ศาสตร์และสังคมศาสตร์มหาวิทยาลัยมหิดล

สมพร ประเสริฐส่งสกุล. (2547). **พันธุศาสตร์โมเลกุล**. สงขลา: คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสงขลานครินร์ วิทยาเขตปัตตานี

อมรา คัมภิรานนท์. (2546). **พันธุศาสตร์ของเซลล์.** กรุงเทพฯ: ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Birstein ,V.J. 1984. Localization of NORs in karyotypes of four *Rana – Species. Genetica* 64 : 149-154.

Bogart ,J.P. 1974. Akaryosystematic study of frog in the genus Leptodactylus. (Anura,Leptodactylidac). *Copeia* 3 : 728-737.

Formas and Vara, 1983. Systematic problems in the frog specics *Eupsophus . roseus* (Aura : Leptodactylidae) detected by karyotypes analysis. *Experientia* 34 : 646.

Giessmann, T. (2002). Taxonomy and evolution of gibbons. **Primatology and Anthropolgy**, 1, 28-31.

Halana, R.e. (1989). **Cytogenetics of Animals**. Wallingford : C.A.B. international.

Heyer , W.R. 1969. The adaptive ecology of the species groups of the genus *Leptodactylus* (Amphibia,Leptodactylidae). *Evolution* 23 : 421-428.

Iturra P, Veloso A (1989) Further evidence for early sex chromosome differentiation of Anuran species. *Genetica* 78: 25-31.

Kuramoto , M. 1980. Karytypes of several frogr from korea, Taiwan and the Philippines. *Experientia* 36 : 826-828.

Lynch, J.D. 1971. Evolutionary relationships , osteology and Zoogeography of leptodactyloid frogs. *Misc. Fubl , Univ Kansas Mus. Nat. Hist.* 53

Lynch, J.D. 1973. The transitional from archaic to advanced frog. P. 133-182. In Evolutionary Biology of anurans. *T.L. Vial (ed). Missouri Press ,* Columbia.

Mahony ,M.J. 1991. Heteromorphic sex chromosomes in the Austalian frogs *Crinia bilingual* (Anura, Myobatrachidae). *Genom* 34 : 334-337.

Matsui. 1995. Karyotype of ranid frog *Platymantis pelewensis* from Belau, Micronesia, with comments on its systematics implications. *Pacific Science* 49 (3) : 296-300.

Matsui, Masafumi; Jarujin Nabhitabhata; Somsak Panha (1999). On Leptobrachium fromThailand with a description of a new species (Anura: Pelobatidae) . Japanese Journal of Herpetology 18 (1): 19–29.

Nishioka. M., Okamota and M. Ryuzaki . 1987. A comparative study on the karyotype of pond frogs distributed in Japan, Korea, Taiwan, Europe and North America. Sci. Rep. Lab. *Amphibian Biol .* Hiroshima Univ. 9 : 135-163.

Ohta H, Matsui M. 1995. Karyotype of a ranid frog, Platymantis pelewensis, from Belau, Micronesia, with comments on its systematic implications. Pac Sci 49(3): 296-300.

Schmid ,M. 1978 a. Chromosme banding in amphibian I. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in *Bufo* and *Ityla. Chromosme.* 66 : 361-368.

Schmid, M. (1982). Chromosome banding in amphibian Vll. Analysis of the sturcutre and varability of NORs in Anura. **Chromosoma**, 87, 237-344.

Schmid ,M.,S. Ohta, C.steinlein and M, Guttenbach. 1988. Chromosome banding in amphibian XIX. Primitive ZW/ZZ sex chromosomes in *Buer garia buergeri* (Anura , Rhacopharidae). Cytogen. *Cell Genet.* 62 : 238-246 .

Storer ,T.C. and R.L. Usinger. 1957. *General Zoology.* MC Graw-Hill Book Company I nc ., New York.

Siripiyasing, P., Chulalaksananukul, W., Pariyanonth, P., Kaewsri, S., Sittigul, S., Seatung, N. and Tanomtong, A. (2008). **The identification of the sex chromosome and karyotype of four toad species (Genus Bufo) in Thailand by T-lymphocyte cell culture**. Cytologia, 73 (3), 229-241.

Schmid ,M,C.steinlein and .W. Feichtinger. 1988. **Chromosome banding in amphibian XIV. The karyotype of *Cantrolenella antisthenesi* (Anura , Centrolenidae). *Chromosoma*** (Birl.). 97 : 434-438.

Taylor ,E.H. 1962. The Amphibian Fauna of Thailand. *The University of Kansas Science Bulletin.* 43 : 265-599.

Tymoska ,J. and M.Fischery. 1973. **Chromosome complements of the genus *Xenopus. Chromosoma* (Birl.)**. 44 : 335-342.

Ullerich ,F.H. 1966. **Karyotype and DNS-Gehalt von *Bufo bufo, B. viridis , B. bufo x B. viridis* and *B. calamita* (Amphibia , Anura). *Chromosoma*** (Birl.). 18 : 316-342.

Wasserman ,A.o. and J.P. Bogart. 1968. **Chromosoma of two Species of spade toad (genus *Scaphiopus*) and their hybrid**. *Copeia* 2 : 303-306.

รายงานการวิจัย

เรื่อง

พันธุศาสตร์เซลล์ของสัตวสะเทินน้ำสะเทินบกบางชนิด ในมหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม

Cytogenetics of some Amphibians in Rajabhat Mahasarakham University

พรณรงค์ สิริปิยะสิงห์
จิรกรานต์ ศรีหาบุตร
ช่อเพชร ย่อมสวัสดิ์
ชลธิชา อุ่นบุญ

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
2561
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
(งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากงบประมาณแผ่นดินด้านการวิจัยปีงบประมาณ2560)

ประวัติผู้วิจัย

1. (ชื่อ - สกุล ไทย) นายพรณรงค์ สิริปิยะสิงห์

(ชื่อ – สกุล อังกฤษ) Mr. Pornnarong Siripiyasing

ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์

การศึกษา

2558	ปริญญาเอก	ปร.ด.	ชีววิทยา	มหาวิทยาลัยขอนแก่น
2543	ปริญญาโท	วท.ม.	พันธุศาสตร์	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
2539	ปริญญาตรี	วท.บ.	เทคโนโลยีชีวภาพ	สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล คณะเกษตรศาสตร์ บางพระ ชลบุรี

สถานที่ทำงาน

สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม

อำเภอเมือง จังหวัดมหาสารคาม 44000 โทรศัพท์: 043-742620 โทรสาร: 043-742620

e-mail: Siri.pi.yasing@hotmail.com โทรศัพท์มือถือ: 094-9351669

2. (ชื่อ - สกุล ไทย) นางสาวจิรกรานต์ ศรีหาบุตร

(ชื่อ – สกุล อังกฤษ) Miss Chirakan Sihabut

การศึกษา พ.ศ. 2559 สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม

3. (ชื่อ - สกุล ไทย) นางสาวชลธิชา อุ่นบุญ

(ชื่อ – สกุล อังกฤษ) Miss Chonthicha Auboon

การศึกษา พ.ศ. 2559 สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม

4. (ชื่อ - สกุล ไทย) นางสาวช่อเพชร ย่อมสวัสดิ์

(ชื่อ – สกุล อังกฤษ) Miss Chorpet Yomsawad

การศึกษา พ.ศ. 2559 สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก.

การเตรียมสารเคมี

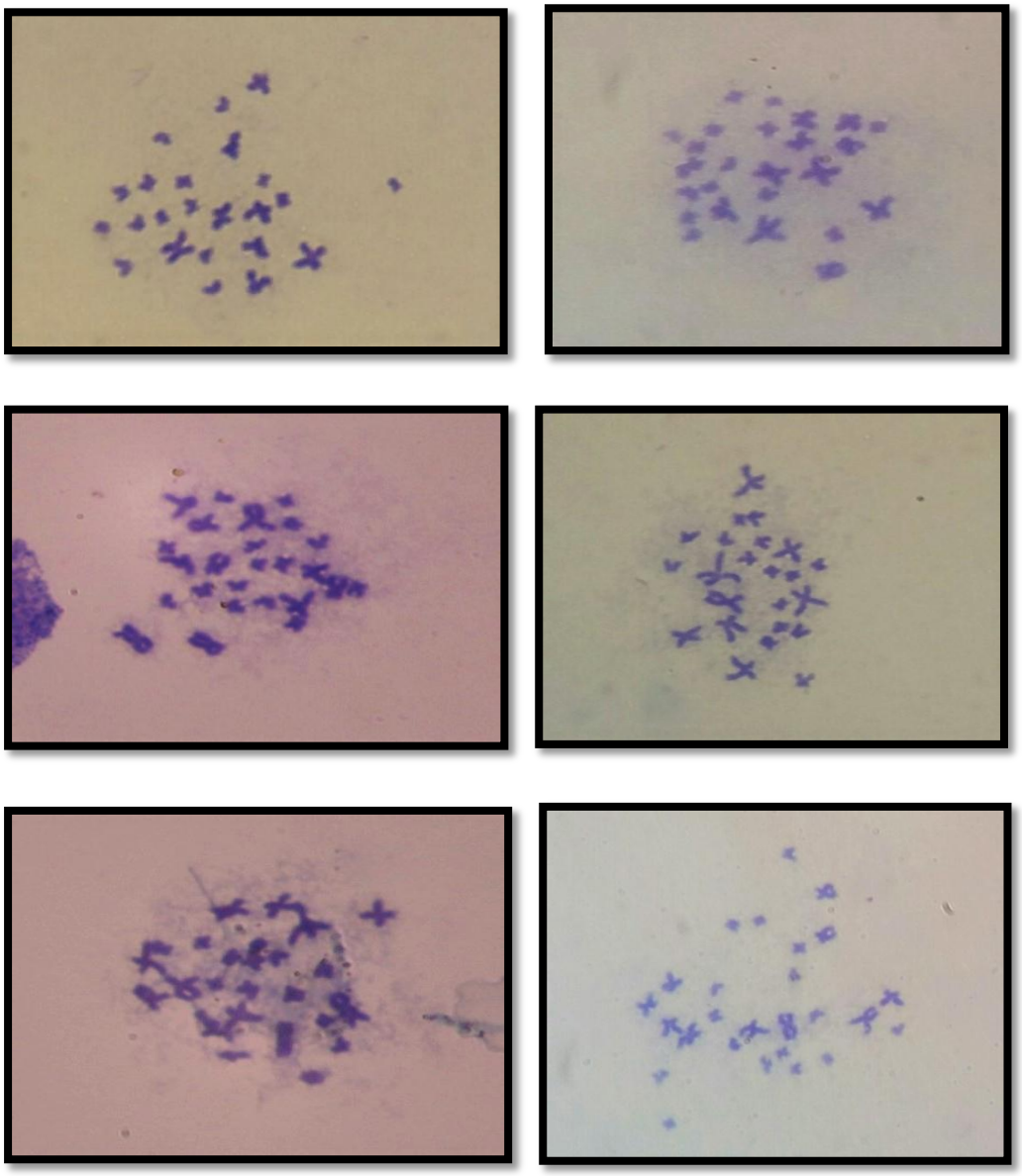
สารเคมีที่ใช้ในการศึกษา

1. เตรียมโครโมโซม 0.01% Colchicine เตรียมจากผง 0.001 g of colchicine powder ละลายในน้ำกลั่น 10 ml บรรจุในขวดสีชา หรือหุ้มด้วยกระดาษอะลูมิเนียม เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส ใช้ได้ไม่เกิน 1 เดือน
2. เตรียม 0.075 M KCl โดยชั่ง 0.5588 g KCl ละลายในน้ำกลั่น 100 ml เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง Hypotonic สามารถเก็บไว้ใช้งานได้ 1-2 สัปดาห์
3. น้ำยา Fixative ประกอบด้วย acetic acid เข้มข้น methanol= 1:3 ส่วน เก็บไว้ที่ 4องศาเซลเซียส และจะต้องเตรียมใหม่ก่อนใช้เสมอ และใช้ขณะแช่เย็นเท่านั้น
4. Phosphate buffer (pH 8.4)
   Stock A: KH_2HPO_4 9.1 กรัมละลายในน้ำกลั่น 1000 ml
   Stock B: KH_2HPO_4 9.5 กรัมละลายในน้ำกลั่น 1000 ml
   Working solution ผสม Stock A:Stock B= 50.8 : 49.2 ส่วน
5. สี Giemsa เตรียมจากผงสี Giemsa 0.75 กรัมละลายใน glycerol บริสุทธิ์ 25 ml จนเป็นเนื้อเดียวกัน เติม absolute methanol 50 ml ผสมให้เข้ากันเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง
   สีย้อม: สี Giemsa : working solution phosphate buffer= 1:4 ส่วนที่ใช้ย้อมโครโมโซม

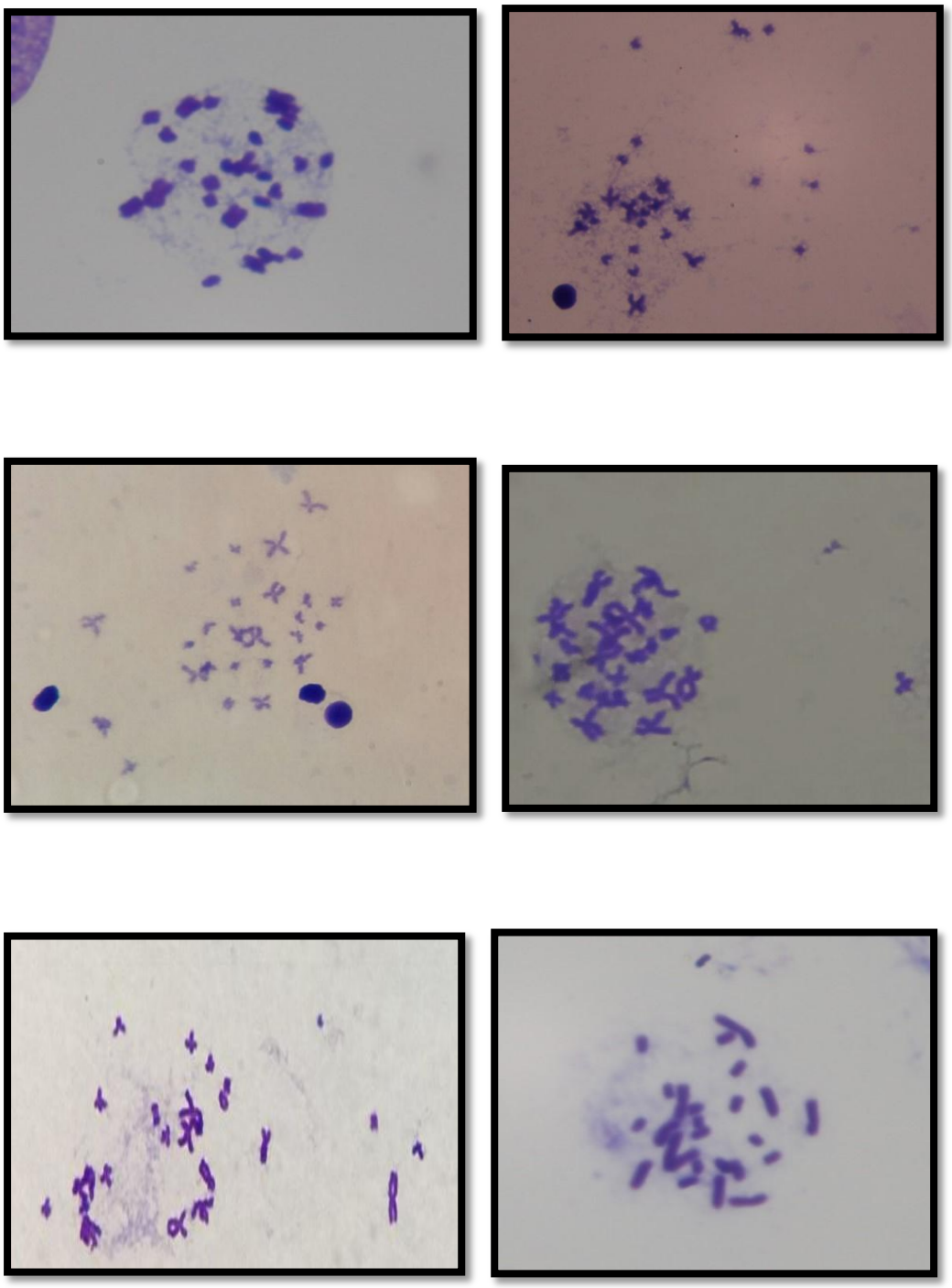
ภาคผนวก ข.

ภาพจากการทำวิจัย

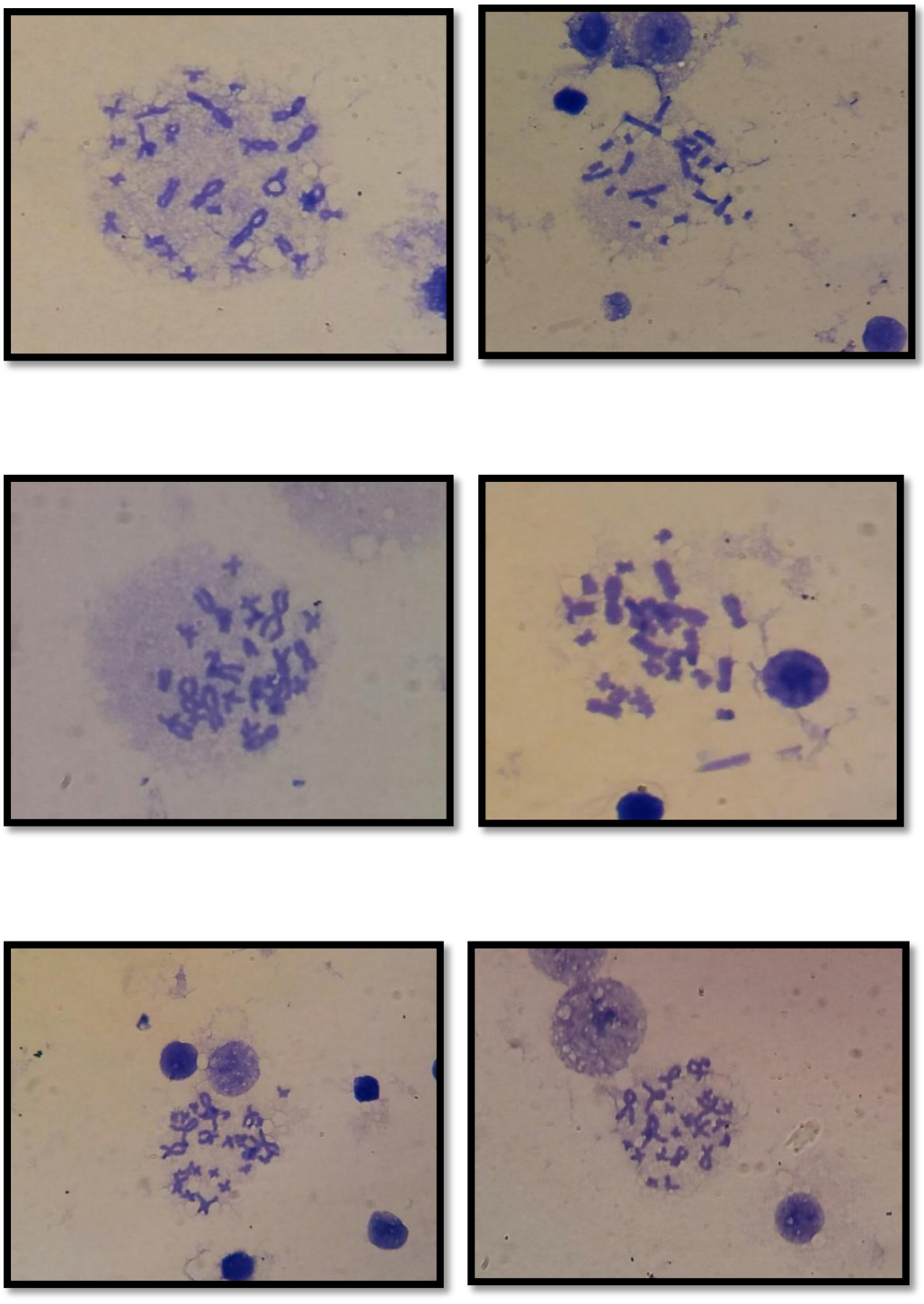
ภาพเซลล์ระยะเมทาเฟส



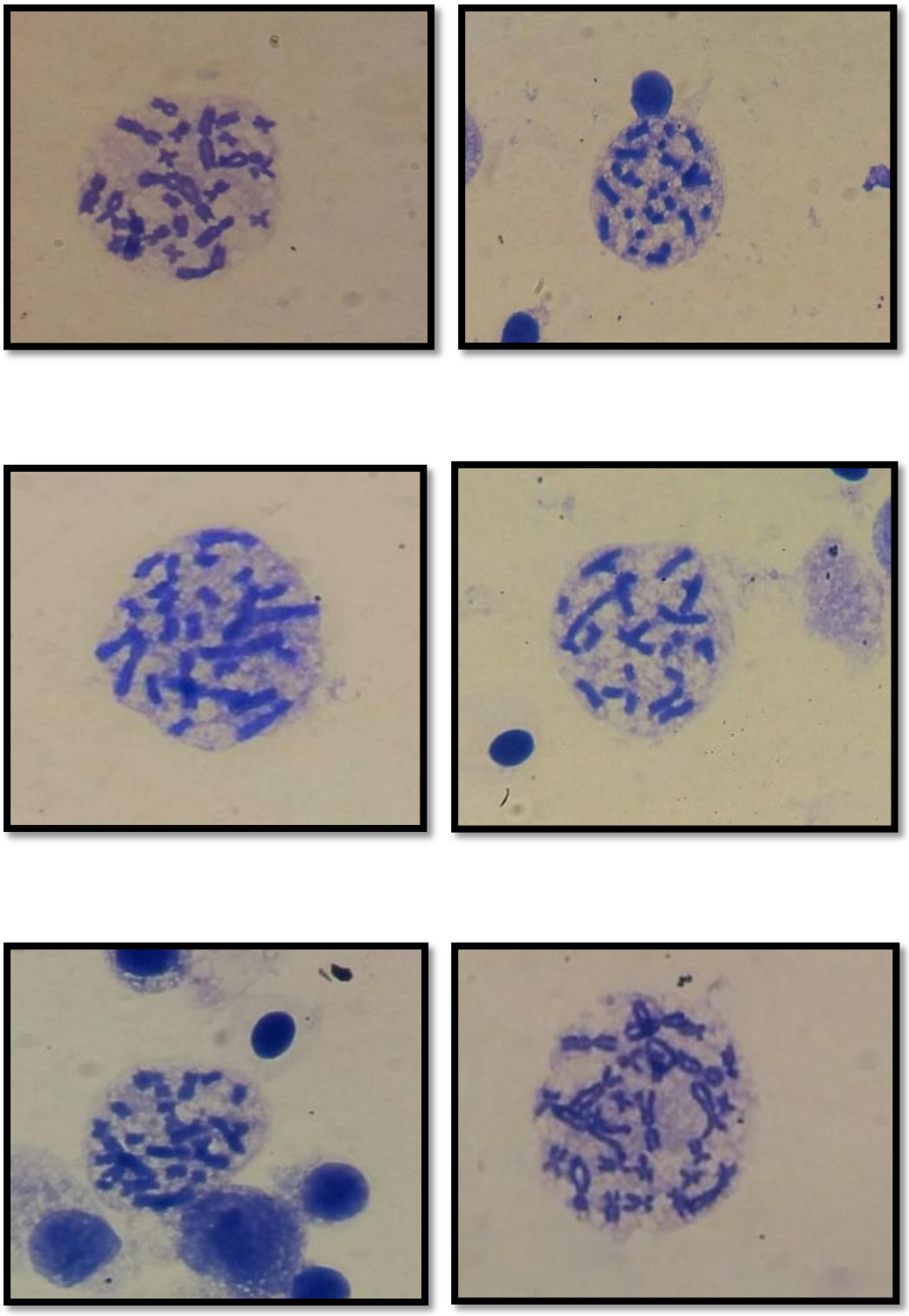
กบนาเพศผู้ (Male *H.rugulosus*)



กบนาเพศเมีย (Female *H.rugulosus*)

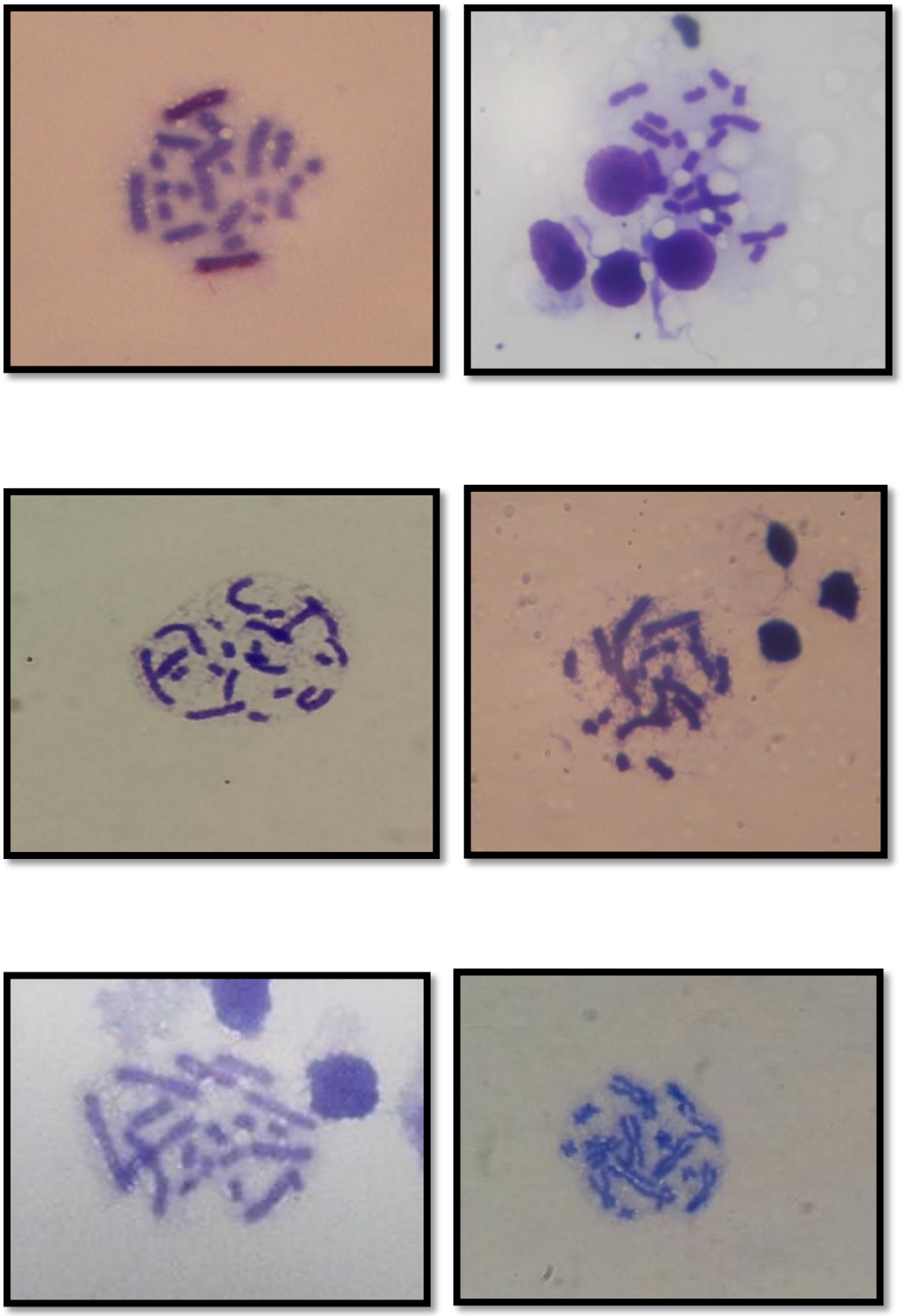


เขียดโม่เพศผู้ (Male *F. limnocharis*)



เขียดโม่เพศเมีย (Female *F. limnocharis)*

คางคกบ้านเพศผู้ (Male *D.melanostictus*)



คางคกบ้านเพศเมีย (Female *D.melanostictus*)

ภาพกบนา

ภาพเขียดโม่

ภาพคางคก

สารบัญ

เรื่อง	**หน้า**
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
สารบัญ	ฉ
สารบัญตาราง	ซ
สารบัญภาพ	ฌ
บทที่ 1 บทนำ	**1**
1.1.ที่มาและความสำคัญ	1
1.2.วัตถุประสงค์	3
1.3.สมมติฐาน	3
1.4.ขอบเขตของการวิจัย	4
1.5.สถานที่ทำการวิจัย	4
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	**5**
2.1.ลักษณะของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก	5
2.2.พันธุศาสตร์เซลล์	11
2.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	14
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	**18**
3.1.การเก็บตัวอย่าง	18
3.2.การเตรียมโครโมโซม	18
3.3.การวิเคราะห์ผล	19
บทที่ 4 ผลการวิจัย	**22**
4.1 ลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกของกบนา	22
4.2 ผลการศึกษาจำนวน ขนาด รูปร่างของโครโมโซมกบนาด้วยการย้อมสีแบบธรรมดา	23
4.3 คาริโอไทป์ อิดิโอแกรม และสูตรโครงสร้างมาตรฐานของกบนา โดยการย้อมสีแบบธรรมดา	24
4.4 ลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกของเขียดโม่	28
4.5 ผลการศึกษาจำนวน ขนาด รูปร่างของโครโมโซมเขียดโม่ด้วยการย้อมสีแบบธรรมดา	29
4.6 คาริโอไทป์ อิดิโอแกรม และสูตรโครงสร้างมาตรฐานของเขียดโม่ โดยการย้อมสีแบบธรรมดา	30
4.7 ลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกของคางคกบ้าน	34
4.8 ผลการศึกษาจำนวน ขนาด รูปร่างของโครโมโซมคางคกด้วยการย้อมสีแบบธรรมดา	35

สารบัญ (ต่อ)

เรื่อง	หน้า
4.9 คาริโอไทป์ อิดิโอแกรม และสูตรโครงสร้างมาตรฐานของคางคกบ้าน โดยการย้อมแบบสีธรรมดา	36
บทที่ 5 สรุปและอภิปรายผลวิจัย	**40**
5.1.สรุปผลการวิจัย	40
5.2.อภิปรายผลการวิจัย	41
5.3.ข้อเสนอแนะ	42
บรรณาณุกรม	43
ภาคผนวก	48
ภาคผนวก ก. การเตรียมสารเคมี	49
ภาคผนวก ข. ภาพจากการทำวิจัย	50
ประวัติผู้วิจัย	57

สารบัญตาราง

เรื่อง **หน้า**

ตารางที่ 4.1 ค่าเฉลี่ยความยาวของแขนโครโมโซมข้างสั้น (Short arm; Ls) ความยาวของโครโมโซมข้างยาว (Long arm; Ll) ความยาวทั้งหมดของโครโมโซมแต่ละคู่ (Total length; LT)ค่า Relative length (RL) ค่า Centromeric index (CI) ขนาดและชนิดของโครโมโซมของกบนาเพศผู้แต่ละแท่ง จากเซลล์ระยะเมทาเฟสจำนวน 10 เซลล์ (2n=26)..... 26

ตารางที่ 4.2 ค่าเฉลี่ยความยาวของแขนโครโมโซมข้างสั้น (Short arm; Ls) ความของโครโมโซมข้างยาว (Long arm; Ll) ความยาวทั้งหมดของโครโมโซมแต่ละคู่ (Total length; LT)ค่า Relative length (RL) ค่า Centromeric index (CI) ขนาดและชนิดของโครโมโซมของกบนาเพศเมียแต่ละแท่ง จากเซลล์ระยะเมทาเฟสจำนวน 10 เซลล์ (2n=26)..... 27

ตารางที่ 4.3 ค่าเฉลี่ยความยาวของแขนโครโมโซมข้างสั้น (Short arm; Ls) ความยาวของ โครโมโซมข้างยาว (Long arm; Ll) ความยาวทั้งหมดของโครโมโซมแต่ละคู่ (Total length; LT)ค่า Relative length (RL) ค่า Centromeric index (CI) ขนาดและชนิดของโครโมโซมของเขียดโม่เพศผู้แต่ละแท่ง จากเซลล์ระยะเมทาเฟสจำนวน 10 เซลล์ (2n=26)..... 32

ตารางที่ 4.4 ค่าเฉลี่ยความยาวของแขนโครโมโซมข้างสั้น (Short arm; Ls) ความยาวของโครโมโซมข้างยาว (Long arm; Ll) ความยาวทั้งหมดของโครโมโซมแต่ละคู่ (Total length; LT)ค่า Relative length (RL) ค่า Centromeric index (CI) ขนาดและชนิดของโครโมโซมของเขียดโม่เพศเมียแต่ละแท่ง จากเซลล์ระยะเมทาเฟสจำนวน 10 เซลล์ (2n=26)..... 33

ตารางที่ 4.5 ค่าเฉลี่ยความยาวของแขนโครโมโซมข้างสั้น (Short arm; Ls) ความยาวของโครโมโซมข้างยาว (Long arm; Ll) ความยาวทั้งหมดของโครโมโซมแต่ละคู่ (Total length; LT)ค่า Relative length (RL) ค่า Centromeric index (CI) ขนาดและชนิดของโครโมโซมของคางคกบ้านเพศผู้แต่ละแท่ง จากเซลล์ระยะเมทาเฟสจำนวน 10 เซลล์ (2n=22)..... 38

ตารางที่ 4.6 ค่าเฉลี่ยความยาวของแขนโครโมโซมข้างสั้น (Short arm; Ls) ความยาวของโครโมโซมข้างยาว (Long arm; Ll) ความยาวทั้งหมดของโครโมโซมแต่ละคู่ (Total length; LT)ค่า Relative length (RL) ค่า Centromeric index (CI) ขนาดและชนิดของโครโมโซมของคางคกบ้านเพศเมียแต่ละแท่ง จากเซลล์ระยะเมทาเฟสจำนวน 10 เซลล์ (2n=22)..... 39

สารบัญภาพ

เรื่อง **หน้า**

ภาพที่ 2.1 อึ่งผี หรืองกรายหมอสมิธ (*Leptobrachium smithi*) 6

ภาพที่ 2.2 ปาดบ้าน (*Polypedates leucomystax*)..... 7

ภาพที่ 2.3 ปาดเมืองจีน (*Hyla annectans*)..... 8

ภาพที่ 2.4 กบภูเขา หรือเขียดแลว (*Limnonectes blythii*)..... 9

ภาพที่ 2.5 อึ่งน้ำเต้า (*Microhyla ornate*)..... 10

ภาพที่ 2.6 จงโคร่ง (*Phrynoidis aspera*)..... 11

ภาพที่ 4.1 ลักษณะภายนอกของกบนา *(Hoplobatrachus rugulosus*)..... 22

ภาพที่ 4.2 แสดงเมทาเฟสโครโมโซมของกบนา (*Hoplobatrachus rugulosus*)
ก.เพศผู้ ข.เพศเมีย 2n=26 ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา..... 23

ภาพที่ 4.3 แสดงคาริโอไทป์ของกบนา (*Hoplobatrachus rugulosus*)
ก.เพศผู้ ข.เพศเมีย 2n=26 ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา..... 24

ภาพที่ 4.4 แสดงอิดิโอแกรมของกบนา (*Hoplobatrachus rugulosus*)
ก.เพศผู้ ข. เพศเมีย 2n=26 ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา..... 25

ภาพที่ 4.5 ลักษณะภายนอกเขียดโม่ *(Ferjervaya limnocharis)*..... 28

ภาพที่ 4.6 แสดงเมทาเฟสโครโมโซมของเขียดโม่ *(Ferjervaya limnocharis)* 29
ก.เพศผู้ ข.เพศเมีย 2n=26 ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา.....

ภาพที่ 4.7 แสดงคาริโอไทป์ของเขียดโม่ *(Ferjervaya limnocharis)* 30
ก.เพศผู้ ข.เพศเมีย 2n=26 ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา.....

ภาพที่ 4.8 แสดงอิดิโอแกรมของเขียดโม่ *(Ferjervaya limnocharis)*
ก.เพศผู้ ข. เพศเมีย 2n=26 ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา..... 31

ภาพที่ 4.9 ลักษณะภายนอกของคางคกบ้าน ***(****Duttaphrynus melanostictus****)***..... 34

ภาพที่ 4.10 แสดงเมทาเฟสโครโมโซมของคางคกบ้าน *(Duttaphrynus melanostictus)*
ก.เพศผู้ ข.เพศเมีย 2n=22 ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา..... 35

ภาพที่ 4.11 แสดงคาริโอไทป์ของคางคกบ้าน (Duttaphrynus melanostictus)
ก.เพศผู้ ข.เพศเมีย 2n=22 ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา..... 36

ภาพที่ 4.12 แสดงคาริโอไทป์ของคางคกบ้าน *(Duttaphrynus melanostictus)*
ก.เพศผู้ ข.เพศเมีย 2n=22 ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา..... 37