บริจาค

597.8
ธ391ค

รายงานการวิจัย

คาริโอไทป์ของเซลล์ตับในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก 7 ชนิด ที่พบในประเทศไทย

LIVER KARYOTYPES OF SEVEN AMPHIBIANS (AMPHIBIA , ANURA) FROM THAILAND

รองศาสตราจารย์ธวัช ดอนสกุล

ตุลาคม 2550

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจาก

งบประมาณเงินรายได้คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ปี 2549

30 ก.ค. 2552

S 350783

บทคัดย่อ

การวิจัยครั้งนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อศึกษาคาริโอไทป์ของกบนา กบหลังไพล กบหนอง เขียดทราย อึ่งลาย จงโคร่ง และปาดบ้านที่พบในประเทศไทย ผลจากการเตรียมโครโมโซมด้วยเซลล์ตับพบว่ากบนา กบหลังไพล กบหนอง เขียดทราย อึ่งลาย และปาดบ้าน มีโครโมโซม 2n = 26 ในขณะที่จงโคร่งมีโครโมโซม 2n = 22 ผลการวิเคราะห์คาริโอไทป์พบว่า กบนาประกอบด้วย 10m + 3sm คู่มีแซทเทลไลท์ 1 คู่ ตั้งอยู่ที่ปลายสุดของแขนข้างสั้นของโครโมโซมแบบเมทาเซนทริกคู่ที่ 10 จำนวนแขนโครโมโซม (NF) เท่ากับ 52 กบหลังไพลประกอบด้วย 8m + 5sm คู่ NF = 52 กบหนองประกอบด้วย 9m + 3sm + 1st คู่ NF = 52 เขียดทรายประกอบด้วย 9m + 4sm คู่ NF = 52 อึ่งลายประกอบด้วย 10m + 3sm คู่ NF = 52 ปาดบ้านประกอบด้วย 11m + 2sm คู่ NF = 52 และจงโคร่งประกอบด้วย 8m + 3sm คู่ NF = 44

Abstract

The purpose of this research was to examine karyotypes of seven amphibians, namely *Hoplobatrachus rugulosus* , *Rana lateralis* , *Fejervarya limnocharis* , *Occidozyga lima* , *Calluella guttulata* , *Bufo asper* and *Polypedates leucomystax* from Thailand. Chromosome preparations for karyotype analyses were obtained from liver cells and following chromosome number were obtained. *Hoplobatrachus rugulosus* , *Rana lateralis* , *Fejervarya limnocharis* , *Occidozyga lima* , *Calluella guttulata* and *Polypedates leucomystax* had 2n = 26 while *Bufo asper* had 2n = 22. Their karyotypes were as follows : *Hoplobatrachus rugulosus* comprised 10m + 3sm pairs and 1 pair of satellites located on the terminal end of short arm of the 10^{th} pair of metacentric chromosome with the arm number (NF) of 52 . *Rana lateralis* comprised 8m + 5sm pairs and NF = 52 . *Fejervarya limnocharis* consisted of 9m + 3sm + 1st pairs and NF = 52 . *Occidozyga lima* consisted of 9m + 4sm pairs and NF = 52 . *Calluella guttulata* comprised 10m + 3sm pairs and NF = 52 . *Polypedates leucomystax* comprised 11m + 2sm pairs and NF = 52 . *Bufo asper* consisted of 8m + 3sm pairs and NF = 44.

ประกาศคุณูปการ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินรายได้ของคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประจำปี 2549 โดยเฉพาะอย่างยิ่ง รศ.ดร. วิเชียร มากตุ่น คณบดีคณะวิทยาศาสตร์ ผศ.ดร. อัจฉริยา รังษิรุจิ รองคณบดีฝ่ายวิจัยและวิเทศสัมพันธ์ ที่เห็นความสำคัญของการวิจัยและให้การสนับสนุนส่งเสริมการวิจัยของบุคลากรของคณะมาด้วยดีโดยตลอด ผู้วิจัยขอขอบพระคุณอย่างสูงมา ณ ที่นี้ด้วย

ธวัช ดอนสกุล

สารบัญ

หน้า

บทที่ 1

1. บทนำ 1

ภูมิหลัง 1

ความมุ่งหมายของการวิจัย 3

ความสำคัญของการวิจัย 3

ขอบเขตของการวิจัย 3

ประชากรตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัย 3

นิยามคำศัพท์เฉพาะ 4

สมมติฐานในการวิจัย 4

2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 5

ชีววิทยาของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก 5

ลักษณะสำคัญของวงศ์กบเขียด (Family Ranidae) 6

กบนา *Hoplobatrachus rugulosus* 6

กบหลังไพล *Rana lateralis* 6

กบหนอง *Fejervarya limnocharis* 7

เขียดทราย *Occidozyga lima* 7

ลักษณะสำคัญของวงศ์อึ่งอ่าง (Family Microhylidae) 7

อึ่งลาย *Calluella guttulata* 7

ลักษณะสำคัญของวงศ์คางคก (Family Bufonidae) 7

จงโคร่ง *Bufo asper* 8

ลักษณะสำคัญของวงศ์ของปาด (Family Rachophoridae) 8

ปาดบ้าน *Polypedates leucomystax* 8

การศึกษาเกี่ยวกับโครโมโซมและคาริโอไทป์ 8

3. วิธีดำเนินการวิจัย 18

อุปกรณ์และสารเคมี 18

วิธีดำเนินการ 19

การวินิจฉัยและการตรวจสอบชื่อวิทยาศาสตร์ของกบนา กบหลังไพล
กบหนอง เขียดทราย อึ่งลาย จงโคร่ง และปาดบ้าน 20

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาบางประการของกบนา กบหลังไพล
กบหนอง เขียดทราย อึ่งลาย จงโคร่ง และปาดบ้าน 21

หน้า

การศึกษาคาริโอไทป์..... 21
การเตรียมโครโมโซมจากเนื้อเยื่อตับ..... 21
การถ่ายรูปโครโมโซม..... 22
การวิเคราะห์โครโมโซม..... 23
การหาจำนวนโครโมโซม..... 23
การวัดโครโมโซมและการจัดคาริโอไทป์..... 23
การหาจำนวนแขนโครโมโซม..... 24
การหาขนาดโครโมโซม..... 24
การสร้างอิดิโอแกรม..... 24
การหาความยาวสัมพัทธ์ (relative length หรือ RL)..... 25
4. ผลการวิเคราะห์ข้อมูล..... 26
5. สรุปผล อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ..... 59
สรุปผล..... 59
อภิปรายผล..... 60
ข้อเสนอแนะ..... 63
บรรณานุกรม..... 64
ประวัติผู้วิจัย..... 68

บัญชีตาราง

ตาราง หน้า

1. จำนวน แหล่งที่เก็บรวบรวมตัวอย่าง กบนา กบหลังไพล กบหนอง เขียดทราย อึ่งลาย จงโคร่ง และปาดบ้าน ที่นำมาใช้ในการศึกษาคาริโอไทป์..... 20
2. ชนิดของโครโมโซม ตามอัตราส่วนระหว่างแขนยาวต่อแขนสั้น ตามวิธีของลีแวนและคณะ.....23
3. ลักษณะทางสัณฐานวิทยาบางประการของกบนา กบหลังไพล กบหนอง เขียดทราย อึ่งลาย จงโคร่ง และปาดบ้าน..... 28
4. ความถี่ในการกระจายของจำนวนโครโมโซมแบบดิพลอยด์ (2n) ที่นับได้จาก กบนา *Hoplobatrachus rugulosus* กบหลังไพล *Rana lateralis* กบหนอง *Fejervarya limnocharis* เขียดทราย *Occidozyga lima* อึ่งลาย *Calluella guttulata* จงโคร่ง *Bufo asper* และปาดบ้าน *Polypedates leucomystax*..... 29
5. จำนวนโครโมโซมแบบดิพลอยด์ (2n) ชนิดของโครโมโซมและจำนวนโครโมโซม ของ กบนา กบหลังไพล กบหนอง เขียดทราย อึ่งลาย จงโคร่ง และปาดบ้าน..... 29
6. ค่าเฉลี่ยความยาวแขนสั้น (SL) ความยาวแขนยาว (LL) ความยาวแขนทั้งแขนหรือ ความยาวสัมบูรณ์ (total length หรือ absolute length หรือ TL) ความยาวสัมพัทธ์ (relative length หรือ RL) อัตราส่วนระหว่างแขนยาวต่อแขนสั้น (LL/SL) และชนิดของโครโมโซมคู่เหมือน (CT)ใน กบนา *Hoplobatrachus rugulosus* จากเซลล์ตับจำนวน 5 เซลล์.....30
7. ค่าเฉลี่ยความยาวแขนสั้น (SL) ความยาวแขนยาว (LL) ความยาวแขนทั้งแขนหรือ ความยาวสัมบูรณ์ (total length หรือ absolute length หรือ TL) ความยาวสัมพัทธ์ (relative length หรือ RL) อัตราส่วนระหว่างแขนยาวต่อแขนสั้น (LL/SL) และชนิดของโครโมโซมคู่เหมือน (CT) ในกบหลังไพล *Rana lateralis* จากเซลล์ตับจำนวน 5 เซลล์.....34
8. ค่าเฉลี่ยความยาวแขนสั้น (SL) ความยาวแขนยาว (LL) ความยาวแขนทั้งแขนหรือ ความยาวสัมบูรณ์ (total length หรือ absolute length หรือ TL) ความยาวสัมพัทธ์ (relative length หรือ RL) อัตราส่วนระหว่างแขนยาวต่อแขนสั้น (LL/SL) และชนิดของโครโมโซมคู่เหมือน (CT) ใน กบหนอง *Fejervarya limnocharis* จากเซลล์ตับจำนวน 5 เซลล์.....38

ภาพประกอบ (ต่อ) หน้า

9. ค่าเฉลี่ยความยาวแขนสั้น (SL) ความยาวแขนยาว (LL) ความยาวแขนทั้งแขนหรือความยาวสัมบูรณ์ (total length หรือ absolute length หรือ TL) ความยาวสัมพัทธ์ (relative length หรือ RL) อัตราส่วนระหว่างแขนยาวต่อแขนสั้น (LL/SL) และชนิดของโครโมโซมคู่เหมือน (CT) ในเขียดทราย *Occidozyga lima* จากเซลล์ตับจำนวน 5 เซลล์.....42
10. ค่าเฉลี่ยความยาวแขนสั้น (SL) ความยาวแขนยาว (LL) ความยาวแขนทั้งแขนหรือความยาวสัมบูรณ์ (total length หรือ absolute length หรือ TL) ความยาวสัมพัทธ์ (relative length หรือ RL) อัตราส่วนระหว่างแขนยาวต่อแขนสั้น (LL/SL) และชนิดของโครโมโซมคู่เหมือน (CT) ในอึ่งลาย *Calluella guttulata* จากเซลล์ตับจำนวน 5 เซลล์.....46
11. ค่าเฉลี่ยความยาวแขนสั้น (SL) ความยาวแขนยาว (LL) ความยาวแขนทั้งแขนหรือความยาวสัมบูรณ์ (total length หรือ absolute length หรือ TL) ความยาวสัมพัทธ์ (relative length หรือ RL) อัตราส่วนระหว่างแขนยาวต่อแขนสั้น (LL/SL) และชนิดของโครโมโซมคู่เหมือน (CT) ในจงโคร่ง *Bufo asper* จากเซลล์ตับจำนวน 5 เซลล์.....50
12. ค่าเฉลี่ยความยาวแขนสั้น (SL) ความยาวแขนยาว (LL) ความยาวแขนทั้งแขนหรือความยาวสัมบูรณ์ (total length หรือ absolute length หรือ TL) ความยาวสัมพัทธ์ (relative length หรือ RL) อัตราส่วนระหว่างแขนยาวต่อแขนสั้น (LL/SL) และชนิดของโครโมโซมคู่เหมือน (CT) ในปาดบ้าน *Polypedates leucomystax* จากเซลล์ตับจำนวน 5 เซลล์.....54
13. ค่าความยาวทั้งแขนหรือความยาวสัมบูรณ์ (TL) ความยาวสัมพัทธ์ (RL) และขนาดโครโมโซมของกบนา กบหลังไพล กบหนอง เขียดทราย อึ่งลาย จงโคร่ง และปาดบ้าน..... 58

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ **หน้า**

1. ภาพถ่ายกบนา *Hoplobatrachus rugulosus* (A) กบหลังไพล *Rana lateralis* (B) กบหนอง*Fejervarya limnocharis* (C) เขียดทราย *Occidozyga lima* (D) 10
2. ภาพถ่ายอึ่งลาย *Calluella guttulata* (A) จงโคร่ง *Bufo asper* (B) และปาดบ้าน *Polypedates leucomystax* 11
3. โครงสร้างทางเคมีของโคลชิซิน..... 12
4. ภาพถ่ายการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสในระยะเมทาเฟสของกบนา *Hoplobatrachus rugulosus* เพศผู้ (A) และคาริโอไทป์ (B) ลูกศรชี้คือแซทเทลไลท์ scale bar = 10 µm... 31
5. ภาพถ่ายการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสในระยะเมทาเฟสของกบนา *Hoplobatrachus rugulosus* เพศเมีย (A) และคาริโอไทป์ (B) scale bar = 10 µm.....32
6. อิดิโอแกรมของกบน้ำ *Hoplobatrachus rugulosus* เรียงลำดับตามค่าเฉลี่ยความยาวแขนแบบสัมบูรณ์ อัตราส่วนระหว่างแขนยาวต่อแขนสั้นของคู่โครโมโซมหรือโครโมโซมคู่เหมือนจำนวน 5 เซลล์ จุดสีดำกลมของโครโมโซมคือแซทเทลไลท์.....33
7. ภาพถ่ายการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสในระยะเมทาเฟสของกบหลังไพล *Rana lateralis* เพศผู้ (A) และคาริโอไทป์ (B) scale bar = 10 µm..... 35
8. ภาพถ่ายการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสในระยะเมทาเฟสของกบหลังไพล *Rana lateralis* เพศเมีย (A) และคาริโอไทป์ (B) scale bar = 10 µm..... 36
9. อิดิโอแกรมของกบหลังไพล *Rana lateralis* เรียงลำดับตามค่าเฉลี่ยความยาวแขนแบบสัมบูรณ์ อัตราส่วนระหว่างแขนยาวต่อแขนสั้นของคู่โครโมโซมหรือโครโมโซมคู่เหมือนจำนวน 5 เซลล์.....37
10. ภาพถ่ายการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสในระยะเมทาเฟสของกบหนอง *Fejervarya limnocharis* เพศผู้ (A) และคาริโอไทป์ (B) scale bar = 10 µm.....39
11. ภาพถ่ายการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสในระยะเมทาเฟสของกบหนอง *Fejervarya limnocharis* เพศเมีย (A) และคาริโอไทป์ (B) scale bar = 10 µm.....40
12. อิดิโอแกรมของกบหนอง *Fejervarya limnocharis* เรียงลำดับตามค่าเฉลี่ยความยาวแขนแบบสัมบูรณ์ อัตราส่วนระหว่างแขนยาวต่อแขนสั้นของคู่โครโมโซมหรือโครโมโซมคู่เหมือนจำนวน 5 เซลล์..... 41
13. ภาพถ่ายการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสในระยะเมทาเฟสของเขียดทราย *Occidozyga lima* เพศผู้ (A) และคาริโอไทป์ (B) scale bar = 10 µm.....43

14. ภาพถ่ายการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสในระยะเมทาเฟสของเขียดทราย *Occidozyga lima* เพศเมีย (A) และคาริโอไทป์ (B) scale bar = 10 µm..... 44
15. อิดิโอแกรมของเขียดทราย *Occidozyga lima* เรียงลำดับตามค่าเฉลี่ยความยาวแขนแบบสัมบูรณ์ อัตราส่วนระหว่างแขนยาวต่อแขนสั้นของคู่โครโมโซมหรือโครโมโซมคู่เหมือนจำนวน 5 เซลล์..... 45
16. ภาพถ่ายการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสในระยะเมทาเฟสของอึ่งลาย *Calluella guttulata* เพศผู้ (A) และคาริโอไทป์ (B) scale bar = 10 µm..... 47
17. ภาพถ่ายการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสในระยะเมทาเฟสของอึ่งลาย *Calluella guttulata* เพศเมีย (A) และคาริโอไทป์ (B) scale bar = 10 µm..... 48
18. อิดิโอแกรมของอึ่งลาย *Calluella guttulata* เรียงลำดับตามค่าเฉลี่ยความยาวแขนแบบสัมบูรณ์ อัตราส่วนระหว่างแขนยาวต่อแขนสั้นของคู่โครโมโซม หรือโครโมโซมคู่เหมือนจำนวน 5 เซลล์..... 49
19. ภาพถ่ายการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสในระยะเมทาเฟสของจงโคร่ง *Bufo asper* เพศผู้ (A) และคาริโอไทป์ (B) scale bar = 10 µm.....51
20. ภาพถ่ายการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสในระยะเมทาเฟสของจงโคร่ง *Bufo asper* เพศเมีย (A) และคาริโอไทป์ (B) scale bar = 10 µm..... 52
21. อิดิโอแกรมของจงโคร่ง *Bufo asper* เรียงลำดับตามค่าเฉลี่ยความยาวแขนแบบสัมบูรณ์ อัตราส่วนระหว่างแขนยาวต่อแขนสั้นของคู่โครโมโซมหรือโครโมโซมคู่เหมือนจำนวน 5 เซลล์..... 53
22. ภาพถ่ายการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสในระยะเมทาเฟสของปาดบ้าน *Polypedates leucomystax* เพศผู้ (A) และคาริโอไทป์ (B) scale bar = 10 µm..... 55
23. ภาพถ่ายการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสในระยะเมทาเฟสของปาดบ้าน *Polypedates leucomystax* เพศเมีย (A) และคาริโอไทป์ (B) scale bar = 10 µm.....56
24. อิดิโอแกรมของปาดบ้าน *Polypedates leucomystax* เรียงลำดับตามค่าเฉลี่ยความยาวแขนแบบสัมบูรณ์ อัตราส่วนระหว่างแขนยาวต่อแขนสั้นของคู่โครโมโซม หรือโครโมโซมคู่เหมือนจำนวน 5 เซลล์..... 57

บทที่ 1
บทนำ

ภูมิหลัง

ประเทศไทยมีความหลากหลายทางชีวภาพสูง การศึกษาสิ่งมีชีวิตด้านเซลล์พันธุศาสตร์มีค่อนข้างน้อยถึงแม้ว่าข้อมูลพื้นฐานที่ได้จากการศึกษาจะมีความสำคัญในการนำไปประยุกต์ใช้ด้านต่าง ๆ เช่นด้านการจัดจำแนก การศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ การปรับปรุงพันธุ์ นอกจากนี้ยังใช้ประโยชน์ด้านการศึกษาโรคทางพันธุกรรมที่เกิดจากความผิดปกติของโครโมโซม

การใช้ทรัพยากรธรรมชาติอย่างไม่มีขอบเขตจำกัด ขาดการอนุรักษ์ การควบคุม และการรักษา ทำให้ทรัพยากรธรรมชาติและสัตว์มีจำนวนลดลงอย่างรวดเร็วประกอบกับประเทศไทยมีจำนวนประชากรเพิ่มขึ้นมากจำเป็นต้องอาศัยพื้นดินและแหล่งน้ำในการทำมาหากิน พื้นที่ป่าถูกบุกรุกมากขึ้นและมีการปล่อยของเสียลงในแหล่งน้ำทำให้เกิดมลพิษขึ้นในสิ่งแวดล้อมส่งผลกระทบต่อประชากรพืชและสัตว์รวมทั้งกลุ่มสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในกลุ่ม กบ เขียด อึ่งอ่าง คางคก และปาด ซึ่งต้องอาศัยแหล่งน้ำเป็นที่อยู่อาศัยในวัยอ่อน ซึ่งมีประโยชน์ต่อมนุษย์ทั้งทางตรงและทางอ้อม กบ เขียด อึ่งอ่าง เป็นแหล่งอาหารโปรตีน โดยเฉพาะกับประชากรที่อาศัยอยู่ในชนบท คางคก ปาด ถึงจะใช้เป็นอาหารไม่ได้แต่ก็มีส่วนช่วยในการกำจัดแมลงศัตรูพืชไม่ให้แพร่ระบาดมากจนเกินไป ตัวอ่อนหรือลูกอ๊อดที่อาศัยอยู่ในน้ำก็เป็นตัวช่วยควบคุมปริมาณของสัตว์น้ำขนาดเล็กให้อยู่ในสภาวะสมดุล ตัวมันเองก็เป็นอาหารของสัตว์น้ำชนิดอื่น ๆ นอกจากนี้สภาพความสมบูรณ์ของตัวเต็มวัยยังเป็นดัชนีบ่งบอกถึงสภาพมลภาวะในอากาศและสิ่งแวดล้อมได้เป็นอย่างดี

สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกมีประโยชน์ต่อการเกษตรกรรมแผนใหม่ที่ลดการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืช โดยปล่อยให้สัตว์ในธรรมชาติควบคุมแทน คางคกบ้านหนึ่งตัวสามารถกำจัดปลวกได้นับพันตัวในช่วงเวลาคืนเดียวกบอื่น ๆ ก็สามารถกำจัดแมลงทั้งที่อยู่ในน้ำและบนบกได้มากมาย (ธัญญา, 2546)

สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกกลุ่มอึ่งอ่าง คางคกมีโอกาสเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ เนื่องจากการทำลายป่าต้นน้ำลำธาร ซึ่งเป็นแหล่งที่อยู่อาศัยตามธรรมชาติ ที่สำคัญอย่างยิ่งคือขาดความรู้พื้นฐานที่จะนำไปใช้ในการจัดการอย่างเหมาะสมเพื่อประโยชน์ในแนวทางการอนุรักษ์ (จารุจินต์, 2531) ปัจจุบันกรมป่าไม้ออกพระราชบัญญัติให้คางคก 3 ชนิดคือ จงโคร่ง คางคกหัวราบ คางคกแคระ เป็นสัตว์ป่าคุ้มครองประเภทที่ 1 คือเป็นสัตว์ป่าซึ่งตามปกติไม่นิยมใช้บริโภคเป็นอาหารหรือไม่ล่าเป็นเกมกีฬา แต่เป็นสัตว์ป่าที่ช่วยทำลายศัตรูพืชหรือขจัดสิ่งปฏิกูล หรือเป็นสัตว์ป่าที่ควรสงวนไว้เพื่อมิให้จำนวนลดลง (สมชาย, 2540) ดังนั้นเพื่อเป็นการจัดการทรัพยากรธรรมชาติอย่างเหมาะสมและแนวทางในการอนุรักษ์สัตว์กลุ่มนี้จึงควรมีการศึกษารวบรวมข้อมูลพื้นฐานสำหรับการศึกษาในระดับลึกต่อไป

กบนา *Hoplobratachus rugulosus* (Wiegmann, 1835) กบหลังไพล *Rana lateralis* Boulenger, 1887 กบหนอง *Fejervarya limnocharis* Gravenhorst, 1939 เขียดทราย *Occidozyga lima* Kuhland van Hasselt, 1822 อึ่งลาย *Calluella guttulata* (Blyth, 1855) จงโคร่ง *Bufo asper* Gavanhorst, 1829 และปาดบ้าน *Polypedates leucomystax* (Kuhl in Gravenhorst, 1829) เป็นสัตว์มีกระดูกสันหลังที่จัดอยู่ในชั้นแอมฟิเบีย (Class Amphibia) มีอยู่ด้วยกัน 3 อันดับ (Order) คืออันดับกะท่างหรือซาลามานเดอร์ (Order Caudata) มี 1 ชนิด อันดับเขียดงู (Order Gymnophiona) มี 6 ชนิด และอันดับกบเขียด (Order Anura) ในประเทศไทยมีอยู่ด้วยกัน 6 วงศ์ จำนวน 134 ชนิด สำหรับพวกกะท่างและเขียดงูพบได้ยากไม่ค่อยคุ้นเคยกัน ที่คนไทยคุ้นเคยกันได้แก่อันดับกบ เขียด ซึ่งประกอบด้วย กบ เขียด อึ่งอ่าง คางคก และปาด จากการศึกษาสำรวจสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในประเทศไทยมาตั้งแต่ต้นจนถึงปัจจุบันพบ 141 ชนิด (ธัญญา, 2546)

การศึกษาด้านเซลล์พันธุศาสตร์ (cytogenetics) เป็นการศึกษาเกี่ยวกับส่วนประกอบของเซลล์ที่อยู่ภายในนิวเคลียสทำหน้าที่ถ่ายทอดลักษณะจากพ่อแม่ไปสู่ลูกหลาน นั่นคือการศึกษาเกี่ยวกับรูปร่าง ลักษณะ ขนาด จำนวนของโครโมโซมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ด้วยการย้อมสีแบบต่าง ๆ เพื่อให้เห็นรูปร่างลักษณะของโครโมโซมชัดเจน การศึกษาเกี่ยวกับโครโมโซมของกบ เขียด อึ่งอ่าง คางคก และปาดในประเทศไทยมีผู้ศึกษากันไว้บ้างแต่ไม่มาก เช่น นงลักษณ์ (2518) ศึกษาโครโมโซมของอึ่งน้ำเต้า *Microhyla aurata* เขียดอีโม่ *Rana limnocharis* คางคกบ้าน *Bufo melanostictus* พบว่ามีโครโมโซม 2n = 24,26 และ 22 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังมีผู้ศึกษากันในอึ่งอ่างบ้าน *Kaloula pulchra* เขียดจิก *Rana erythraea* เขียดเหลือง *Rana lateralis* อึ่งแว่น *Calluella guttulata* อึ่งขาดำ *Microhyla pulchra* อึ่งก้นขีด *Kaloula mediolineata* กบบลูฟร็อก *Rana catesbeina* กบอกหนาม *Rana fasculispina* เขียดหลังปุ่ม *Phrynoglossus martensii* พบว่ามีโครโมโซม 2n = 28,26,26,26,24,28,26,26,26 ตามลำดับ (ถาวรและประภาพร, 2533; ถาวรและคณะ 2534; 2535; 2537; 2543) เป็นต้น ปัจจุบันยังไม่ปรากฏรายงาน เขียดทราย อึ่งลาย จงโคร่ง และปาดบ้านเลย ดังนั้นผลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้จะมีประโยชน์อย่างมากในการเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการนำไปใช้ในด้านต่าง ๆ ตามที่กล่าวมาแล้วข้างต้น

ความมุ่งหมายของการวิจัย

เพื่อศึกษาคาริโอไทป์ของเซลล์ตับใน กบนา กบหลังไพล กบหนอง เขียดทราย อึ่งลาย จงโคร่ง และปาดบ้านที่พบในประเทศไทย

ความสำคัญของการวิจัย

1. เพื่อให้ทราบ จำนวน ขนาด รูปร่างโครโมโซมหรือคาริโอไทป์ของกบนา กบหลังไพล กบหนอง เขียดทราย อึ่งลาย จงโคร่ง และปาดบ้าน
2. เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการนำไปประยุกต์ใช้ด้านเซลล์อนุกรมวิธาน ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการและเซลล์พันธุศาสตร์ของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก
3. เพื่อให้ทราบเทคนิคและวิธีการในการใช้เซลล์ตับในการศึกษาโครโมโซมของกบนา กบหลังไพล กบหนอง เขียดทราย อึ่งลาย จงโคร่งและปาดบ้าน เพื่อนำไปประยุกต์ใช้กับสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกชนิดอื่น

ขอบเขตของการวิจัย

ประชากรและกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัย

กบนา กบหลังไพล กบหนอง เขียดทราย อึ่งลาย จงโคร่ง และปาดบ้าน จากภาคกลาง ภาคใต้ ภาคตะวันออกและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย

กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัย

กบนาเพศผู้จำนวน 10 ตัว เพศเมีย 12 ตัวจากอำเภอปากพลี อำเภอบ้านนา จังหวัดนครนายก และจากอำเภอศรีมหาโพธิ์และบ้านสร้าง จังหวัดปราจีนบุรี

กบหนองเพศผู้จำนวน 15 ตัว เพศเมีย 20 ตัว จากอำเภอมวกเหล็ก อำเภอแก่งคอย จังหวัดสระบุรีและอำเภอบางบาล จังหวัดพระนครศรีอยุธยา

เขียดทรายเพศผู้จำนวน 13 ตัว เพศเมีย 15 ตัว จากอำเภอแก่งคอย จังหวัดสระบุรี อำเภอยางตลาด อำเภอห้วยเม็ก จังหวัดกาฬสินธุ์

อึ่งลายเพศผู้จำนวน 10 ตัว เพศเมีย 15 ตัวจากอำเภอห้วยเม็ก จังหวัดกาฬสินธุ์ และอำเภอเขาค้อ จังหวัดเพชรบูรณ์

จงโคร่งเพศผู้จำนวน 3 ตัว เพศเมีย 2 ตัว จากอำเภอท่าแพ จังหวัดสตูล และอำเภอไทรโยค จังหวัดกาญจนบุรี

ปาดบ้านเพศผู้จำนวน 10 ตัว เพศเมีย 15 ตัว จากอำเภอแก่งคอย อำเภอมวกเหล็ก จังหวัดสระบุรี และจากอำเภอห้วยเม็ก จังหวัดกาฬสินธุ์

รายละเอียดเกี่ยวกับตัวอย่างประชากรที่ใช้ในการวิจัยตามตาราง 1 บทที่ 3

นิยามศัพท์เฉพาะ

คาริโอไทป์ (karyotype) หมายถึงภาพแสดงการจัดโครโมโซมเป็นคู่ ตามรูปร่าง และขนาดของคู่โครโมโซมในสิ่งมีชีวิตในระยะเมทาเฟส (ในไมโทซิส) โดยมีการจัดเรียงกันให้ตำแหน่งของเซนโทรเมียร์อยู่ในระดับเดียวกัน ในกรณีที่โครโมโซมมีแขนยาวไม่เท่ากันจะเรียงกันให้แขนสั้นอยู่ด้านบนและแขนยาวอยู่ด้านล่างเพื่อศึกษาจำนวนโครโมโซมและความผิดปกติของสิ่งมีชีวิตนั้น ๆ

สมมติฐานในการวิจัย

กบนา กบหลังไพล กบหนอง เขียดทราย อึ่งลาย จงโคร่ง และปาดบ้านซึ่งเป็นสัตว์ที่อยู่ต่างวงศ์และต่างชนิดกัน น่าจะมีคาริโอไทป์ที่แตกต่างกัน

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ชีววิทยาของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก

สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก (amphibians) เป็นสัตว์มีกระดูกสันหลังจัดอยู่ในไฟลัมคอร์ดาตา (Phylum Chordata) ซับไฟลัมเวอร์เตบราตา (Subphylum Vertebrata) ชั้นแอมฟิเบีย (Class Amphibia) เป็นสัตว์มีกระดูกสันหลังพวกแรก ๆ ที่ขึ้นจากน้ำมาอาศัยอยู่บนบกแบ่งออกเป็น 6 อันดับ (Order) ด้วยกันคือ

1. อันดับลาบรินโทดอนเทีย (Order Labrynthodontia)
2. อันดับฟิลโลสปอนดิไล (Order Phyllospondyli)
3. อันดับเลปโทสปอนดิไล (Order Leptospondyli)
4. อันดับคอดาตาหรือยูโรเดลลา (Order Caudata หรือ Urodela) ได้แก่พวก ซาลามานเดอร์ (salamander)
5. อันดับอะโพดาหรือจิมโนฟิโอนา (Order Apoda หรือ Gymnophiona) ได้แก่ พวกเขียดงู (caecilians)
6. อันดับแอนูราหรือซาเลียนเทีย (Order Anura หรือ Salientia) ได้แก่ พวก กบ เขียด อึ่งอ่าง ปาด (frogs) และคางคก (toads)

สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกใน 3 อันดับแรกได้สูญพันธุ์ไปนานแล้ว พบซากโบราณในยุคคาร์บอนิเฟอรัส (Carboniferus) ยุคเพอร์เมียน (Permian) ยุคดีโวเนียน (Devonian) ถึงไทรแอสสิก (Triassic) ส่วนที่ยังมีชีวิตอยู่ในปัจจุบันได้แก่ 3 อันดับสุดท้าย (Taylor, 1962; วิโรจน์, 2544; ธัญญา , 2546)

ลักษณะสำคัญของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกคือเป็นพวกที่มีต่อมตามผิวหนัง มีเมือกลื่น ไม่มีเกล็ดโผล่ออกมาให้เห็นนอกลำตัว มีเหงือกไม่เป็นคู่ มีช่องจมูก 2 ช่องติดต่อถึงช่องปาก กะโหลกศีรษะ มีปุ่มออกซิปิทอล (occipital condyle) 2 ปุ่ม หัวใจมี 3 ห้อง หายใจด้วยผิวหนัง ปอด และเหงือก ไม่มีสารจำพวกวุ้นหุ้ม ปกติวางไข่ในน้ำ ตัวอ่อนอาศัยอยู่ในน้ำ ตัวเต็มวัยอาศัยอยู่ในน้ำหรือในที่มีความชื้นบนบก พบตั้งแต่ยุคดีโวเนียนจนถึงปัจจุบัน มีอยู่ประมาณ 2,500 ชนิด (Taylor, 1962;Storer and Usinger, 1957) จากการสำรวจสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในประเทศไทยตั้งแต่ต้นจนถึงปี 2544 พบ 107 ชนิด (จารุจินต์, 2531; วิโรจน์, 2544) และล่าสุด ธัญญา (2546) รายงานไว้ 141 ชนิด

ลักษณะสำคัญของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในอันดับกบ เขียด อึ่งอ่าง ปาด คางคก (Order Anura) มีดังนี้

สัตว์ในอันดับนี้มีลำตัวค่อนข้างสั้นมี 4 ขา มีหลายกลุ่ม และมีรูปร่างแตกต่างกันหลายแบบ มีทั้งลำตัวขนาดใหญ่เช่น ในกบทูตหรือกบภูเขา บางกลุ่มมีลำตัวแบนเรียว เช่นในสกุลกบเวียตนาม สัตว์ในอันดับนี้มีมากกว่า 2,000 ชนิด (Taylor, 1962; ธัญญา, 2546) มีอยู่ด้วยกัน 14 วงศ์ แต่ในประเทศไทยพบด้วยกันทั้งหมด 6 วงศ์ (ธัญญา, 2546) ได้แก่

1. วงศ์อึ่งกราย (Family Megophryidae)
2.วงศ์กบเขียด (Family Ranidae)
3. วงศ์อึ่งอ่าง (Family Microhylidae)
4. วงศ์ปาคเมืองจีน (Family Hylidae)
5. วงศ์ปาด (Family Rhacophoridae)
6.วงศ์คางคก (Family Bufonidae)

ลักษณะสำคัญของวงศ์กบ เขียด (Family Ranidae)

กบนา กบหลังไพล กบหนอง เขียดทราย ที่ศึกษาในครั้งนี้จัดอยู่ในวงศ์นี้ ลักษณะสำคัญคือ หัวเรียวค่อนข้างโค้ง ปลายปากแหลมมน ตัวโตเต็มวัย (adult) ไม่มีหาง กระดูกรองรับขาหน้า (pectoral girdle) เป็นแบบ อกแผ่นหรืออกติด (firmisternum) มีฟันที่ขากรรไกรบนและที่กระดูกฐานจมูก ส่วนปีกของกระดูกสันหลัง ข้อก่อนกระดูกก้นกบเป็นท่อนทรงกระบอกหรือแบนเล็กน้อย ไม่มีกระดูกอ่อนแทรกอยู่ระหว่างกระดูกนิ้ว 2 ท่อนตอนปลาย (ธัญญา , 2546)

กบนา *Hoplobatrachus rugulosus* (Wiegmann, 1835)

ลำตัวสีเขียวมะกอกอมน้ำตาล ขาหน้าและขาหลังสั้นเมื่อเทียบกับความยาวลำตัว ปลายนิ้วขยายเป็นปุ่มโดยเฉพาะตรงนิ้วขาหลังที่มีแผ่นหนังขึง หลังและสีข้างมีจุดสีดำจาง ๆ กระจายอยู่ทั่วไป ท้องสีเทา ใต้คางมีขีดยาว ๆ สีดำ พบทั่วไปตามแหล่งน้ำจืดในที่ราบลุ่ม ปัจจุบันนิยมเลี้ยงในเชิงเศรษฐกิจทั้งกบขนาดใหญ่ที่ใช้เป็นอาหาร และกบขนาดเล็กใช้เลี้ยงสัตว์สวยงามพบทุกภาคประเทศไทย ขนาดโตเต็มที่ตัวยาวประมาณ 65-85 มิลลิเมตร (วิโรจน์, 2544; ธัญญา, 2546)

กบหลังไพล *Rana lateralis* Boulenger, 1887

ลำตัวมีสีเขียวไพล เขียวมะกอก เหลืองหรือน้ำตาลอมเหลือง ข้างลำตัวมีสีเข้ม หลังสันต่อมนูน หลังแผ่นหูมีเส้นสีดำเฉียง แผ่นหูมีสีน้ำตาลเข้ม ขอบปากบนมีเส้นสีขาว คางและอกมีลายทองตามแนวกลาง ท้องสีเหลือง อาศัยอยู่ตามฟาร์มป่าที่แห้งแล้ง เช่น ป่าเต็งรัง พบทุกภาคของประเทศไทยยกเว้นภาคใต้ ขนาดยาวประมาณ 48-55 มิลลิเมตร (วิโรจน์, 2544; ธัญญา, 2546)

กบหนอง *Fejervarya limnocharis* Gravenhorst, 1939

ลำตัวสีเขียวมะกอก หรือน้ำตาลหรือน้ำตาลอมเขียวบนหลังมีจุดสีน้ำตาลเข้มขนาดใหญ่กระจายอยู่ทั่วไป ขอบปากบนและล่างมีแถบสีเข้ม บางตัวมีเส้นกลางตัว ท้องสีขาวออกครีม อาศัยอยู่ตามที่ราบเกษตรกรรม ป่าไม้ และสนามหญ้าตามบ้านเรือน พบทั่วทุกภาคของประเทศไทย ขนาดยาวประมาณ 40-62 มิลลิเมตร (วิโรจน์, 2544; ธัญญา , 2546)

เขียดทรายหรือเขียดจะนา *Occidozyga lima* Kuhland van Hasselt, 1882

ลำตัวสีน้ำตาลอมเขียว บางตัวมีเส้นกลางหลังสีจาง ๆ ขอบนอกของต้นขาไปถึงก้นมีแถบสีดำ ผิวหนังตามลำตัวด้านบนเต็มไปด้วยตุ่มขนาดต่าง ๆ กัน ที่คอและท้องมีตุ่มขนาดใหญ่แบนเรียงต่อกันเหมือนแผ่นกระเบื้อง เนื่องจากมีหนังเหนียวนิยมใช้เป็นเหยื่อตกปลา อาศัยอยู่ตามที่ราบทั่วไปตามแหล่งน้ำจืดเช่น หนอง บึง คู คลอง และนาข้าวน้ำท่วม พบทั่วทุกภาคของประเทศไทย ขนาดยาวประมาณ 35-39 มิลลิเมตร (วิโรจน์, 2544; ธัญญา, 2546)

ลักษณะสำคัญของวงศ์อึ่งอ่าง (Family Microhylidae)

ลำตัวขนาดเล็กถึงขนาดใหญ่ หัวเล็กสั้น ส่วนใหญ่แผ่นหูซ่อนอยู่ใต้ผิวหนัง ขาสั้น บางสกุลมีตุ่มที่ฝ่าตีนด้านในแหลมคมเหมือนพลั่ว เช่นสกุลอึ่งลาย *Calluella* สกุลอึ่งเผ้า *Glyphoglossus* และสกุลอึ่งอ่างบ้าน *Kaloula* ส่วนใหญ่ผิวหนังตามลำตัวเรียบ ยกเว้นสกุลอึ่งปุ่ม *Kalophrynus* ที่เต็มไปด้วยจุดเล็ก ๆ หนาแน่น ตัวเต็มวัยมีความแตกต่างด้านความเป็นอยู่และแหล่งอาศัยมาก แต่กินอาหารคล้ายกันส่วนใหญ่เป็นพวกมด ปลวก และแมลงขนาดเล็ก ขณะที่เป็นลูกอ๊อดหากินผิวน้ำและกลางน้ำ (ธัญญา , 2546)

อึ่งลาย *Calluella guttulata* (Blyth, 1855)

ลำตัวป้อมสีน้ำตาล หรือน้ำตาลอมแดงมีฟันที่กระดูกขากรรไกรบน และที่กระดูกฐานจมูก รูม่านตากลม ลิ้นใหญ่รูปไข่ ปลายนิ้วตีนพองออกเล็กน้อย นิ้วตีนหลังมีแผ่นพังผืด แผ่นหลังและตอนบนของสีข้างมีลายสีแดงเข้มหักไปมาคล้ายตาข่ายท้องสีขาว ผิวหนังมีรอยพับคาดขวางหน้าอก อาศัยอยู่ตามพื้นป่าเบญจพรรณและป่าดิบแล้ง พบทั่วทุกภาคของประเทศไทย ขนาดยาวประมาณ 40-50 มิลลิเมตร (วิโรจน์, 2544 ; ธัญญา, 2546)

ลักษณะสำคัญของวงศ์คางคก (Family Bufonidae)

คางคกในประเทศไทยส่วนใหญ่มีลักษณะจำได้ง่าย มีลำตัวป้อม ขาสั้น ผิวหนังหยาบเต็มไปด้วยปุ่ม ปม ส่วนใหญ่ มีต่อมพิษ (parotoid gland) ใหญ่ด้านหลังของแผ่นหูชัดเจน นิ้วขาหน้าไม่มีแผ่นหนังขึงยึด รูม่านตาอยู่ในแนวราบ แหล่งอาศัยหลากหลายเช่น ตามพื้นป่า ลำธาร บางชนิดอยู่บนต้นไม้ เช่น คางคกต้นไม้ คางคกในประเทศไทยมีอยู่ด้วยกัน 4 สกุลคือ สกุลคางคกขายาว

Leptophryne สกุลคางคกห้วย *Ansonia* คางคกต้นไม้ *Pedostebes* และสกุลคางคกบ้าน *Bufo* สกุลคางคกบ้านมีอยู่ด้วยกัน 5 ชนิดคือ จงโคร่ง (river toad) *Bufo asper* คางคกหัวราบ (flat-head toad) *Bufo macrotes* คางคกแคระมลายู(Malayan dwarf toad) *Bufo divergens* คางคกแคระ (Indochines dwarf toad) *Bufo parvus* และคางคกบ้าน (black-spine toad) *Bufo melanostictus* (ธัญญา , 2546)

จงโคร่ง *Bufo asper* Gravenhorst, 1829

เป็นคางคกที่มีขนาดใหญ่ ลำตัวป้อม มีเส้นแข็งบริเวณเหนือตาและแผ่นหู แต่ไม่มีเส้นแข็งที่ขมับ ต่อมพิษใหญ่ที่หลังแผ่นหูมีลักษณะกลม ลำตัวมีสีดำหรือน้ำตาลเข้ม ท้องสีจางประด้วยจุดสีดำ อาศัยอยู่ตามลำธารขนาดใหญ่ที่มีแก่งหินในป่าดิบแล้งถึงป่าดิบชื้น พบทางภาคตะวันตกที่จังหวัดอุทัยธานี กาญจนบุรี ทางภาคใต้พบที่จังหวัดสตูล นครศรีธรรมราช ขนาดยาวประมาณ 250 มิลลิเมตร (วิโรจน์, 2544; ธัญญา , 2546)

ลักษณะสำคัญของวงศ์ปาด (Family Rhacophoridae)

ขนาดความยาวลำตัวมีตั้งแต่ 20 มิลลิเมตร จนถึง 100 มิลลิเมตร ผิวหนังตามลำตัวและขามีทั้งเรียบ สาก มีปุ่มหรือเต็มไปด้วยปุ่มปม บางสกุลมีผิวหนังบนหัวติดแน่นกับแผ่นกะโหลก บริเวณขาหน้าแข็ง ข้อตื้น หรือบริเวณเหนือก้นของบางสกุลมีผิวหนังยื่นออกมาเป็นแถบชายครุยหรือติ่ง ปลายนิ้วตีนขยายออกเป็นแผ่นเห็นได้ชัดเจน แผ่นปลายนิ้วปกติมีร่องโดยรอบ ตุ่มที่ฝ่าตีนด้านนอกสองอันแยกกันโดยมีแผ่นพังผืดคั่น ยกเว้นสกุลปาดแคระแผ่นพังผืดที่ยึดระหว่างนิ้วตีนแคบกว้างหลายระดับ รูม่านตารีในแนวราบ (ธัญญา ,2546)

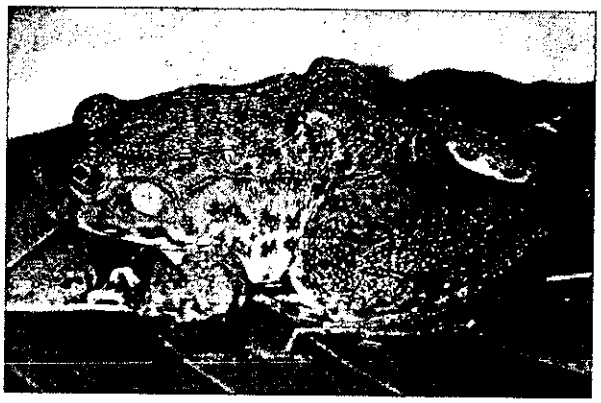
ปาดบ้าน *Polypedates leucomystax* (Kuhl in Gravenhorst, 1829)

ลำตัวมีขนาดกลางถึงขนาดใหญ่ ลำตัวสีเทาหรือน้ำตาลอมเหลือง กลางหลังมีจุดหรือแต้มสีเข้มหรือมีขีดยาว ๆ 4 เส้นขนานกัน ผิวหนังบนหัวติดกันแน่นกับกะโหลก นิ้วตีนหน้าไม่มีแผ่นพังผืด ไม่มีแผ่นเป็นติ่งหรือชายครุยที่ส่วนของลำตัวหรือขา ขามีลายพาดสีเข้ม พบอาศัยอยู่ตามบ้านสวน ทุ่งนา ป่าเขา ทั่วทุกภาคของประเทศไทย ขนาดยาวประมาณ 50-80 มิลลิเมตร (วิโรจน์, 2544 ; ธัญญา, 2546)

การศึกษาเกี่ยวกับโครโมโซมและคาริโอไทป์

คาริโอไทป์หมายถึง ภาพแสดงการจัดโครโมโซมเป็นคู่ตามรูปร่าง และขนาดของคู่โครโมโซมในสิ่งมีชีวิตในระยะเมทาเฟส โดยมีการจัดเรียงกันให้ตำแหน่งของเซนโทรเมียร์อยู่ในระดับเดียวกัน ในกรณีที่มีแขนยาวไม่เท่ากัน จะเรียงกันให้แขนสั้นอยู่ด้านบนและแขนยาวอยู่ด้านล่าง เพื่อศึกษาจำนวนโครโมโซมและความผิดปกติในสิ่งมีชีวิตนั้น ๆ ไดอะแกรมของคาริโอ

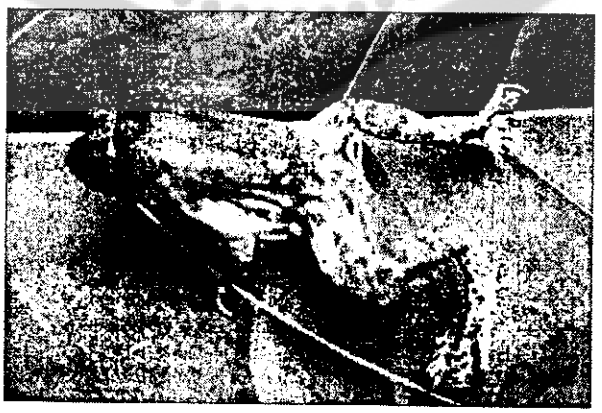
ไทป์เรียก อิดิโอแกรม (idiagram) การวิเคราะห์คาริโอไทป์หรือการจัดคาริโอไทป์มักใช้โครโมโซมในระยะโพรเฟสหรือเมทาเฟสของการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส นอกจากนี้ยังใช้โครโมโซมในบางระยะของการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสมาใช้ได้ด้วย (Sharma, 1991; Rudi et al., 1998; สมาคมพันธุศาสตร์แห่งประเทศไทย, 2548) การจัดคาริโอไทป์อาจจัดได้ด้วยกัน 2 แบบ คือ จัดเรียงโครโมโซมคู่เหมือนจากโครโมโซมที่มีขนาดใหญ่หรือยาวที่สุดไปหาโครโมโซมที่มีขนาดเล็กที่สุดหรือสั้นที่สุด กับการจัดคาริโอไทป์โดยจัดเรียงโครโมโซมคู่เหมือนจากโครโมโซมที่มีขนาดใหญ่สุดไปหาโครโมโซมที่มีขนาดเล็กสุดโดยจัดเรียงตามชนิดหรือแบบโครโมโซมจากที่มีขนาดใหญ่สุดไปหาเล็กสุดจาก



A

B

C



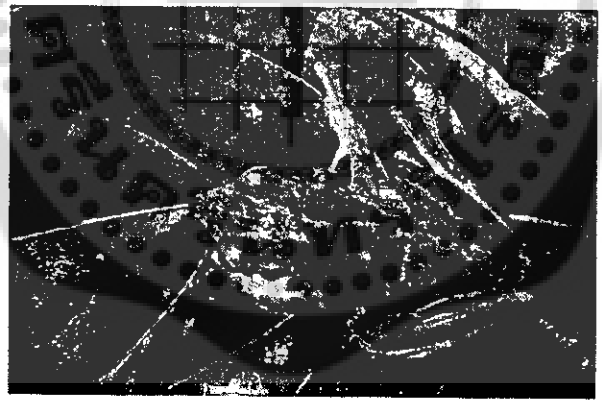
D

ภาพประกอบ 1 ภาพถ่ายกบนา *Hoplobatrachus rugulosus* (A) กบหลังไพล *Rana lateralis* (B) กบหนอง *Fejervarya limnocharis* (C) และเขียดทราย *Occidozyga lima* (D)

A

B

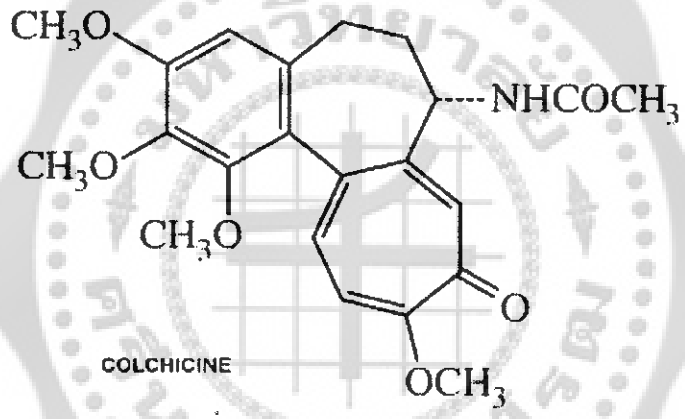
C



ภาพประกอบ 2 ภาพถ่ายอึ่งลาย *Calluella guttulata* (A) จงโคร่ง *Bufo asper* (B) และปาดบ้าน *Polypedates leucomystax* (C)

โครโมโซมแบบเมทาเซนทริก (metacentric) ไปเป็นซับเมทาเซนทริก (submetacentric) ซับเทโลเซนทริก (subtelocentric) และอะโครเซนทริก (acrocentric) หรือเทโลเซนทริก (telocentric) ตามลำดับ (Cestari and Galetti, 1992)

การที่จะได้มาซึ่งโครโมโซมในระยะเมทาเฟสเพื่อนำมาใช้ในการศึกษาโครโมโซมและวิเคราะห์คาริโอไทป์ นิยมใช้สารเคมีเช่น โคลชิซิน (colchicine) โคลซิมิด (colcimid) เวลบาน (velban) เวลบลาสติน ซัลเฟต(velblastin sulphate) นอมัล- โบรโมแนปทาลิน (n-bromonapthalin) 8-ไฮดรอกซีควิโนลิน (8-hydroxyquinolin) อะซีแนปทีน (acenapthene) คลอรัลไฮเดรต (chloral hydrate) แกมมีเซน (gammexane) (Denton, 1973 ; Sharma, 1991 ; Rudi et al., 1998) แต่สารที่นิยมใช้กันมากคือโคลชิซิน โคลชิซินเป็นสารประกอบอัลคาลอยด์ สกัดได้จากเมล็ดและเหง้า (corm) ของต้นออทัมโครคัส (autumn crocus) ที่มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Colchicum autumnale* โดยโคลชิซินมีโครงสร้างทางเคมี ดังภาพประกอบ 3 (Rudi et al., 1998)



ภาพประกอบ 3 โครงสร้างทางเคมีของโคลชิซิน

โคลชิซินที่ใช้จะไปยับยั้งการทำงานของสปินเดิลไมโครทูบูล (spindle microtubule) คือทำให้ปลายข้างหนึ่งของไมโครทูบูลของสปินเดิลไฟเบอร์ (spindle fiber) เกิดการแตกหัก คือทำให้อัลฟาทูบูลิน (α- tubulin) และบีตาทูบูลิน (β- tubulin) ของไมโครทูบูลไม่สามารถเกาะจับกันได้ จึงทำให้ไมโครทูบูลของสปินเดิลไฟเบอร์ไม่สามารถเกาะจับกับไคนีโทคอร์ (kinetochore) ของโครโมโซมจึงทำให้โครโมโซมของการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส ไม่สามารถผ่านเข้าสู่การแบ่งเซลล์ต่อไปได้ ทำให้การแบ่งเซลล์หยุดที่ระยะเมทาเฟสด้วยเหตุนี้การใช้สารโคลชิซินฉีดหรือแช่เซลล์ของพืชและสัตว์จึงทำให้การแบ่งเซลล์ในระยะเมทาเฟสเพิ่มขึ้น (Denton, 1973; Campbell, 1996; Rudi et al., 1998)

การเตรียมโครโมโซมเพื่อวิเคราะห์คาริโอไทป์ของปลาและสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกมักใช้โคลชิซินความเข้มข้นตั้งแต่ 0.01- 0. 3 เปอร์เซ็นต์ ฉีดเข้าบริเวณช่องท้องในปริมาณ 0.25 – 1.5

มิลลิลิตรต่อน้ำหนักตัวประมาณ 2-3 กรัม ใช้เวลาประมาณ 2 ชั่วโมงครึ่งไปจนถึง 23 ชั่วโมง แต่ถ้าเป็นลูกอ๊อดอาจใช้ความเข้มข้น 0.001 เปอร์เซ็นต์ แช่เป็นเวลาประมาณ 2-5 ชั่วโมง แล้วตัดเอาครีบหางของลูกอ๊อดออกมาเตรียมโครโมโซมแบบกดบี้ให้แบน (Wasserman and Bogart, 1968; Schmid, 1982)

อวัยวะของกบ เขียด อึ่งอ่าง คางคก ปาด ซาลามานเดอร์และสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกอื่น ๆ ที่นิยมนำมาใช้ในการเตรียมโครโมโซมได้แก่เยื่อบุแก้วตา (cornial epithelium) ตับ ซึ่งเกิดจากการแบ่งเซลล์ของพวกเซลล์พาเรงคิมา (parenchyma cell) ม้าม (spleen) ซึ่งเกิดจากการแบ่งเซลล์ของเซลล์ลิมฟอยด์ (lymphoid cell) ไต (kidney) ซึ่งเกิดจากการแบ่งเซลล์ในเนื้อเยื่อไมอีลอยด์ (myeloid) และลิมฟอยด์ (lymphoid) เซลล์เยื่อบุผิวของท่อทางเดินอาหารหรือลำไส้ เซลล์ไขกระดูก (bone marrow cell) เซลล์สเปิร์มมาโทโกเนีย (spermatogonia cell) ของอัณฑะ ตับ ม้าม และไตถือเป็นอวัยวะที่เป็นศูนย์กลางของการสร้างและทำลายเซลล์เม็ดเลือดแดง ดังนั้นอวัยวะเหล่านี้จึงมีการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสอยู่ตลอดเวลา นอกจากจะใช้เซลล์ร่างกายของการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสในการศึกษาคาริโอไทป์และ NORs แล้วเซลล์ในระยะเมทาเฟสของการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสที่ใช้ในการศึกษาคาริโอไทป์ได้เช่นเดียวกัน อวัยวะที่นิยมใช้ในการเตรียมโครโมโซมคืออัณฑะ นอกจากเตรียมโครโมโซมโดยตรงจากเซลล์ของอวัยวะตามที่กล่าวมาแล้ว ยังนิยมการเตรียมโครโมโซมจากการเพาะเลี้ยงเซลล์วิธีที่นิยมใช้กันมากคือการเพาะเลี้ยงเซลล์จากเซลล์เม็ดเลือดขาวลิมโฟไซท์ (lymphocyte) และจากเซลล์เนื้อเยื่อไตในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์โดยเฉพาะ เซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงทำให้ได้เซลล์ที่มีการแบ่งเซลล์ในระยะเมทาเฟสสูงแต่เทคนิคและวิธีการค่อนข้างยากลงทุนสูงผลที่ได้จากการเตรียมโครโมโซมจากเนื้อเยื่อโดยตรงมิได้ผลแตกต่างกันมากมายนัก (Denton, 1973; Wasserman and Bogart, 1968 ; Bogart, 1974 ; Formas et al.,1983 ; Birstein and Marzin, 1982 ; Kuramoto, 1980; Schmid, 1982 ; Birstein, 1984 ; de Almeida et al., 1990 ; Schmid et al., 1990)

เทคนิคการเตรียมโครโมโซมเพื่อศึกษาคาริโอไทป์ที่นิยมใช้กันอยู่ในปัจจุบันได้แก่การเตรียมโครโมโซมแบบกดบี้ให้แบน (squash technique) วิธีไฮโปโทไนเซชัน แอร์ดรายอิงเทคนิค (hypotonization air drying technique) วิธีไฮโพโทนิค โฮโมจีไนส์ ฟีกเซชัน แฟรกชันเนชัน แอร์ดรายอิงเทคนิค (hypotonic homogenize fractionation air drying technique) คือการแช่เซลล์หรือเนื้อเยื่อนั้นในโพแทสเซียมคลอไรด์ที่เป็นไฮโพโทนิค แล้วสับออกเป็นชิ้นเล็ก ๆ เข้าเครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) เพื่อให้เซลล์แตกและตกตะกอนแล้วนำตะกอนนั้นมาหยดบนสไลด์ และผึ่งไว้ให้แห้งในอากาศ (Wasserman and Bogart ,1968 ; Denton,1973 ; Bogart,1974 ; de Almeida et al.,1990 ; Campbell,1996)

การย้อมสีโครโมโซมเพื่อวิเคราะห์คาริโอไทป์เพื่อแสดงบริเวณนิวคลีโอลัสออร์แกไนเซอร์หรือ NORs ซึ่งเป็นบริเวณที่ตั้งของนิวคลีโอลัส (nucleolus) (Summer,1990) หรือบริเวณที่ตั้งของ

18s และ 28s rRNA gene (Rab et al., 1996) วิธีการย้อมโครโมโซมมีอยู่ด้วยกันหลายแบบ แบบที่ใช้กันทั่วไป (conventional staining) คือการย้อมสีโครโมโซมด้วยสีย้อมกิมซา (Giemsa's stain) หรือสีย้อมออร์ซีน (orcein) นอกจากนี้ยังนิยมย้อมด้วยสีย้อมคาร์มีน (carmine) และย้อมด้วยสีย้อมฟอลเกน (feulgen) ซึ่งบ่งบอกถึงตำแหน่งที่อยู่ของดีเอ็นเอ (DNA specific staining) การวิเคราะห์คาริโอไทป์นอกจากวิธีการย้อมแบบมาตรฐานดังกล่าวแล้ว ยังนิยมย้อมแถบโครโมโซมแบบต่าง ๆ เพื่อให้การจัด คาริโอไทป์แม่นยำขึ้นและมีประโยชน์ในแง่อื่น ๆ เช่น

การย้อมแถบซี (C-band) นอกจากจะช่วยในการจัดคาริโอไทป์ของโครโมโซมคู่เหมือนได้ถูกต้องแม่นยำขึ้นแล้ว ยังช่วยตรวจสอบว่าโครโมโซมมีวิวัฒนาการถึงขั้นที่มีการสะสมเฮเทอโรโครมาทิน (heterochromatin) แล้วหรือยัง ตามสมมุติฐานเกี่ยวกับวิวัฒนาการของโครโมโซมเพศของโอโน (Ohno,1967) การย้อมแถบสีแบบนี้ ถ้ามีสีแตกต่างกันของโครโมโซมคู่ใดคู่หนึ่งแสดงว่ามีวิวัฒนาการของโครโมโซมถึงขั้นที่มีการสะสมเฮเทอโรโครมาทิน แต่ถ้าไม่ต่างกันหรือเหมือนกัน แสดงว่า ยังไม่เกิดวิวัฒนาการถึงขั้นสะสมเฮเทอโรโครมาทิน (วรวุฒิ และคณะ,2544)

การย้อมแถบสีด้วยวิธี Ag- NOR staining นอกจากจะบอกถึงตำแหน่งที่ตั้งของนิวคลีโอลัส หรือ 18s และ28s rRNA gene แล้ว การย้อมแบบนี้ยังช่วยวิเคราะห์เพศได้ด้วย ถ้าตรวจสอบพบว่าโครโมโซมคู่เหมือนคู่ใดที่มีตำแหน่งของ NORs เพียงโครโมโซมเดียว แสดงว่าโครโมโซมคู่นั้นเป็นโครโมโซมเพศ (Schmid et al., 1993)

การย้อมแถบจี (G- band) นอกจากจะช่วยในการจัดโครโมโซมคู่เหมือนได้ถูกต้องแม่นยำแล้ว ยังช่วยตรวจสอบว่าโครโมโซมมีการเกิดอินเวอร์ชัน (inversion) หรือไม่ ซึ่งการเกิดอินเวอร์ชันเป็นขั้นตอนหนึ่งของวิวัฒนาการของโครโมโซมเพศตามสมมุติฐานเกี่ยวกับวิวัฒนาการของโอโน (Ohno,1967) ถ้าแถบสีของโครโมโซมไม่แตกต่างกัน แสดงว่าไม่มีการเกิดวิวัฒนาการของโครโมโซมจนเกิดอินเวอร์ชัน (วรวุฒิ และคณะ,2544)

การย้อมแถบสีแบบ Brd U – replication banding เป็นวิธีการย้อมเพื่อช่วยในการตรวจสอบว่า โครโมโซมมีกลไกป้องกันการเกิด crossing over หรือไม่ ถ้าแถบสีที่พบของโครโมโซมคู่เหมือนไม่แตกต่างกัน แสดงว่าไม่มีวิวัฒนาการถึงขั้นที่มีการป้องการเกิด crossing over ตามสมมุติฐานของโอโน (Ohno,1967)

นอกจากที่กล่าวมาแล้วยังมีการย้อมแถบสีแบบ แถบคิว (Q-band) การย้อมแบบแถบอาร์ (R-band) การย้อมแบบแถบเอ็น (N-band) (Rudi et al.,1998)

การศึกษาเซลล์พันธุศาสตร์เกี่ยวกับโครโมโซมและคาริโอไทป์ของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในต่างประเทศนั้น อุลเลริช (Ullerich,1966) ได้ศึกษาโครโมโซมของคางคก *Bufo bufo, B. viridis, B. bufo* x *B. viridis* และ *B. calameta* พบว่าคางคกทั้งหมดมีโครโมโซม 2n=22 เท่ากัน

วาสเซอร์แมนและโบการ์ท (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

ไทโมสกาและฟิชเบิร์ก (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* พบว่า มีโครโมโซม 2n=36 เท่ากันและ *X. tropicalis* มีโครโมโซม 2n=20 *X. (laevis) bunyoniensis*มีโครโมโซม 2n=72 *X rumenzoriensis* มีโครโมโซม 2n= 108 ผลการศึกษาไม่พบขนาดโครโมโซมเพศที่แตกต่างกัน

โบการ์ท (Bogart, 1974) ศึกษาคาริโอไทป์ของกบสกุล *Leptodactylus* ทั้งหมด 18 ชนิด ได้แก่ *L. bufonis , L. fuscus , L. melanonotus , 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 กลุ่มคือกลุ่มที่มีโครโมโซม 22, 24 และ 26 และได้ให้ข้อเสนอแนะว่ากลุ่มที่มีโครโมโซม 26 น่าจะเป็นบรรพบุรุษของพวกที่มีโครโมโซม 22 และ 24 และพวกที่อาศัยอยู่บนบก มีแนวโน้มที่จะไปอาศัยอยู่ในน้ำ ไม่ใช่พวกที่อาศัยอยู่ในน้ำขึ้นมาอาศัยอยู่บนบกตามข้อเสนอของเฮเยอร์ (Heyer , 1969) และของลิงค์ (Lynch , 1971; 1973)

ชมิด (Schmid , 1978a) ศึกษาสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในวงศ์คางคก (Family Bufonidae) และวงศ์ปาดเมืองจีน (Family Hylidae) 22 ชนิดได้แก่คางคก *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 ชนิดได้แก่ปาด *Hyla arborea , H. cinerea , H. septentrionalis* และ *Pseudacris ornata* มีโครโมโซม 2n=24 ส่วนคางคกอีก 3 ชนิดคือ *B. gamani , B. poweri* และ *B. regularis* มีโครโมโซม 2n=20 ซึ่งคางคกและปาดทั้ง 22 ชนิดดังกล่าวมีโครโมโซมที่ไม่สามารถบ่งบอกความแตกต่างทางเพศได้

ฟอร์มาส (Formas , 1978) ศึกษาโครโมโซมของกบในวงศ์ Leptodactyllidae ได้แก่ *Eupsophus roseus* ซึ่งประชากรดังกล่าวได้มาจากที่แตกต่างกัน 3 แห่งของประเทศชิลี พบว่าประชากรทั้ง3 แห่งมีโครโมโซม 2n=30 เท่ากันแต่มีคาริโอไทป์แตกต่างกัน

กูราโมโต (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

ฟอร์มาสและวีรา (Formas and Vera , 1983) ศึกษาโครโมโซมของกบ *Alsodes vauzolinii* และ *A. verucosus* พบว่ามีจำนวนโครโมโซม 2n=26 เท่ากันแต่มีคาริโอไทป์ต่างกันและไม่พบโครโมโซมเพศ

นิชิโอกะและคณะ (Nishioka et al., 1987) ศึกษาโครโมโซมของ *Rana nigromaculata* , *R. brevipoda* , *R. plancyi chosenica* , *R. plancyi fukiensis* , *R. lessonae* , *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

ชมิดและคณะ (Schmid et al.,1988) ศึกษาโครโมโซมในกบ *Centrolenella antisthenesi* พบว่ามีโครโมโซม 2n=20 และพบโครโมโซมเพศชนิด xy โดยโครโมโซม x และ y โครโมโซมมีความยาวของโครโมโซมเท่ากันแต่มีอัตราส่วนของแขนโครโมโซมระหว่างแขนยาวต่อแขนสั้นต่างกันคือ โครโมโซม y มีแขนข้างสั้น สั้นกว่าโครโมโซม x

ไอเทอร์รา และวีโลโซ (Iturra and Veloso , 1989) ศึกษาโครโมโซมในกบ *Eupsophus migueli* และ *E. roseus* พบว่ากบทั้งสองชนิดมีโครโมโซม 2n=30 เท่ากัน และพบโครโมโซมเพศชนิด xy ในกบชนิดแรกคือ โครโมโซมคู่ที่ 14 เป็นโครโมโซมเพศชนิด 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 บริเวณเซนโทรเมียร์ ส่วนโครโมโซม x มี constitutive heterochromatin บริเวณเซนโทรเมียร์

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

ชมิดและคณะ (Schmid et al., 1993) 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

โอตะและมัตซุย (Ohta and Matsui, 1995) ศึกษาโครโมโซมของกบ *Platymantis pelewensis* พบว่ามีจำนวนโครโมโซม 2n=22 และไม่สามารถบอกถึงความแตกต่างของโครโมโซมเพศได้

การศึกษาเซลล์พันธุศาสตร์ของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในประเทศไทยมีการศึกษากันน้อยเพียงไม่กี่คน และเริ่มศึกษากันเมื่อไม่นานมานี้เอง โดยนงลักษณ์ (2518) ศึกษาโครโมโซมของอึ่งน้ำเต้า *Microhyla ornata* เขียดอีโม่ *Rana limnocharis* และคางคกบ้าน *Bufo melanostictus* พบว่ามีโครโมโซม 2n=24,26 และ 22 ตามลำดับ

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

ถาวร และคณะ (2535) ศึกษาโครโมโซมของอึ่งปากขวด *Glyphoglossus molossus* และปาดบ้าน *Rhacophorus leucomystax* พบว่ามีโครโมโซม 2n= 26 เท่ากันแต่มีคาริโอไทป์ต่างกัน

ถาวร และคณะ (2535) ศึกษาโครโมโซมและคาริโอไทป์ของเขียดเหลือง *Rana lateralis* และอึ่งแว่น *Calluella guttulata* พบว่ามีโครโมโซม 2n=26 เท่ากัน แต่มีรูปแบบของโครโมโซมต่างกัน

ถาวร และคณะ (2537) ศึกษาโครโมโซมของอึ่งขาคำ *Microhyla pulchra* และอึ่งก้นขีด *Kaloula mediolineata* พบว่ามีโครโมโซม 2n=24 และ 28 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังได้ศึกษาโครโมโซมของกบจุก *Rana pileata* โดยการย้อมสีแบบแถบซี พบว่ามีโครโมโซม 2n=26

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

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

ถาวร และคณะ (2543) ศึกษาจำนวนโครโมโซมของกบอกหนาม *Rana fasculispena* และเขียดหลังปุ่ม *Phrynoglossus matensii* พบว่ามีโครโมโซม 2n=26 เท่ากันแต่มีคาริโอไทป์แตกต่างกัน

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

ธวัช และอัจฉริยา (2548) ศึกษาคาริโอไทป์ของกบภูเขา *Rana blythyi* เขียดบัว *R. erythraea* เขียดกาญจนบุรี *R. leptoglossa* เขียดน้ำนอง *Occidozyga martensii* อึ่งเผ้า *Glyphoglossus molosus* จากเซลล์ตับ พบว่ามีโครโมโซม 2n=26 เท่ากัน ยกเว้นกบภูเขามีโครโมโซม 2n=24.

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์และสารเคมี

1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

กล้องจุลทรรศน์แบบผสม

กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ

กล้องจุลทรรศน์พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพอัตโนมัติ

ฟิล์มขาวดำ BW 400 CN

คาลิเปอร์เวอร์เนียร์

จานเพาะเชื้อ (petri – dish)

หลอดปลายแหลมพร้อมจุกยาง

ชุดเครื่องมือผ่าตัด

หลอดแก้ว (testube)

กระบอกตวงและกรวยกรองสาร

ภาชนะใส่สีย้อม (coplin jar)

ที่วางหลอดแก้ว

เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)

แปรงล้างขวด

ขวดดองตัวอย่าง

ตู้กระจกขนาด 12 x 24 นิ้ว

กระจกสไลด์และกระจกปิดสไลด์

กล่องเก็บสไลด์

ตาชั่งแบบละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง (analytic balance)

ขวดหยด

1.2 สารเคมี

โคลชิซินความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์

กรดน้ำส้มล้วน (glacial acetic acid)

เอทิลแอลกอฮอล์สัมบูรณ์ (absolute ethyl alcohol)

เอทิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์

เอทิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์

ฟอร์มาลิน 10 เปอร์เซ็นต์

น้ำยาคาร์นอย (Carnoy's fixative) ประกอบด้วยกรดน้ำส้มล้วน 1 ส่วน และเอทิลแอลกอฮอล์สัมบูรณ์ 3 ส่วน

โพแทสเซียมคลอไรด์ (potassium chloride) 0.075 เปอร์เซ็นต์

ไดเบสิกโซเดียมฟอสเฟต (dibasic sodiumphosphate) 9.465 กรัม น้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

โพแทสเซียม แอสิด ฟอสเฟต (potassium acid phosphate) 9.07 กรัม น้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

ซอเรนเสน ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Sorenscn's phosphate buffer) ประกอบด้วยสารละลายเบสิก โซเดียมฟอสเฟตต่อสารละลายโพแทสเซียม แอสิด ฟอสเฟตในอัตราส่วน 1:1

สีย้อมกิมซา (Giemsa's stain) สีย้อมของเมอร์ค 4 มิลลิลิตร กับซอเรนเสน ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 100 มิลลิลิตร

น้ำยาผนึกเพอร์เมานท์ (permount)

อีเทอร์

น้ำกลั่น

2. วิธีดำเนินการ

2.1 ศึกษาเอกสารแหล่งที่พบและหาแหล่งแพร่กระจายของกบนา กบหลังไพล กบหนอง เขียดทราย อึ่งลาย จงโคร่ง และปาดบ้าน

2.2 ออกเก็บรวบรวมตัวอย่าง และติดต่อพ่อค้าที่นำกบเขียดมาขายอีกทางหนึ่ง เพื่อให้หาตัวอย่างสัตว์ที่ต้องการโดยกำชับถึงแหล่งที่มาของตัวอย่าง

2.3 ตัวอย่างที่ได้มานำบรรจุในถุงตาข่ายหล่อด้วยน้ำเล็กน้อยนำกลับมายังห้องปฏิบัติการภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ปล่อยตัวอย่างที่ได้มาในตู้กระจกขนาด 12 x 24 นิ้ว ตู้ละประมาณ 1 นิ้วมีก้อนอิฐวางไว้เป็นระยะเพื่อให้เป็นที่ขึ้นมานั่ง ปิดตู้กระจกด้วยมุ้งไนลอน ตัวอย่างดังกล่าวเก็บรวบรวมมาตั้งแต่เดือนเมษายน 2549 ถึงเดือนกรกฎาคม 2550

2.4 กบนา กบหลังไพล กบหนอง เขียดทราย อึ่งลาย จงโคร่ง ปาดบ้านที่เลี้ยงไว้ให้อาหารจำพวกหนอนนก และจิ้งหรีด 2 วันต่อครั้ง

2.5 ตัวอย่างสัตว์ทั้ง 7 ชนิดตาม 2.3 ที่นำมาใช้ในการวิจัยมีจำนวน เพศ และแหล่งที่มา มีรายละเอียดดังแสดงในตาราง 1

ตาราง 1 จำนวน แหล่งที่เก็บรวบรวมตัวอย่าง กบนา กบหลังไพล กบหนอง เขียดทราย อึ่งลาย จงโคร่ง และปาดบ้าน ที่นำมาใช้ในการศึกษาคาริโอไทป์

ชนิดของสัตว์	จำนวน(ตัว)		แหล่งที่มาของตัวอย่าง	
	เพศผู้	เพศเมีย	อำเภอ	จังหวัด
กบนา	10	12	ปากพลี	นครนายก
			บ้านนา	นครนายก
			ศรีมหาโพธิ์	ปราจีนบุรี
			บ้านสร้าง	ปราจีนบุรี
กบหลังไพล	5	6	ทองผาภูมิ	กาญจนบุรี
			บ่อพลอย	กาญจนบุรี
กบหนอง	15	20	มวกเหล็ก	สระบุรี
			แก่งคอย	สระบุรี
			บางบาล	พระนครศรีอยุธยา
เขียดทราย	13	15	แก่งคอย	สระบุรี
			ยางตลาด	กาฬสินธุ์
			ห้วยเม็ก	กาฬสินธุ์
อึ่งลาย	10	15	ห้วยเม็ก	กาฬสินธุ์
			เขาค้อ	เพชรบูรณ์
จงโคร่ง	3	2	ท่าแพ	นครศรีธรรมราช
			ไทรโยค	กาญจนบุรี
ปาดบ้าน	10	15	แก่งคอย	สระบุรี
			มวกเหล็ก	สระบุรี
			ห้วยเม็ก	กาฬสินธุ์

3. การวินิจฉัยและการตรวจสอบชื่อวิทยาศาสตร์ของกบนา กบหลังไพล กบหนอง เขียดทราย อึ่งลาย จงโคร่ง และปาดบ้าน

นำตัวอย่างที่เก็บรวบรวมมาได้ขณะที่มีชีวิตอยู่ตรวจสอบรูปร่างลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลวดลาย สีสันบนลำตัว และอีกชนิดละ 3-4 ตัว ฆ่าด้วยอีเทอร์ ดองเก็บไว้ในฟอร์มาลิน 10 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 2-3 วัน จากนั้นจึงเปลี่ยนเก็บดองไว้ในเอทิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์

เพื่อนำมาใช้ในการวินิจฉัย และความถูกต้องของชื่อวิทยาศาสตร์โดยถือตามแนวของเทเลอร์ (Taylor, 1962) วิโรจน์ (2544) และของธัญญา (2546)

4. ลักษณะทางสัณฐานวิทยาบางประการของกบนา กบหลังไพล กบหนอง เขียดทราย อึ่งลาย จงโคร่ง และปาดบ้าน

ตัวอย่างกบนา กบหลังไพล กบหนอง เขียดทราย อึ่งลาย จงโคร่ง และปาดบ้านที่ใช้ในการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาบางประการเป็นตัวอย่างที่ผ่านการเตรียมโครโมโซมมาแล้ว โดยตัวอย่างแต่ละชนิดเก็บดองไว้ในเอทิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ ภายหลังดองฟอร์มาลินมาแล้วเป็นเวลา 2-3 วัน โดยนำตัวอย่างของสัตว์แต่ละชนิดมาวัดขนาดความยาวของลำตัว (head body length) ความยาวหัว (head length) ความยาวขาหน้า (fore limb length) ความยาวขาหลัง (hind limb length) การวัดดังกล่าวถือตามแนวของเทเลอร์ (Taylor, 1962) วิโรจน์ (2544) และธัญญา (2546)

การวัด

ความยาวลำตัว วัดจากปลายสุดปากถึงรูก้น

ความยาวหัว วัดจากปลายสุดของปากถึงขอบด้านท้ายแผ่นหู (tympanic membrane)

ความยาวขาหน้า วัดจากซอกมุมขาหน้าไปยังข้อเท้าขาหน้า

ความยาวขาหลัง วัดจากรูก้นไปยังข้อเท้าขาหลังเมื่อเหยียดตรง

5. การศึกษาคาริโอไทป์

โครโมโซมที่ใช้ในการศึกษาคาริโอไทป์ได้มาจากโครโมโซมของการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสในระยะเมทาเฟสของเซลล์จากเนื้อเยื่อตับ

5.1 การเตรียมโครโมโซมจากเนื้อเยื่อตับ

ดัดแปลงมาจากเทคนิคและวิธีการของอิดะและคีโอ (Ida and Kyo, 1980) ซึ่งสรุปเป็นขั้น ๆ ได้ดังนี้

5.1.1 นำกบนา กบหลังไพล กบหนอง เขียดทราย อึ่งลาย จงโคร่ง และปาดบ้าน แต่ละชนิดที่เลี้ยงไว้มาฉีดด้วยโคลชิซินความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ เข้าที่บริเวณช่องท้องในปริมาณประมาณ 0.1 มิลลิลิตรต่อน้ำหนักตัวประมาณครึ่งกรัมครั้งละตัวต่อชนิด นำตัวอย่างสัตว์แต่ละชนิดที่ฉีดแล้วลงปล่อยไว้ในตู้กระจกที่แยกไว้ต่างหาก หล่อด้วยน้ำเล็กน้อย ปล่อยไว้เป็นเวลาประมาณ 9-23 ชั่วโมง

5.1.2 นำตัวอย่างสัตว์แต่ละชนิดที่ฉีดด้วยโคลชิซินและครบเวลาแล้วมาฆ่าโดยทำให้สลบด้วยอีเทอร์หรือแช่ด้วยน้ำแข็งประมาณ 10-20 นาที หรือจนตาย ใช้กรรไกรขลิบเปิดช่องท้อง ใช้

ปากคีบดึงและตัดเอาตับล้างเอาเลือดออกด้วยโพแทสเซียมคลอไรด์ 0.075 เปอร์เซ็นต์ แล้วแช่ไว้ในสารละลายดังกล่าวในจานแก้วสำหรับใช้เพาะเชื้อ

5.1.3 ใช้ปากคีบ คีบเอาตับที่แช่อยู่ในจานเพาะเชื้อขึ้นวางบนกระจกสไลด์ หยดสารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ลงไปเล็กน้อยใช้มีดผ่าตัดสับตับให้ละเอียด แล้วใช้หลอดหยดดูดโพแทสเซียมคลอไรด์ล้าง นำลงในจานเพาะเชื้อ ปล่อยทิ้งไว้เป็นเวลาประมาณ 45 นาที เพื่อให้เซลล์บวมและแตกได้ง่าย

5.1.4 ดูดเอาตับในจานเพาะเชื้อใส่ลงในหลอดแก้ว นำหลอดแก้วเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) โดยใช้ความเร็วประมาณ 800-1,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที

5.1.5 ดูดน้ำใส ๆ ที่อยู่ด้านบนของหลอดแก้วทิ้งไปเหลือไว้แต่ส่วนที่เป็นตะกอนก้นหลอด แล้วดูดน้ำยาดองสภาพคาร์นอยซึ่งประกอบด้วยเอทิลแอลกอฮอล์สัมบูรณ์ 3 ส่วน ต่อกรดน้ำส้มล้วน 1 ส่วนลงไปแทนที่ ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลาประมาณ 25 นาทีแล้วนำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงอีกโดยใช้ความเร็วต่อรอบและเวลาเท่าเดิม ปฏิบัติเช่นนี้อีก 2 ครั้งรวมเป็น 4 ครั้ง

5.1.6 ดูดตะกอนที่ก้นหลอด หยดลงบนกระจกสไลด์ที่สะอาด 1-2 หยดและผึ่งไว้ให้แห้งสนิทในอากาศ

5.1.7 นำสไลด์ที่มีเซลล์แห้งสนิทดีแล้วลงย้อมในสีย้อมกิมซา 4 เปอร์เซ็นต์ใน ซอเรนเสนฟอสเฟต บัปเฟอร์ใช้เวลาในการย้อมประมาณ 20-30 นาทีหรือจนกระทั่งเห็นโครโมโซมย้อมติดเป็นสีแดงชัดเจน ล้างสไลด์ด้วยน้ำกลั่นและผึ่งไว้ให้แห้งสนิทในอากาศ

5.1.8 นำสไลด์ที่ผึ่งไว้จนแห้งดีแล้วไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ สุ่มหาเซลล์ที่มีกลุ่มของโครโมโซมแผ่กระจายดี มีรูปร่างลักษณะดี ทำเครื่องหมายกลุ่มที่มีโครโมโซมแผ่กระจายดีไว้สำหรับนำไปใช้ในการถ่ายภาพ เก็บสไลด์ดังกล่าวไว้ในกล่องเก็บสไลด์ เพื่อป้องกันมิให้ฝุ่นหรือสิ่งสกปรกต่าง ๆ ตกลงเกาะบนสไลด์

5.2 การถ่ายรูปโครโมโซม

นำสไลด์ที่เตรียมไว้แล้วในข้อ 5.1.8 ไปตรวจหาโครโมโซมที่เตรียมเอาไว้ด้วยกล้องจุลทรรศน์สำหรับใช้ถ่ายภาพแบบ BH-2 ของโอลิมปัส บันทึกภาพไว้ด้วยกล้องถ่ายภาพพร้อมอุปกรณ์ควบคุมแสงอัตโนมัติ PM-20 โดยใช้เลนส์วัตถุกำลังขยาย 100 เท่า เลนส์ถ่ายภาพ (photo eye piece) กำลังขยาย 5 เท่าบันทึกภาพไว้ด้วยฟิล์มขาวดำ BW-400 CN โดยถ่ายภาพกบนา กบหลังไพล กลหนอง เขียดทราย อึ่งลายจงโคร่ง และปาดบ้านตัวละ 3-15 กลุ่มเซลล์จนครบทุกชนิด

5.3 การวิเคราะห์โครโมโซม

5.3.1 การหาจำนวนโครโมโซม

นำเอาฟิล์มของสัตว์แต่ละชนิดที่บันทึกไว้ด้วยฟิล์มขาวดำไปล้างอัดขยายขนาด 4x6 นิ้ว หรือภาพโปสการ์ด นำภาพเหล่านี้มานับจำนวนโครโมโซม ความถี่ของจำนวนโครโมโซมที่นับได้สูงสุด (mode) ของสัตว์แต่ละชนิดถือเป็นจำนวนโครโมโซมแบบดิพลอยด์ (2n) ของสัตว์ชนิดนั้น

5.3.2 การวัดโครโมโซมและการจัดคาริโอไทป์

เลือกรูปที่มีโครโมโซมเท่ากัน มีรูปร่างลักษณะ และการแผ่กระจายดีที่สุดจำนวน 5 กลุ่มเซลล์มาวัดหาขนาดความยาวแขนโครโมโซมด้วยคาลิเปอร์เวอร์เนียร์ ตรวจสอบความถูกต้องด้วยการวัดโครโมโซมด้วยออคคูลาร์ไมโครมิเตอร์ (occular micrometer) เทียบกับการวัดด้วยคาลิเปอร์เวอร์เนียร์ว่าได้เท่ากันหรือใกล้เคียงกันหรือไม่ เมื่อเห็นว่าได้ค่าเท่ากันหรือใกล้เคียงกันแล้วจึงวัดขนาดของฟิล์มและภาพขยายด้วยคาลิเปอร์เวอร์เนียร์ โดยวัดความยาวแขนโครโมโซมจากตำแหน่งเซนโทรเมียร์ คือตำแหน่งรอยคอดของโครโมโซมไปยังปลายแขนทั้งสองข้างของโครโมโซม ค่าตัวเลขที่วัดได้ถ้าน้อยกว่าถือเป็นแขนข้างสั้น ถ้ามากกว่าถือเป็นแขนข้างยาว ปฏิบัติเช่นเดียวกันนี้กับสัตว์แต่ละชนิดจนครบชนิดละ 5 กลุ่มโครโมโซม หรือจากกลุ่มโครโมโซมจากทั้ง 5 เซลล์แล้วหาค่าเฉลี่ย จากนั้นจึงคำนวณหาอัตราส่วนระหว่างแขนยาวต่อแขนสั้น (arm ratio) ตามวิธีของลีแวนและคณะ (Levan et al., 1964) เพื่อแบ่งชนิดของโครโมโซมตามอัตราส่วนที่ปรากฏตามตาราง 2

ตาราง 2 ชนิดของโครโมโซมตามอัตราส่วนระหว่างแขนยาวต่อแขนสั้นตามวิธีของลีแวน และคณะ (Levan et al., 1964)

อัตราส่วนระหว่างแขนยาวต่อแขนสั้น	ชนิดของโครโมโซม	สัญลักษณ์
1.0 - 1.7	เมทาเซนทริก	m
1.7 - 3.0	ซับเมทาเซนทริก	sm
3.0 - 7.0	ซับเทโลเซนทริก	st
7.0 - ∞	อะโครเซนทริกหรือเทโลเซนทริก	t

จับคู่โครโมโซมคู่เหมือน (homologous chromosome) โดยอาศัยค่าอัตราส่วนระหว่างแขนยาวต่อแขนสั้นที่เท่ากันหรือใกล้เคียงกันมากที่สุด ความยาวของโครโมโซมที่เท่ากันหรือใกล้เคียงกันประกอบด้วยลักษณะที่คล้ายคลึงกันมากที่สุด แล้วตัดภาพโครโมโซมจากรูปขยายขนาด 4x6 นิ้ว จัดเรียงคาริโอไทป์โดยเรียงตามลำดับจากโครโมโซมคู่ที่ยาวที่สุดหรือใหญ่ที่สุดไปหาคู่ที่สั้นที่สุดหรือเล็กที่สุด โดยให้แขนข้างสั้นอยู่ด้านบน แขนด้านยาวอยู่ด้านล่าง จากเมทาเซนทริก (metacentric) ไปเป็นซับเมทาเซนทริก (submetacentric) ซับเทโลเซนทริก (subtelocentric) และอะโครเซนทริกหรือเทโลเซนทริก (acrocentric หรือ telocentric) ตามแนวของเซสตารี และกาเลตตี (Cestari and Galetti,1992)

5.3.3 การหาจำนวนแขนโครโมโซม (fundamental number หรือ arm number หรือ NF)

การหาจำนวนแขนโครโมโซมแบ่งออกได้เป็น 2 แบบคือ

แบบที่ 1 จำนวนแขนโครโมโซมแบ่งออกเป็น 2 พวกคือพวกที่มีโครโมโซม 2 แขน (biarmed group) ได้แก่โครโมโซมแบบเมทาเซนทริก ซับเมทาเซนทริก กับพวกที่มีแขนเดียว (monoarmed group) ได้แก่โครโมโซมแบบซับเทโลเซนทริก กับแบบอะโครเซนทริกหรือเทโลเซนทริก

แบบที่ 2 จำนวนแขนโครโมโซมแบ่งออกเป็น 2 พวกคือพวกที่มีโครโมโซม 2 แขน ได้แก่โครโมโซมแบบเมทาเซนทริก ซับเมทาเซนทริก ซับเทโลเซนทริก กับพวกที่มีแขนเดียวได้แก่โครโมโซมแบบอะโครเซนทริกหรือเทโลเซนทริก

จำนวนแขนโครโมโซมของการวิจัยนี้ผู้วิจัยถือตามแบบที่ 2

5.3.4 การหาขนาดโครโมโซม (chromosome size)

ถือเอาตามวิธีของอุลเลริช (Ullerich,1966) โดยแบ่งโครโมโซมออกเป็น 2 พวก คือ พวกที่มีขนาดใหญ่กับพวกที่มีขนาดเล็ก พวกที่มีขนาดใหญ่คือพวกที่มีโครโมโซมยาวเกินครึ่งหนึ่งของคู่โครโมโซมหรือโครโมโซมคู่เหมือนที่ยาวที่สุด ส่วนที่เหลือจัดเป็นพวกที่มีขนาดเล็ก

5.3.5 การสร้างอิดิโอแกรม (idiogram)

คำนวณหาค่าเฉลี่ยความยาวแขนสั้น (short arm length หรือ SL) ความยาวแขนยาว (long arm length หรือ LL) อัตราส่วนระหว่างแขนยาวต่อแขนสั้น (LL/SL) ของโครโมโซมคู่เหมือน ด้วยวิธีนี้ทำให้เราได้ค่าเฉลี่ยต่าง ๆ ของโครโมโซมคู่เหมือน (chromosome pair) ปฏิบัติเช่นเดียวกันนี้กับกลุ่มโครโมโซมที่เหลืออีก 4 กลุ่ม รวมเป็น 5 กลุ่ม เซลล์ ด้วยวิธีดังกล่าวนี้ทำให้

เราได้ค่าเฉลี่ยความยาวแขนสั้น ความยาวแขนยาว ความยาวแขนทั้งแขนหรือความยาวสัมบูรณ์ (total length หรือ absolute length หรือ TL) (แขนสั้นบวกแขนยาว) อัตราส่วนระหว่างแขนยาวต่อแขนสั้น และชนิดของโครโมโซม (chromosome type หรือ CT) นำค่าเฉลี่ยที่ได้ดังกล่าวมาเขียนเป็นอิดิโอแกรมโดยเรียงลำดับจากโครโมโซมคู่เหมือนที่ยาวที่สุดไปหาคู่ที่สั้นที่สุด โดยให้แขนสั้นตั้งขึ้นด้านบน แขนยาวอยู่ด้านล่างจากโครโมโซมแบบเมทาเซนทริกไปเป็นซับเมทาเซนทริก ซับเทโลเซนทริกและอะโครเซนทริกตามลำดับ ตามวิธีของเซสตารีและการเลตตี (Cestari and Galetti,1992) ให้ตำแหน่งของเซนโทรเมียร์อยู่ในแนวเดียวกัน โดยใช้อัตราส่วนความยาว 1 เซนติเมตรต่อความยาวโครโมโซม 1 ไมโครเมตร (micrometer หรือ μm) โดยให้แกนนอนหรือแกน x เป็นคู่โครโมโซมหรือโครโมโซมคู่เหมือน (chromosome pair) แกนตั้งหรือแกน y เป็นแกนความยาวโครโมโซมแบบสัมบูรณ์ (total length หรือ absolute length) หรือความยาวจริงตามธรรมชาติ (natural size) หรือ ความยาวสัมพัทธ์ (relative length หรือ RL) ที่จะกล่าวถึงต่อไป ปฏิบัติดังกล่าวกับสัตว์ทุกชนิดจนครบทั้งหมด

6. การหาความยาวสัมพัทธ์ (relative length หรือ RL)

ความยาวสัมพัทธ์มีค่าเป็นเปอร์เซ็นต์ จึงไม่จำเป็นต้องนำค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation หรือ SD) มาคำนวณด้วย หาได้จากความยาวแขนแบบสัมบูรณ์หรือความยาวแขนทั้งแขนของโครโมโซมคู่เหมือนแต่ละคู่ (chromosome pair) คูณด้วย 100 หารด้วยผลบวกของโครโมโซมคู่เหมือนทั้งหมดหรือเขียนเป็นสูตรได้ดังนี้

$$RL = \frac{\text{ความยาวสัมบูรณ์ของโครโมโซมคู่เหมือนแต่ละคู่ x 100}}{\text{ผลบวกของโครโมโซมคู่เหมือนทั้งหมด}}$$

บทที่ 4
ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

กบนา *Hoplobratachus rugulosus* กบหลังไพล *Rana lateralis* กบหนอง *Fejervarya limnocharis* เขียดทรายหรือเขียดจะนา *Occidozyzyga lima* อึ่งลาย *Calluela guttulata* จงโคร่ง *Bufo asper* และปาดบ้าน *Polypedates leucomystax* ที่นำมาใช้ศึกษาคาริโอไทป์มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาบางประการดังปรากฏตามตาราง 3

ตาราง 3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาบางประการของกบนา กบหลังไพล กบหนอง เขียดทราย อึ่งลาย จงโคร่ง และปาดบ้าน

ชนิดของสัตว์	ความยาวหัว (ซ.ม.) เฉลี่ย ± SD	ความยาวลำตัว (ซ.ม.) เฉลี่ย ± SD	ความยาวขาหน้า(ซ.ม.) เฉลี่ย ± SD	ความยาวขาหลัง(ซ.ม.) เฉลี่ย ± SD
กบนา	3.40 ± 0.274	8.78 ± 1.451	2.66 ± 0.186	6.08 ± 0.898
กบหลังไพล	1.68 ±0.117	4.56 ± 0.174	1.62 ± 0.177	4.06 ± 0.367
กบหนอง	1.62 ± 0.117	5.26 ± 0.242	1.24 ± 0.510	3.86 ± 0.326
เขียดทราย	0.64 ± 0.080	2.68 ± 0.075	0.54 ± 0.080	1.64 ± 0.080
อึ่งลาย	1.46 ± 0.049	4.36 ± 0.356	1.44 ± 0.287	2.68 ± 0.264
จงโคร่ง	3.44 ± 0.233	10.20 ± 0.593	3.24 ± 0.320	7.34 ± 0.206
ปาดบ้าน	1.78 ± 0.133	6.98 ± 1.216	2.24 ± 0.432	5.08 ± 0.479

ผลการศึกษาคาริโอไทป์ของกบนา กบหลังไพล กบหนอง เขียดทราย อึ่งลาย จงโคร่ง และปาดบ้านพบว่า

กบนา *H. rugulosa* มีความถี่ในการกระจายของจำนวนโครโมโซมแบบดิพลอยด์ (2n) สูงสุดอยู่ที่ 2n=26 จำนวน 45 เซลล์จากจำนวนเซลล์ที่นับรวมทั้งหมด 46 เซลล์คิดเป็น 97.83 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นกบนาจึงมีจำนวนโครโมโซมแบบดิพลอยด์ 2n=26 ตามตาราง 4 และ 5 ภาพประกอบ 4A, 4B, 5A, 5B และภาพประกอบ 6 คาริโอไทป์ประกอบด้วยโครโมโซมแบบเมทาเซนทริก 10 คู่ และซับเมทาเซนทริก 3 คู่มีแซทเทลไลท์ (satellite) 1 คู่ ตั้งอยู่ที่ปลายแขนข้างสั้นของโครโมโซมแบบเมทาเซนทริกคู่ที่ 10 (ภาพประกอบ 4B, 5B, และ 6) จำนวนแขนโครโมโซม (NF) เท่ากับ 52 ตามตาราง 5 โครโมโซมมีความยาวแขนทั้งแขน (total length หรือ TL) หรือความยาวสัมบูรณ์ (absolute length) ตั้งแต่ 2.282 - 8.397 ไมโครเมตร (micrometer หรือ μm) เฉลี่ย 3.129±0.511 ไมโครเมตร ความยาวสัมพัทธ์ (relative length หรือ RL) ตั้งแต่ 4.544-13.948

เปอร์เซ็นต์ เฉลี่ย 7.622 เปอร์เซ็นต์ โครโมโซมขนาดใหญ่มี 5 คู่ได้แก่คู่ที่ 1,2,3,11 และ 12 โครโมโซมขนาดเล็กมี 8 คู่ได้แก่คู่ที่ 4,5,6,7,8,9,10 และ 13 ตามตารางที่ 6 และ 13

กบหลังไพล *R. lateralis* มีความถี่ของจำนวนโครโมโซมแบบดิพลอยด์ (2n) สูงสุดอยู่ที่ 2n=26 จำนวน 50 เซลล์จากจำนวนเซลล์ที่นับรวมทั้งหมด 50 เซลล์คิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นกบหลังไพลจึงมีจำนวนโครโมโซมแบบดิพลอยด์ 2n=26 ตามตาราง 4 และ 5 ภาพประกอบ 7A, 7B, 8A, 8B และภาพประกอบ 9 คาริโอไทป์ประกอบด้วยโครโมโซมแบบเมทาเซนทริก 8 คู่ และซับเมทาเซนทริก 5 คู่(ภาพประกอบ 7B, 8B, และ 9) จำนวนแขนโครโมโซม(NF) เท่ากับ 52 ตามตาราง 5 โครโมโซมมีความยาวแขนทั้งแขนหรือความยาวสัมบูรณ์ตั้งแต่ 3.178 - 8.738 ไมโครเมตร เฉลี่ย 5.247±0.660 ไมโครเมตร ความยาวสัมพัทธ์ตั้งแต่ 4.381-12.793 เปอร์เซ็นต์ เฉลี่ย 7.669 เปอร์เซ็นต์ โครโมโซมขนาดใหญ่มี 7 คู่ ได้แก่คู่ที่ 1,2,3,4,5,9 และ 10 โครโมโซมขนาดเล็กมี 6 คู่ ได้แก่คู่ที่ 6,7,8,11,12 และ13 ตามตาราง 7 และ 13

กบหนอง *F. limnocharis* มีความถี่ในการกระจายของจำนวนโครโมโซมแบบดิพลอยด์ (2n) สูงสุดอยู่ที่ 2n=26 จำนวน 60 เซลล์ จากจำนวนเซลล์ที่นับรวมทั้งหมด 61 เซลล์คิดเป็น 98.36 เปอร์เซนต์ ดังนั้นกบหนองจึงมีจำนวนโครโมโซมแบบดิพลอยด์ 2n= 26 ตามตาราง 4 และ 5 ภาพประกอบ 10A, 10B,11A, 11B และภาพประกอบ 12 คาริโอไทป์ประกอบด้วยโครโมโซมแบบเมทาเซนทริก 9 คู่ ซับเมทาเซนทริก 3 คู่และซับเทโลเซนทริก 1 คู่ (ภาพประกอบ 10B, 11B และ12) จำนวนแขนโครโมโซม (NF) เท่ากับ 52 ตามตาราง 5 โครโมโซมมีความยาวแขนทั้งแขนหรือความยาวสัมบูรณ์ตั้งแต่ 3.190 - 9.860 ไมโครเมตรเฉลี่ย 5.641±0.763 ไมโครเมตร ความยาวสัมพัทธ์ตั้งแต่ 4.544 – 13.948 เปอร์เซ็นต์ เฉลี่ย 7.699 เปอร์เซ็นต์ โครโมโซมขนาดใหญ่มี 6 คู่ได้แก่คู่ที่ 1,2,3,4,5 และ10 โครโมโซมขนาดเล็กมี 7 คู่ ได้แก่คู่ที่ 6,7,8,9,11,12 และ13 ตามตาราง 8 และ 13

เขียดทรายหรือเขียดจะนา *O. lima* มีความถี่ในการกระจายของจำนวนโครโมโซมแบบดิพลอยด์ (2n) สูงสุดอยู่ที่ 2n=26 จำนวน 50 เซลล์ จากจำนวนเซลล์ที่นับรวมทั้งหมด 51 เซลล์ คิดเป็น 98.04 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นเขียดทรายจึงมีจำนวนโครโมโซมแบบดิพลอยด์ 2n= 26 ตามตาราง 4 และ 5 ภาพประกอบ 13A, 13B, 14A, 14B และภาพประกอบ 15 คาริโอไทป์ประกอบด้วยโครโมโซมแบบเมทาเซนทริก 9 คู่ ซับเมทาเซนทริก 4 คู่ (ภาพประกอบ 13B, 14B และ15) จำนวนแขนโครโมโซม (NF) เท่ากับ 52 ตามตาราง 5 โครโมโซมมีความยาวแขนทั้งแขน หรือความยาวสัมบูรณ์ตั้งแต่ 2.811 – 7.718 ไมโครเมตร เฉลี่ย 4.330±0.388 ไมโครเมตร ความยาวสัมพัทธ์ตั้งแต่ 5.055 – 13.632 เปอร์เซ็นต์ เฉลี่ย 7.686 เปอร์เซ็นต์ โครโมโซมขนาดใหญ่มี 7 คู่ ได้แก่คู่ที่ 1,2,3,4,5,6 และ 10 โครโมโซมขนาดเล็กมี 6 คู่ได้แก่คู่ที่ 7,8,9,11,12 และ13 ตามตาราง 9 และ 13

อึ่งลาย *C. guttulata* มีความถี่ในการกระจายของจำนวนโครโมโซมแบบดิพลอยด์ (2n) สูงสุดอยู่ที่ 2n= 26 จำนวน 40 เซลล์ จากจำนวนเซลล์ที่นับรวมทั้งหมด 41 เซลล์ คิดเป็น 97.56 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นอึ่งลายจึงมีจำนวนโครโมโซมแบบดิพลอยด์ 2n= 26 ตามตาราง 4 และ 5

ภาพประกอบ 16A, 16B, 17A, 17B และภาพประกอบ 18 คาริโอไทป์ประกอบด้วยโครโมโซมแบบเมทาเซนทริก 10 คู่ ซับเมทาเซนทริก 3 คู่ (ภาพประกอบ 16B, 17B และ18) จำนวนแขนโครโมโซม (NF) เท่ากับ 52 ตามตาราง 5 โครโมโซมมีความยาวแขนทั้งแขนหรือความยาวสัมบูรณ์ตั้งแต่ 3.365-11.411 ไมโครเมตร เฉลี่ย 6.312±1.016 ไมโครเมตร ความยาวสัมพัทธ์ตั้งแต่ 4.120-13.784 เปอร์เซ็นต์ เฉลี่ย 7.136 เปอร์เซ็นต์ โครโมโซมขนาดใหญ่มี 6 คู่ได้แก่คู่ที่ 1,2,3,4,11 และ 12 โครโมโซมขนาดเล็กมี 7 คู่ได้แก่คู่ที่ 5,6,7,8,9,10 และ 13 ตามตาราง 10 และ 13

จงโคร่ง *B. asper* มีความถี่ในการกระจายของจำนวนโครโมโซมแบบดิพลอยด์ (2n) สูงสุดอยู่ที่ 2n=22 จำนวน 30 เซลล์ จากจำนวนเซลล์ที่นับรวมทั้งหมด 30 เซลล์คิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจงโคร่งจึงมีจำนวนโครโมโซมแบบดิพลอยด์ 2n=22 ตามตาราง 4 และ 5 ภาพประกอบ 19A, 19B, 20A, 20B และภาพประกอบ 21 คาริโอไทป์ประกอบด้วยโครโมโซมแบบเมทาเซนทริก 8 คู่ และซับเมทาเซนทริก 3 คู่ (ภาพประกอบ 19B, 20B และ 21) จำนวนแขนโครโมโซม (NF) เท่ากับ 44 ตามตาราง 5 โครโมโซมมีความยาวทั้งแขนหรือความยาวสัมบูรณ์ตั้งแต่ 2.285-8.626 ไมโครเมตร เฉลี่ย 5.257±0.205 ไมโครเมตร ความยาวสัมพัทธ์ตั้งแต่ 3.937-15.208 เปอร์เซ็นต์ เฉลี่ย 9.051 เปอร์เซ็นต์ โครโมโซมขนาดใหญ่มี 6 คู่ ได้แก่คู่ที่ 1,2,3,4,9 และ10 โครโมโซมขนาดเล็กมี 5 คู่ ได้แก่คู่ที่ 5,6,7,8 และ 11 ตามตาราง 11 และ 13

ปาดบ้าน *P. leucomystax* มีความถี่ในการกระจายของจำนวนโครโมโซมแบบดิพลอยด์ (2n) สูงสุดอยู่ที่ 2n=26 จำนวน 58 เซลล์จากจำนวนเซลล์ที่นับรวมทั้งหมด 59 เซลล์ คิดเป็น 98.31 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นปาดบ้านจึงมีจำนวนโครโมโซมแบบดิพลอยด์ 2n=26 ตามตาราง 4 และ 5 ภาพประกอบ 22A, 22B, 23A, 23B และภาพประกอบ 24 คาริโอไทป์ประกอบด้วยโครโมโซมแบบเมทาเซนทริก 11 คู่และซับเมทาเซนทริก 2 คู่ (ภาพประกอบ 22B, 23B และ 24) จำนวนแขนโครโมโซม (NF) เท่ากับ 52 ตามตาราง 5 โครโมโซมมีความยาวแขนทั้งแขนหรือความยาวสัมบูรณ์ตั้งแต่ 4.155-11.699 ไมโครเมตร เฉลี่ย 6.248±0.814 ไมโครเมตร ความยาวสัมพัทธ์ตั้งแต่ 4.630-12.984 เปอร์เซ็นต์ เฉลี่ย 7.697 เปอร์เซ็นต์ โครโมโซมขนาดใหญ่มี 6 คู่ได้แก่คู่ที่ 1,2,3,4,5 และ 12 โครโมโซมขนาดเล็กมี 7 คู่ได้แก่คู่ที่ 6,7,8,9,10,11 และ 13 ตามตาราง 12 และ 13

ตาราง 4 ความถี่ในการกระจายของจำนวนโครโมโซมแบบดิพลอยด์ (2n) ที่นับได้จากกบนา *Hoplobatrachus rugulosus* กบหลังไพล *Rana lateralis* กบหนอง *Fejervarya limnocharis* เขียดทราย *Occidozyga lima* อึ่งลาย *Calluella guttulata* จงโคร่ง *Bufo asper* และปาดบ้าน *Polypedates leucomystax*

ชนิดของสัตว์	จำนวนโครโมโซมแบบดิพลอยด์									รวมจำนวนเซลล์ที่นับ(เซลล์)	ความถี่สูงสุดของจำนวนเซลล์ที่นับได้ %
	20	21	22	23	24	25	26	27	28		
กบนา	0	0	0	0	0	1	45	0	0	46	97.83
กบหลังไพล	0	0	0	0	0	0	50	0	0	50	100.00
กบหนอง	0	0	0	0	1	0	60	0	0	61	98.63
เขียดทราย	0	0	0	0	0	0	50	1	0	51	98.04
อึ่งลาย	0	0	0	0	0	1	40	0	0	41	97.56
จงโคร่ง	0	0	30	0	0	0	0	0	0	30	100.00
ปาดบ้าน	0	0	0	0	0	1	58	0	0	59	98.31

ตาราง 5 จำนวนโครโมโซมแบบดิพลอยด์ (2n) ชนิดของโครโมโซมและจำนวนแขนโครโมโซม ของ กบนา กบหลังไพล กบหนอง เขียดทราย อึ่งลาย จงโคร่ง และปาดบ้าน

ชนิดของสัตว์	2n	ชนิดของโครโมโซม(คู่)				จำนวนแขนโครโมโซม
		เมทาเซนทริก	ซับเมทาเซนทริก	ซับเทโลเซนทริก	อะโครเซนทริก	
กบนา	26	10	3	0	0	52
กบหลังไพล	26	8	5	0	0	52
กบหนอง	26	9	3	1	0	52
เขียดทราย	26	9	4	0	0	52
อึ่งลาย	26	10	3	0	0	52
จงโคร่ง	22	8	3	0	0	44
ปาดบ้าน	26	11	2	0	0	52

ตาราง 6 ค่าเฉลี่ยความยาวแขนสั้น (SL) ความยาวแขนยาว (LL) ความยาวทั้งแขนหรือความยาวสัมบูรณ์ (total length หรือ absolute length หรือ TL) ความยาวสัมพัทธ์ (relative length หรือ RL) อัตราส่วนระหว่างแขนยาวต่อแขนสั้น (LL/SL) และชนิดของโครโมโซมคู่เหมือน (CT) ในกบนา *Hoplobatrachus rugulosus* จากเซลล์ตับจำนวน 5 เซลล์

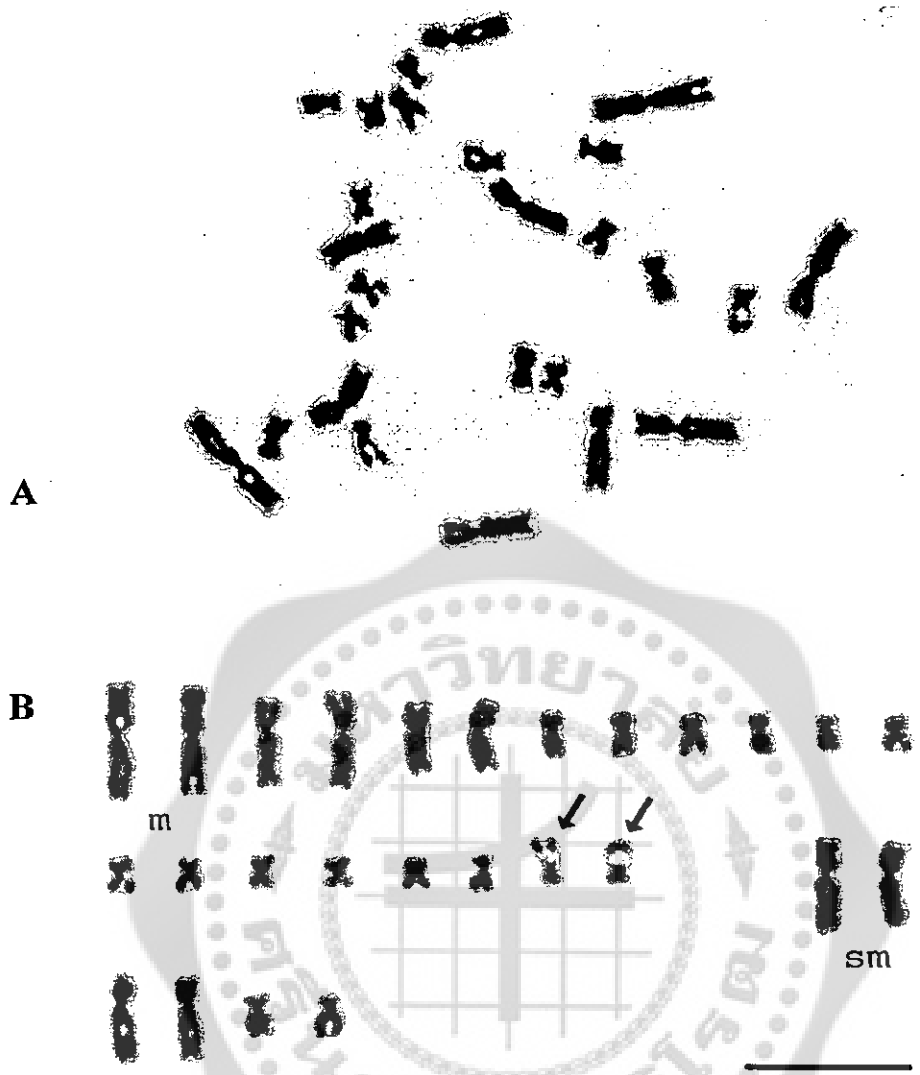
โครโมโซมคู่ที่	SL (µm) เฉลี่ย ± SD	LL (µm) เฉลี่ย ± SD	TL (µm) เฉลี่ย ± SD	RL เฉลี่ย (%)	LL/SL(µm) เฉลี่ย ± SD	CT
1	3.972± 0.437	4.466±0.723	8.397±1.079	14.604	1.133±0.104	m
2	3.003 ±0.431	4.151±0.317	7.029±0.856	12.328	1.395±0.123	m
3	2.385 0±.266	3.067±0.365	5.453±0.583	8.774	1.289±0.126	m
4	1.750±0.201	1.952±0.177	3.703±0.376	6.473	1.118±0.038	m
5	1.457±0.210	1.819±0.287	3.276±0.456	5.642	1.253±0.148	m
6	1.412±0.214	1.695±0.195	3.073±0.335	5.355	1.230±0.071	m
7	1.299±0.172	1.634±0.171	2.933±0.323	5.112	1.265±0.103	m
8	1.238±0.137	1.515±0.169	2.753±0.299	4.800	1.224±0.062	m
9	1.165±0.201	1.370±0.075	2.535±0.254	4.420	1.198±0.183	m
10	1.032±0.132	1.250±0.130	2.282±0.246	3.980	1.218±0.110	m*
11	2.195±0.270	4.327±0.535	6.523±0.717	11.362	1.984±0.238	sm
12	2.051±0.325	4.040±0.558	6.091±0.854	10.593	1.982±0.176	sm
13	1.044±0.090	2.176±0.261	3.219±0.318	5.641	2.088±0.210	sm

หมายเหตุ

m = metacentric chromosome

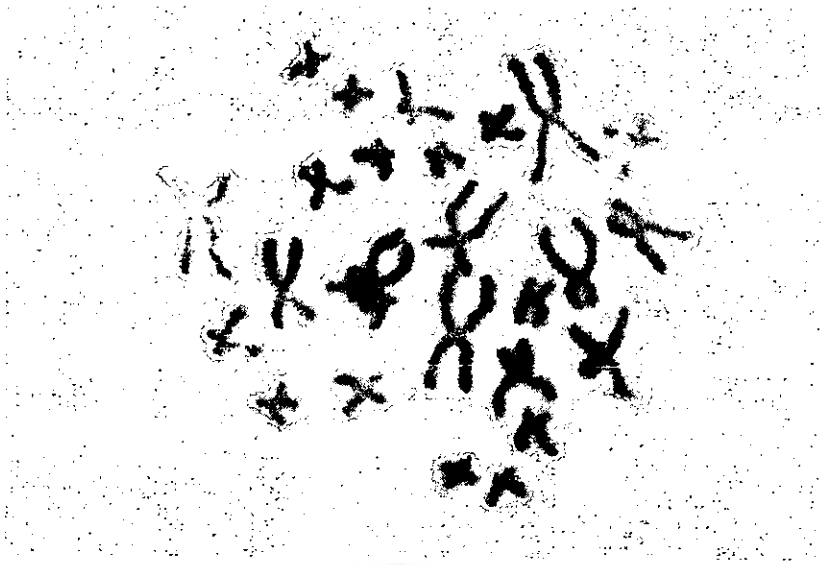
sm = submetacentric chromosome

* = มี satellite 1 คู่

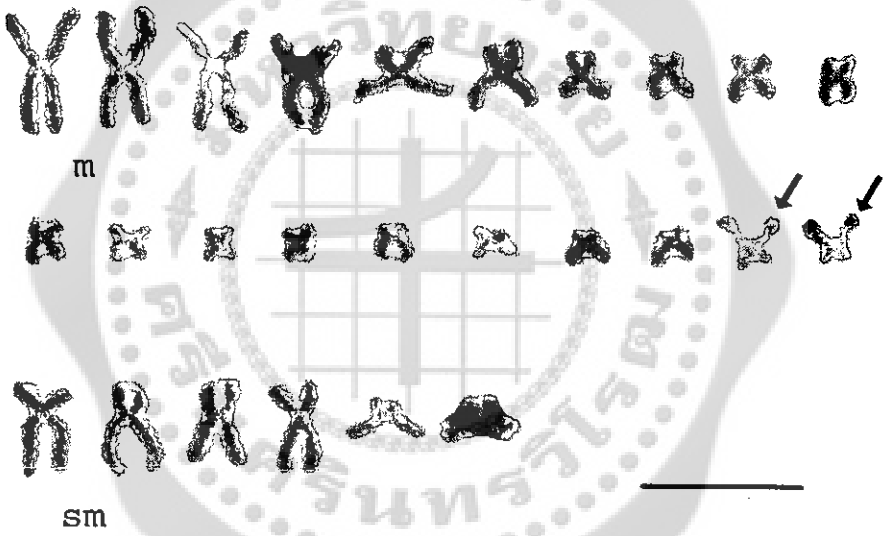


ภาพประกอบ 4 ภาพถ่ายการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสในระยะเมทาเฟสของกบนา *Hoplobatrachus rugulosus* เพศผู้ (A) และคาริโอไทป์ (B) ลูกศรชี้คือแซทเทลไลท์ scale bar = 10 μm

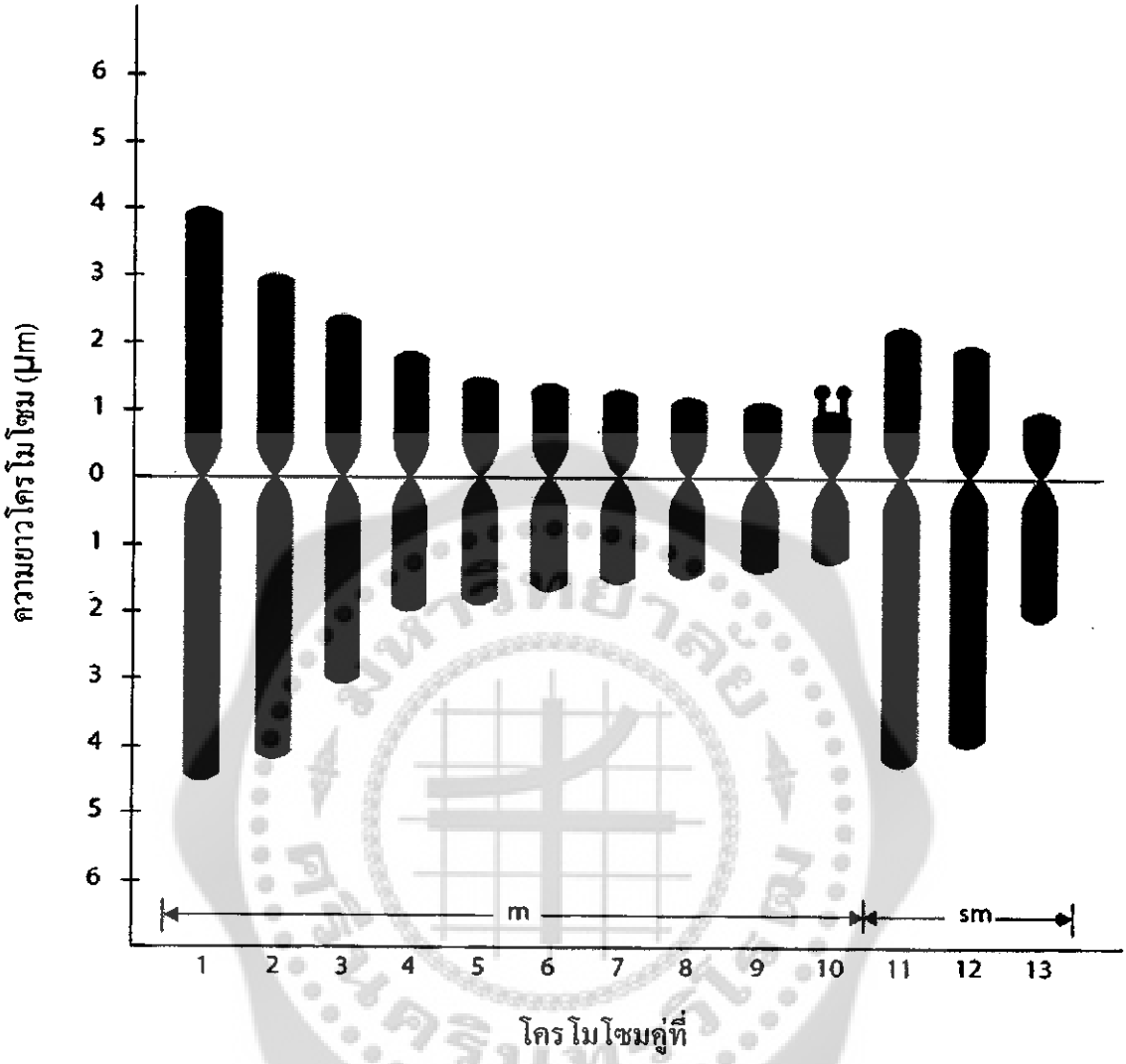
A



B



ภาพประกอบ 5 ภาพถ่ายการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสในระยะเมทาเฟสของกบนา *Hoplobatrachus rugulosus* เพศเมีย (A) และคาริโอไทป์ (B) ลูกศรชี้คือแซทเทลไลท์ scale bar = 10 μm



ภาพประกอบ 6 อิดิโอแกรมของกบนา *Hoplobatrachus rugulosus* เรียงลำดับตามค่าเฉลี่ยความยาวแขนแบบสัมบูรณ์ อัตราส่วนระหว่างแขนยาวต่อแขนสั้นของคู่โครโมโซมหรือโครโมโซมคู่เหมือนจำนวน 5 เซลล์ จุดสีดำกลมของโครโมโซมคือแซทเทลไลท์

ตาราง 7 ค่าเฉลี่ยความยาวแขนสั้น (SL) ความยาวแขนยาว (LL) ความยาวทั้งแขนหรือความยาวสัมบูรณ์ (total length หรือ absolute length หรือ TL) ความยาวสัมพัทธ์ (relative length หรือ RL) อัตราส่วนระหว่างแขนยาวต่อแขนสั้น (LL/SL) และชนิดของโครโมโซมคู่เหมือน (CT) ในกบหลังไพล *Rana lateralis* จากเซลล์ตับจำนวน 5 เซลล์

โครโมโซมคู่ที่	SL (μm) เฉลี่ย ± SD	LL (μm) เฉลี่ย ± SD	TL (μm) เฉลี่ย ± SD	RL เฉลี่ย (%)	LL/SL(μm) เฉลี่ย ± SD	CT
1	4.083±0.434	4.734±0.697	8.738±1.092	12.793	1.181±0.088	m
2	3.326±0.575	4.281±0.627	7.607±1.110	11.125	1.300±0.176	m
3	2.935±0.326	3.879±0.722	6.813±1.023	9.958	1.305±0.158	m
4	2.847±0.454	3.307±0.613	6.154±1.059	8.980	1.159±0.063	m
5	2.053±0.215	2.520±0.217	4.667±0.519	6.846	1.161±0.109	m
6	2.061±0.245	2.292±0.259	4.353±0.461	6.388	1.117±0.111	m
7	1.876±0.265	2.164±0.219	4.040±0.471	5.924	1.161±0.082	m
8	1.664±0.206	2.031±0.228	3.695±0.408	5.426	1.226±0.107	m
9	2.409±0.393	4.450±0.386	7.133±1.068	10.439	1.827±0.385	sm
10	1.344±0.136	3.034±0.374	4.387±0.488	6.484	2.267±0.193	sm
11	1.184±0.190	2.669±0.227	3.853±0.347	5.665	2.288±0.319	sm
12	1.065±0.098	2.528±0.219	3.593±0.297	5.284	2.386±0.158	sm
13	0.956±0.106	2.222±0.173	3.178±0.236	4.381	2.455±0.250	sm

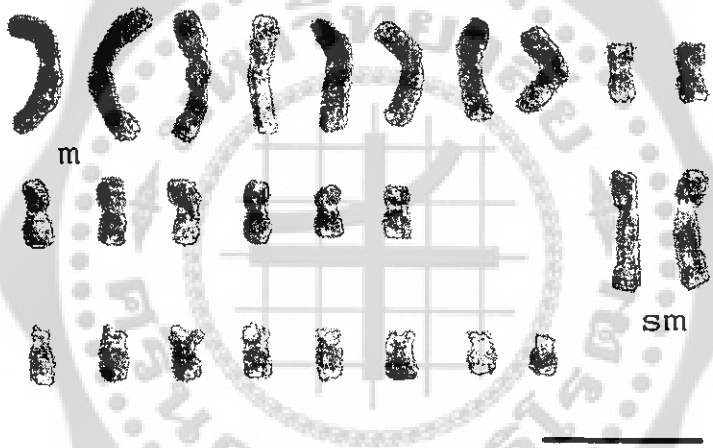
หมายเหตุ

m = metacentric chromosome

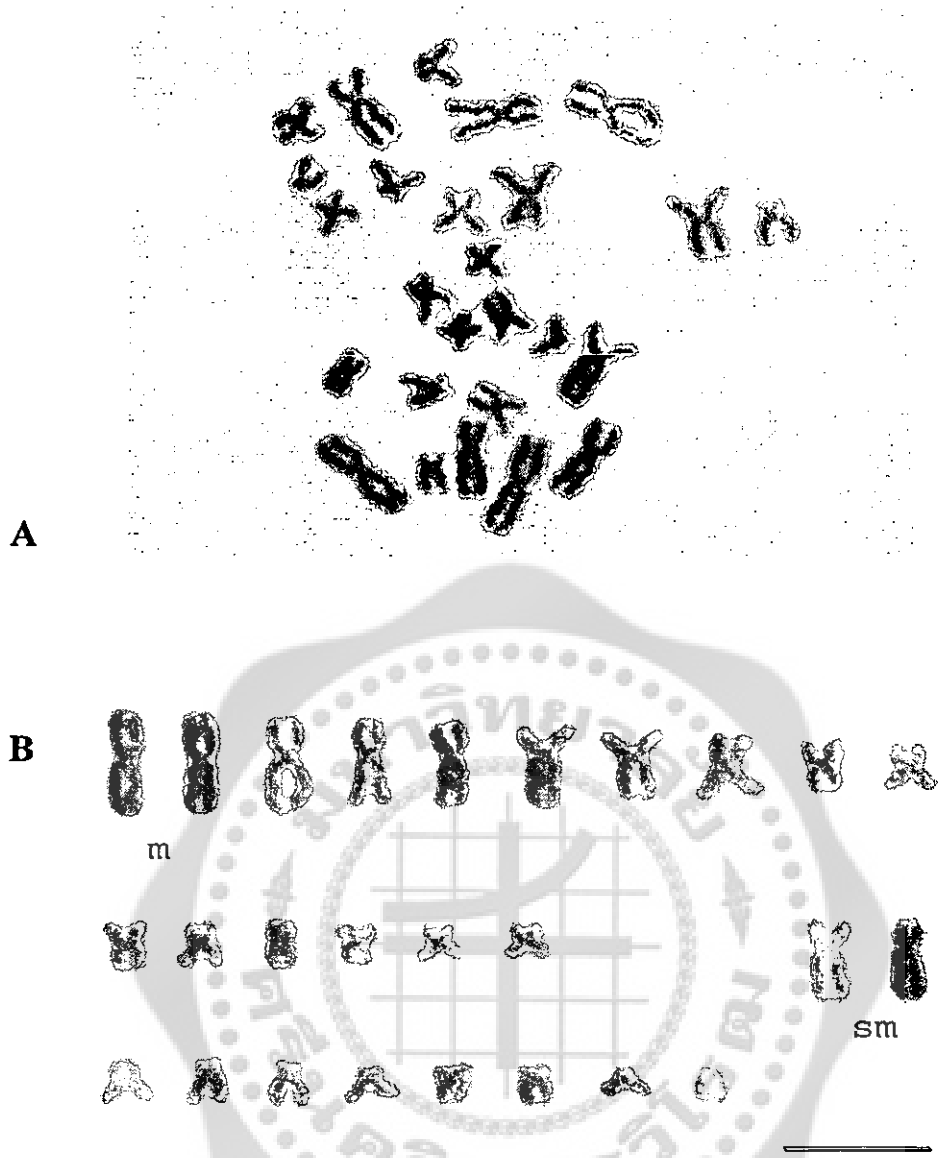
sm = submetacentric chromosome

A

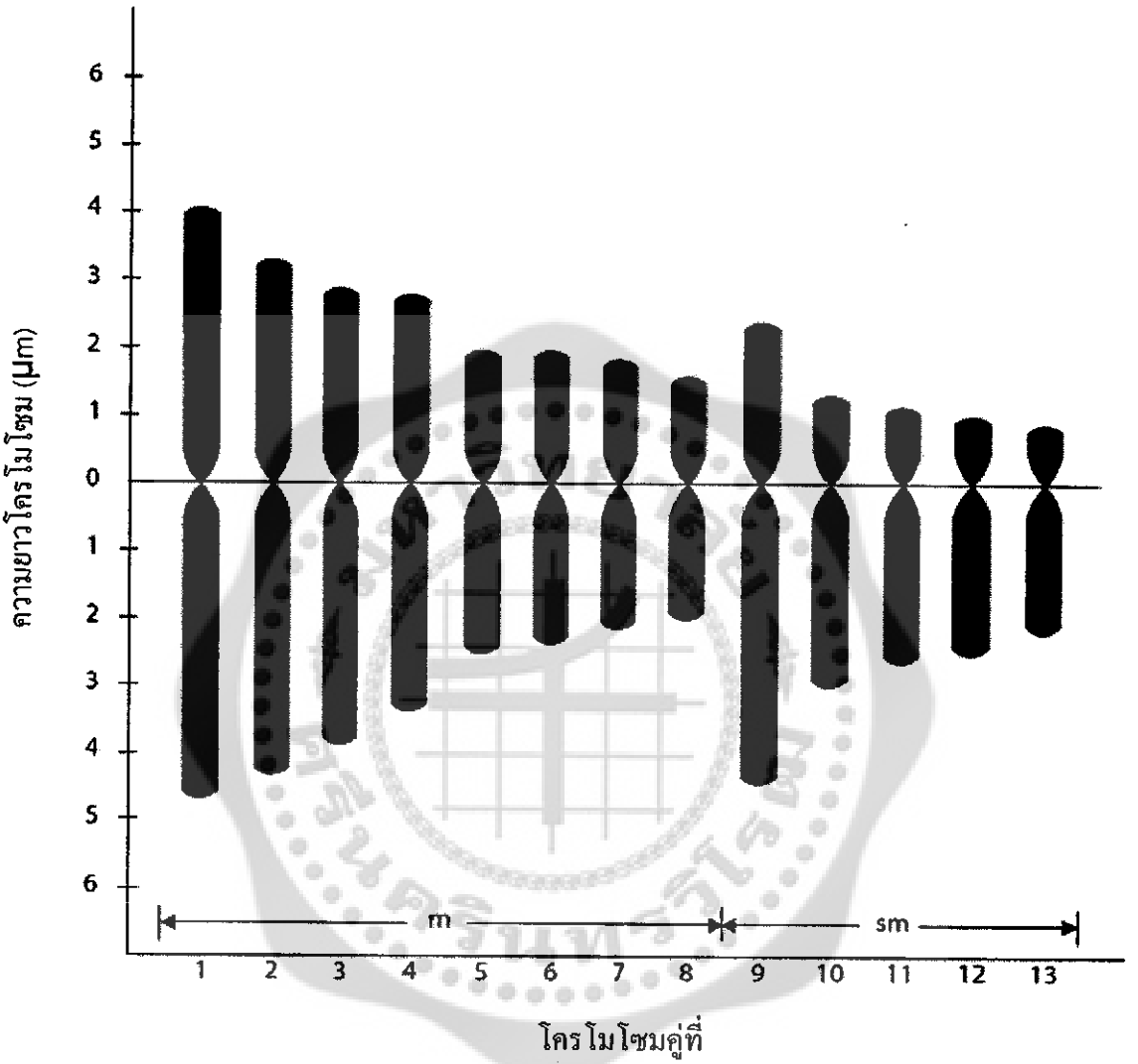
B



ภาพประกอบ 7 ภาพถ่ายการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสในระยะเมทาเฟสของกบหลังไพล *Rana lateralis* เพศผู้ (A) และคาริโอไทป์ (B) scale bar = 10 μm



ภาพประกอบ 8 ภาพถ่ายการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสในระยะเมทาเฟสของกบหลังไพล *Rana lateralis* เพศเมีย (A) และคาริโอไทป์ (B) scale bar = 10 μm



ภาพประกอบ 9 อิดิโอแกรมของกบหลังไพล *Rana lateralis* เรียงลำดับตามค่าเฉลี่ยความยาวแขนแบบสัมบูรณ์ อัตราส่วนระหว่างแขนยาวต่อแขนสั้นของคู่โครโมโซมหรือโครโมโซมคู่เหมือนจำนวน 5 เซลล์

ตาราง 8 ค่าเฉลี่ยความยาวแขนสั้น (SL) ความยาวแขนยาว (LL) ความยาวทั้งแขนหรือความยาวสัมบูรณ์ (total length หรือ absolute length หรือ TL) ความยาวสัมพัทธ์ (relative length หรือ RL) อัตราส่วนระหว่างแขนยาวต่อแขนสั้น (LL/SL) และชนิดของโครโมโซมคู่เหมือน (CT) ในกบหนอง *Fejervarya limnocharis* จากเซลล์ตับจำนวน 5 เซลล์

โครโมโซมคู่ที่	SL (µm) เฉลี่ย ± SD	LL (µm) เฉลี่ย ± SD	TL (µm) เฉลี่ย ± SD	RL เฉลี่ย (%)	LL/SL(µm) เฉลี่ย ± SD	CT
1	4.757±0.470	5.103±0.693	9.860±1.160	13.948	1.071±0.045	m
2	3.154±0.578	4.715±0.801	7.869±1.252	11.175	1.444±0.099	m
3	3.298±0.457	3.973±0.736	7.271±1.177	10.318	1.211±0.105	m
4	2.863±0.429	3.462±0.831	6.325±1.156	8.967	1.212±0.228	m
5	2.076±0.249	2.619±0.304	4.692±0.533	6.697	1.274±0.073	m
6	1.916±0.277	2.336±0.354	4.252±0.554	6.054	1.228±0.173	m
7	1.777±0.307	2.152±0.245	3.929±0.521	5.594	1.236±0.130	m
8	1.565±0.253	1.976±0.214	3.528±0.416	5.030	1.276±0.137	m
9	1.479±0.270	1.711±0.194	3.190±0.434	4.544	1.189±0.163	m
10	2.349±0.341	4.692±0.822	7.246±1.043	10.184	2.166±0.235	sm
11	1.387±0.213	2.978±0.407	4.366±0.596	6.268	2.199±0.221	sm
12	1.130±0.174	2.483±0.343	3.612±0.435	5.154	2.262±0.378	sm
13	0.893±0.186	3.296±0.491	4.189±0.646	6.152	3.836±0.602	st

หมายเหตุ

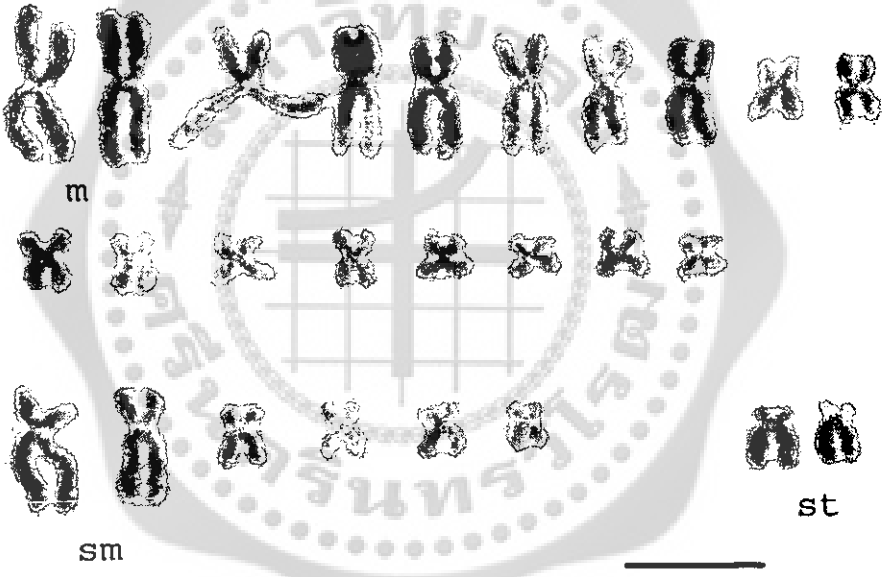
m = metacentric chromosome

sm = submetacentric chromosome

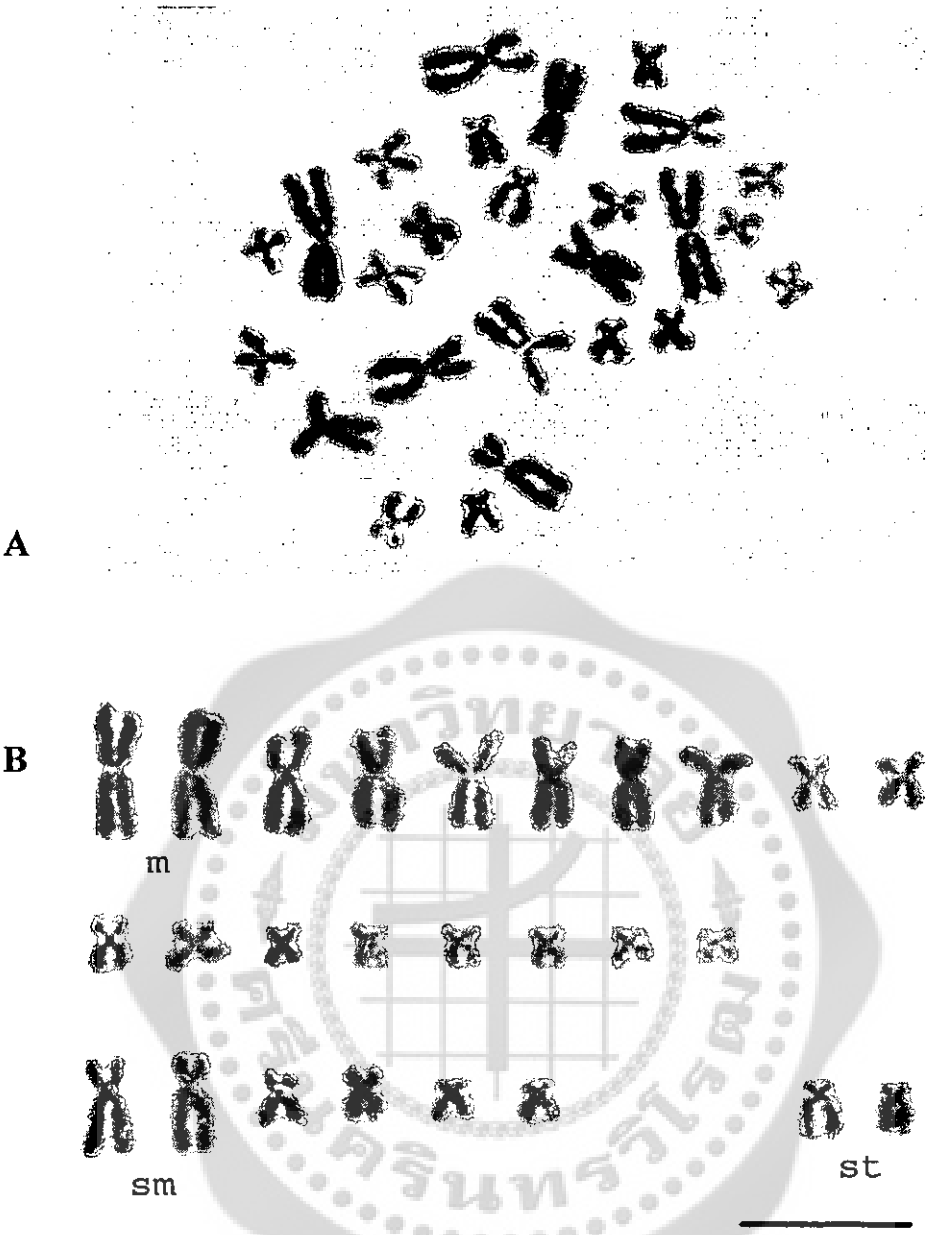
st = subtelocentric chromosome

A

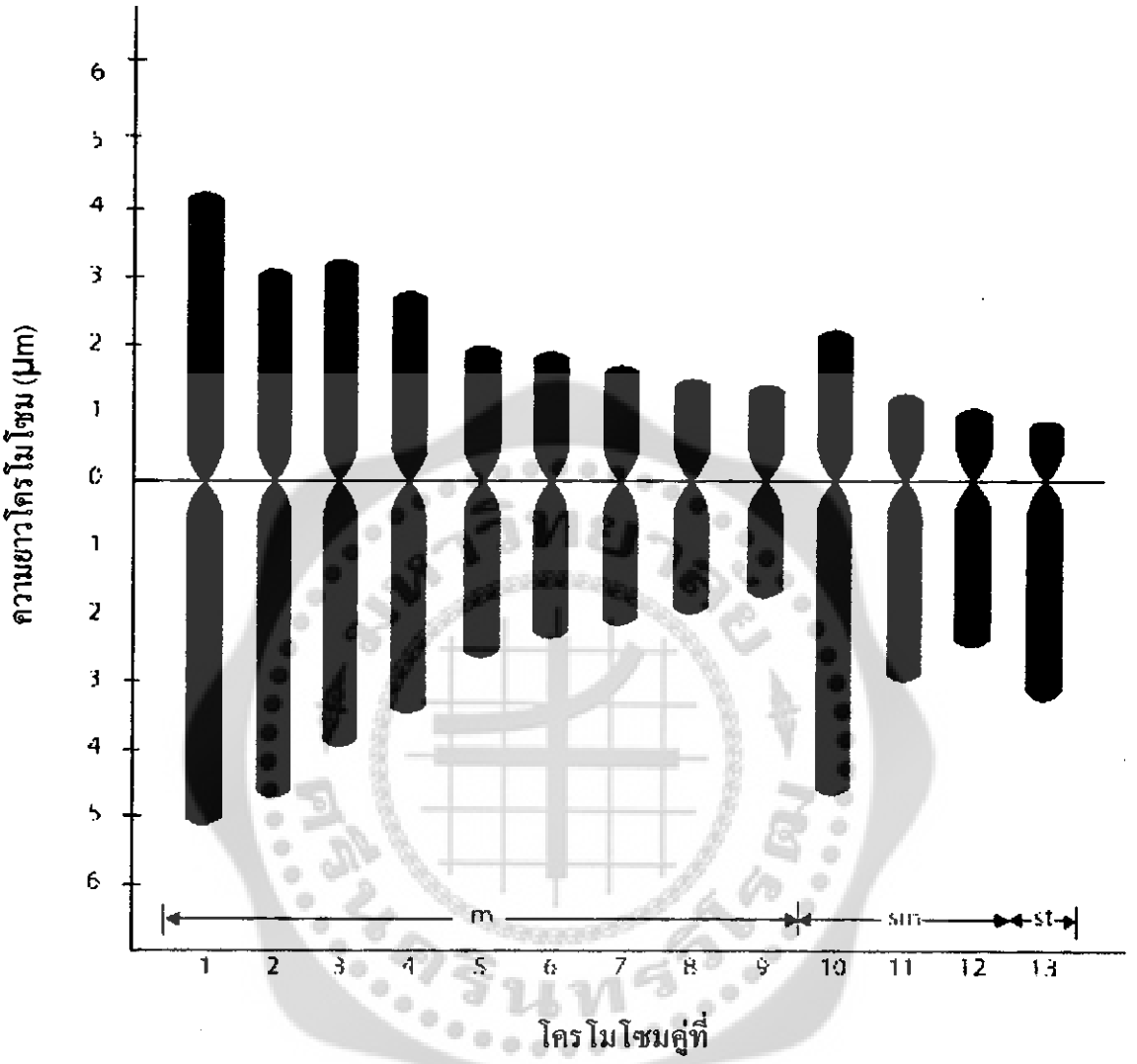
B



ภาพประกอบ 10 ภาพถ่ายการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสในระยะเมทาเฟสของกบหนอง *Fejervarya limnocharis* เพศผู้ (A) และคาริโอไทป์ (B) scale bar = 10 μm



ภาพประกอบ 11 ภาพถ่ายการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสในระยะเมทาเฟสของกบหนอง *Fejervarya limnocharis* เพศเมีย(A) และคาริโอไทป์(B) scale bar = 10 μm



ภาพประกอบ 12 อิดิโอแกรมของกบหนอง *Fejervarya limnocharis* เรียงลำดับตามค่าเฉลี่ยความยาวแขนแบบสัมบูรณ์ อัตราส่วนระหว่างแขนยาวต่อแขนสั้นของคู่โครโมโซมหรือโครโมโซมคู่เหมือนจำนวน 5 เซลล์

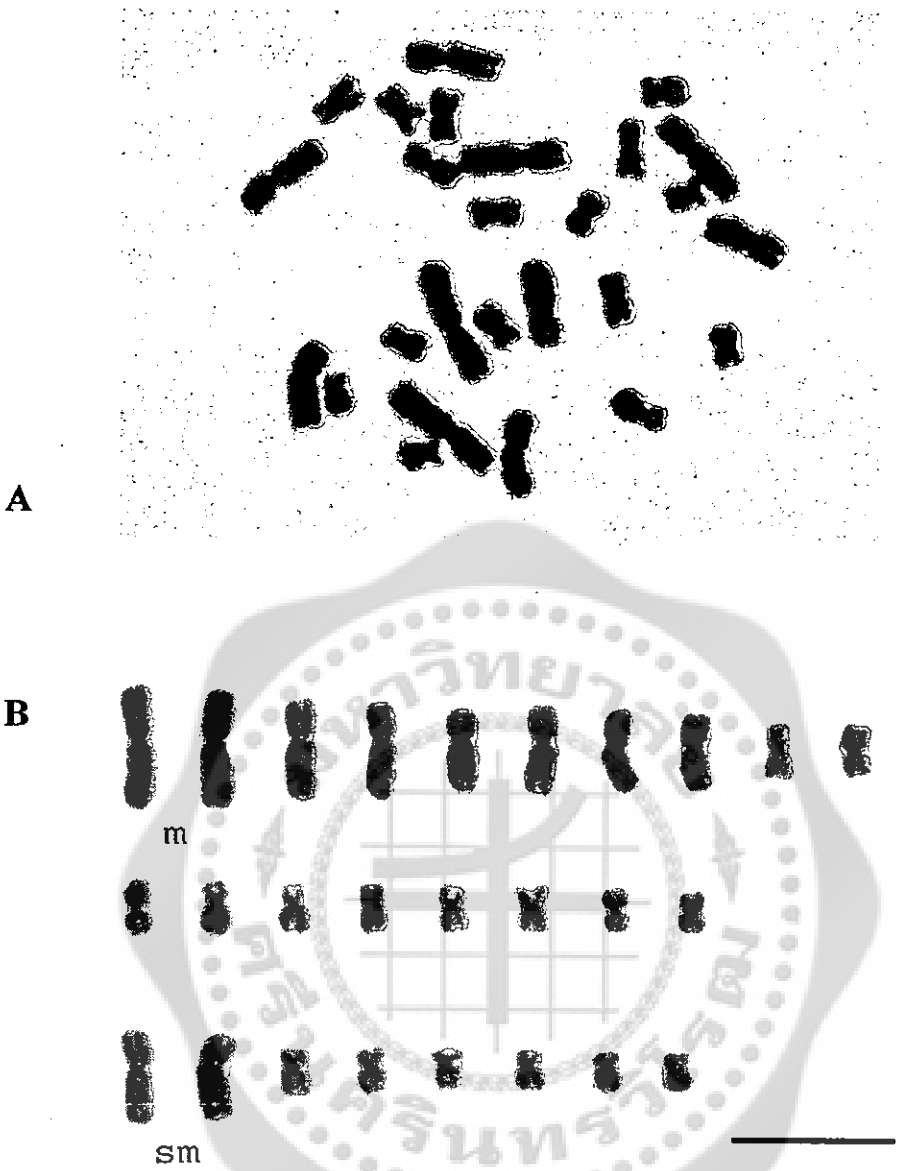
ตาราง 9 ค่าเฉลี่ยความยาวแขนสั้น (SL) ความยาวแขนยาว (LL) ความยาวทั้งแขนหรือความยาวสัมบูรณ์ (total length หรือ absolute length หรือ TL) ความยาวสัมพัทธ์ (relative length หรือ RL) อัตราส่วนระหว่างแขนยาวต่อแขนสั้น (LL/SL) และชนิดของโครโมโซมคู่เหมือน (CT) ในเยื่อดทราย *Occidozyga lima* จากเซลล์ตับจำนวน 5 เซลล์

โครโมโซมคู่ที่	SL (µm) เฉลี่ย ± SD	LL (µm) เฉลี่ย ± SD	TL (µm) เฉลี่ย ± SD	RLเฉลี่ย (%)	LL/SL(µm) เฉลี่ย ± SD	CT
1	3.412±0.304	4.106±0.439	7.718±1.077	13.632	1.206±0.116	m
2	2.746±0.353	3.590±0.218	6.225±0.633	11.009	1.276±0.157	m
3	2.507±0.120	3.260±0.412	5.768±0.502	10.210	1.299±0.134	m
4	2.500±0.257	2.850±0.186	5.349±0.381	9.481	1.101±0.045	m
5	1.706±0.190	2.005±0.159	3.712±0.326	6.572	1.182±0.101	m
6	1.631±0.175	1.874±0.140	3.505±0.305	6.205	1.154±0.073	m
7	1.516±0.154	1.766±0.216	3.292±0.333	5.729	1.167±0.111	m
8	1.435±0.117	1.612±0.192	3.036±0.274	5.375	1.125±0.237	m
9	1.251±0.148	1.520±0.152	2.772±0.261	4.916	1.218±0.094	m
10	1.795±0.116	4.002±0.514	5.699±0.555	10.409	2.141±0.343	sm
11	1.090±0.130	2.226±0.075	3.302±0.113	5.867	2.044±0.216	sm
12	0.991±0.071	2.105±0.072	3.095±0.070	5.504	2.134±0.200	sm
13	0.872±0.102	1.939±0.137	2.811±0.212	5.005	2.240±0.232	sm

หมายเหตุ

m = metacentric chromosome

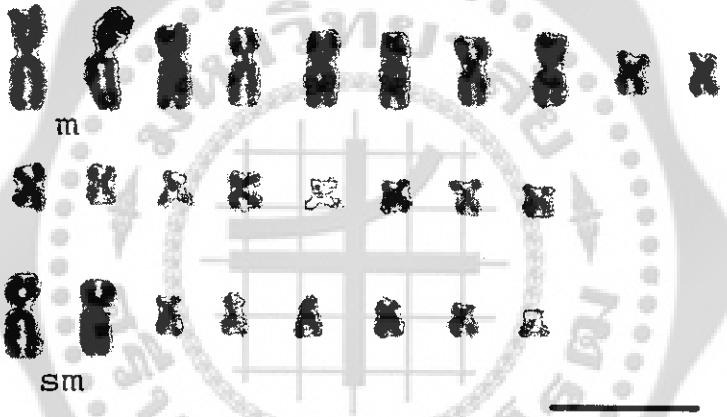
sm = submetacentric chromosome



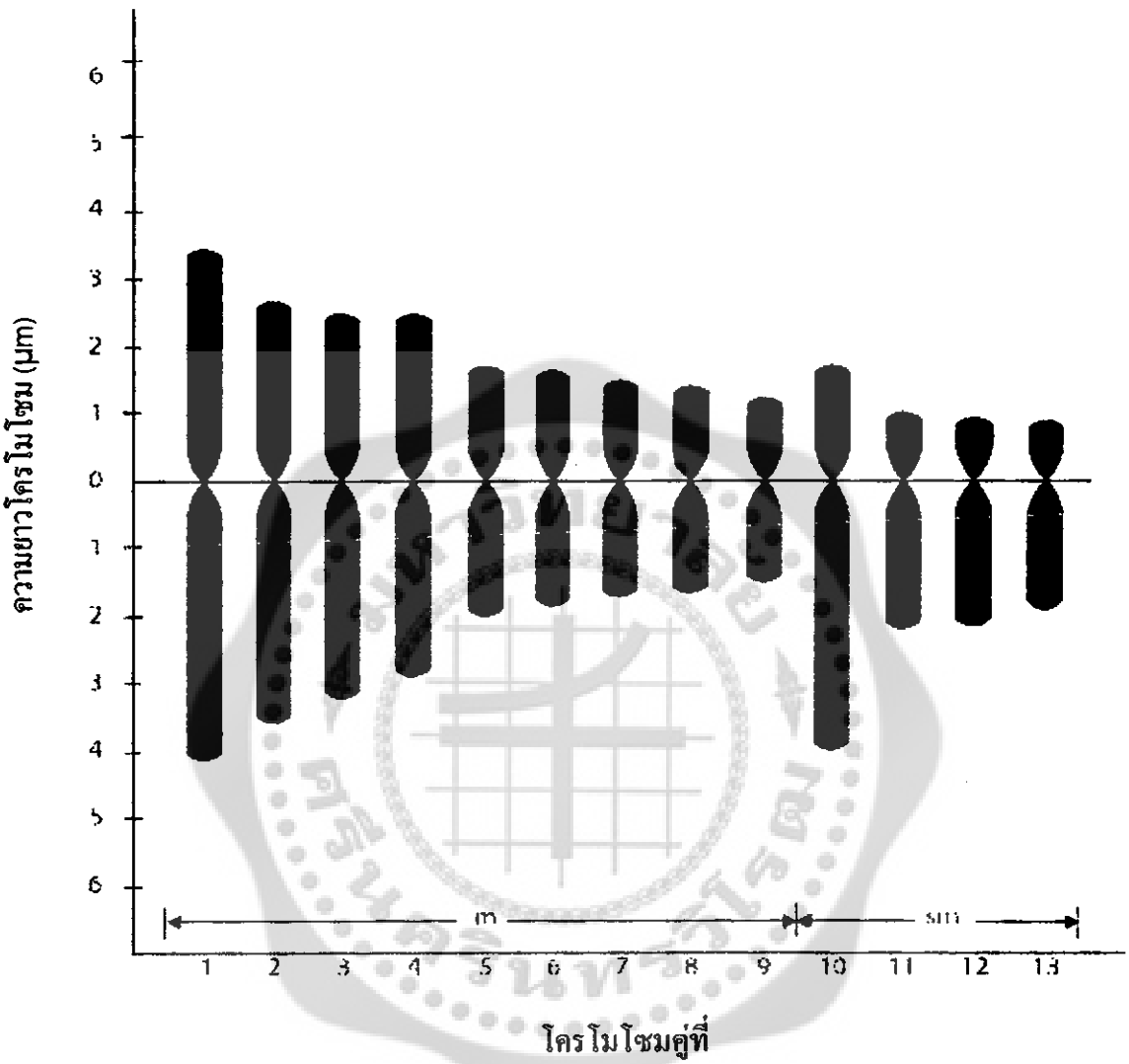
ภาพประกอบ 13 ภาพถ่ายการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสในระยะเมทาเฟสของเขียดทราย *Occidozyga lima* เพศผู้ (A) และคาริโอไทป์ (B) scale bar = 10 μm

A

B



ภาพประกอบ 14 ภาพถ่ายการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสในระยะเมทาเฟสของเขียดทราย *Occidozyga lima* เพศเมีย (A) และคาริโอไทป์ (B) scale bar = 10 μm



ภาพประกอบ 15 อิดิโอแกรมของเขียดทราย *Occidozyga lima* เรียงลำดับตามค่าเฉลี่ยความยาวแขนแบบสัมบูรณ์ อัตราส่วนระหว่างแขนยาวต่อแขนสั้นของคู่โครโมโซมหรือโครโมโซมคู่เหมือนจำนวน 5 เซลล์

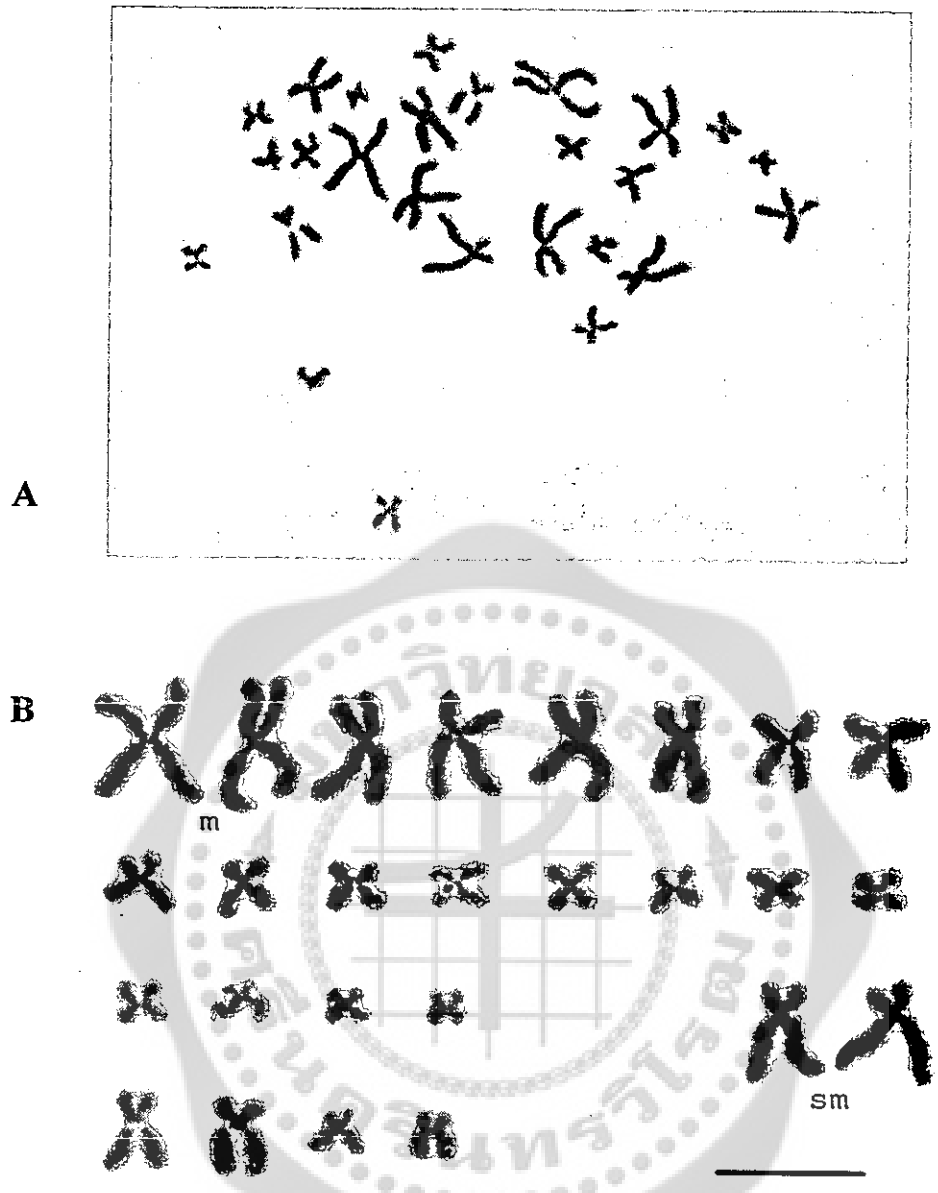
ตาราง 10 ค่าเฉลี่ยความยาวแขนสั้น (SL) ความยาวแขนยาว (LL) ความยาวทั้งแขนหรือความยาวสัมบูรณ์ (total length หรือ absolute length หรือ TL) ความยาวสัมพัทธ์ (relative length หรือ RL) อัตราส่วนระหว่างแขนยาวต่อแขนสั้น (LL/SL) และชนิดของโครโมโซมคู่เหมือน (CT) ในอึ่งลาย *Calluella guttulata* จากเซลล์ตับจำนวน 5 เซลล์

โครโมโซมคู่ที่	SL (µm) เฉลี่ย ± SD	LL (µm) เฉลี่ย ± SD	TL (µm) เฉลี่ย ± SD	RL เฉลี่ย (%)	LL/SL(µm) เฉลี่ย ± SD	CT
1	5.299±1.180	6.010±1.118	11.411±2.200	13.784	1.116±0.060	m
2	4.341±1.468	5.582±1.400	9.923±2.680	11.683	1.318±0.144	m
3	3.690±1.153	4.869±1.189	8.759±2.298	10.736	1.269±0.132	m
4	2.824±0.452	3.773±0.451	6.597±0.900	8.135	1.345±0.077	m
5	2.323±0.403	2.905±0.559	5.227±0.930	6.397	1.251±0.116	m
6	2.189±0.363	2.646±0.333	4.835±0.676	5.939	1.211±0.103	m
7	2.113±0.281	2.433±0.320	4.546±0.575	5.595	1.304±0.325	m
8	1.894±0.204	2.303±0.287	4.196±0.491	5.164	1.214±0.026	m
9	1.745±0.271	2.088±0.272	3.833±0.498	4.712	1.204±0.128	m
10	1.511±0.231	1.854±0.250	3.368±0.465	4.120	1.233±0.088	m
11	2.862±0.344	5.688±0.856	8.370±1.060	10.256	2.131±0.315	sm
12	2.195±0.696	4.397±1.148	6.592±1.840	8.042	2.033±0.149	sm
13	1.382±0.341	3.015±0.567	4.397±0.896	5.346	2.207±0.235	sm

หมายเหตุ

m = metacentric chromosome

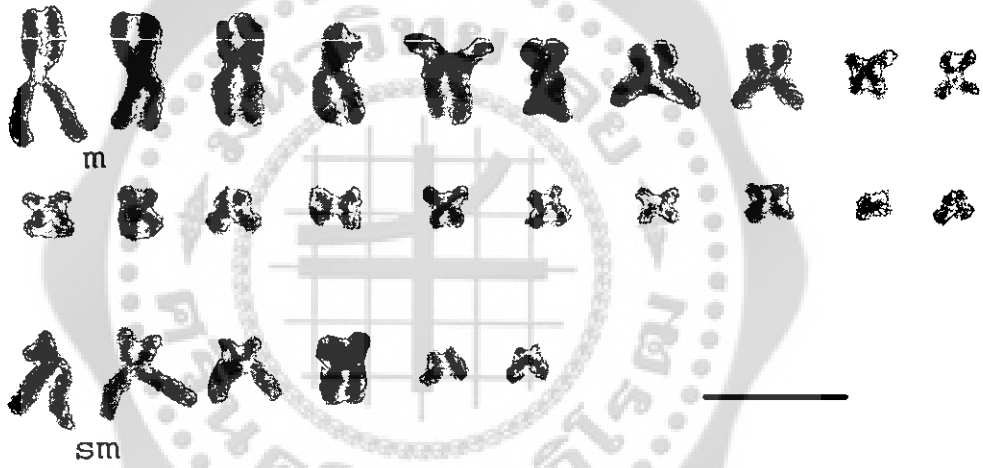
sm = submetacentric chromosome



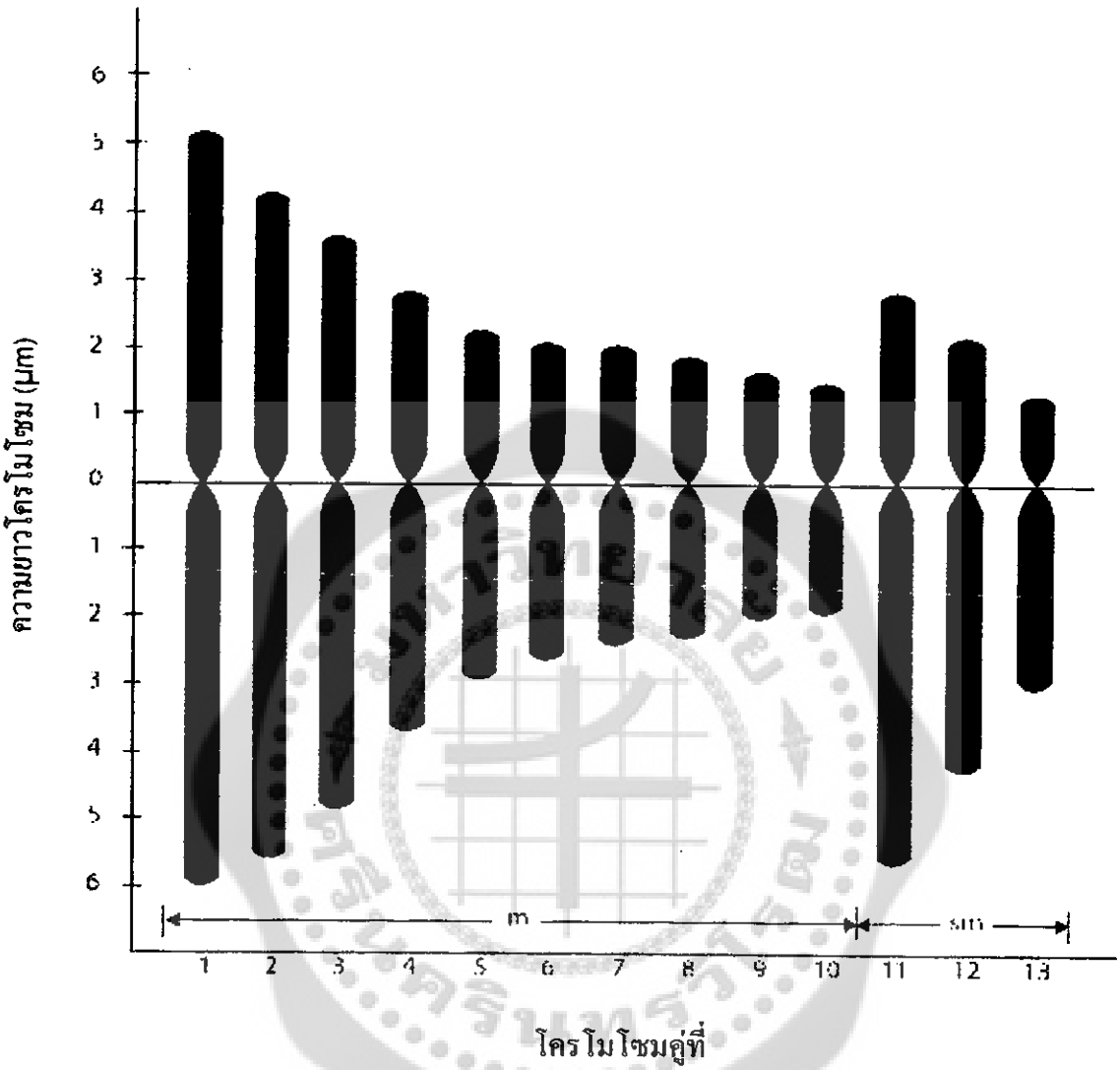
ภาพประกอบ 16 ภาพถ่ายการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสในระยะเมทาเฟสของอึ่งลาย *Calluella guttulata* เพศผู้ (A) และคาริโอไทป์ (B) scale bar = 10 μm

A

B



ภาพประกอบ 17 ภาพถ่ายการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสในระยะเมทาเฟสของอึ่งลาย *Calluella guttulata* เพศเมีย (A) และคาริโอไทป์ (B) scale bar = 10 μm



ภาพประกอบ 18 อิดิโอแกรมของอึ่งลาย *Calluella guttulata* เรียงลำดับตามค่าเฉลี่ยความยาวแขนแบบสัมบูรณ์ อัตราส่วนระหว่างแขนยาวต่อแขนสั้นของคู่โครโมโซม หรือโครโมโซมคู่เหมือนจำนวน 5 เซลล์

สัมบูรณ์ (total length หรือ absolute length หรือ TL) ความยาวสัมพัทธ์ (relative length หรือ RL) อัตราส่วนระหว่างแขนยาวต่อแขนสั้น (LL/SL) และชนิดของโครโมโซมคู่เหมือน (CT) ในจงโครง *Bufo asper* จากเซลล์ตับจำนวน 5 เซลล์

โครโมโซมคู่ที่	SL (µm) เฉลี่ย ± SD	LL (µm) เฉลี่ย ± SD	TL (µm) เฉลี่ย ± SD	RL เฉลี่ย (%)	LL/SL(µm) เฉลี่ย ± SD	CT
1	4.147±0.066	4.679±0.178	8.626±0.235	15.205	1.168±0.074	m
2	3.664±0.092	4.630±0.111	8.294±0.173	14.294	1.277±0.017	m
3	3.156±0.091	3.236±0.131	6.451±0.213	10.596	1.044±0.021	m
4	2.182±0.085	2.859±0.087	5.032±0.173	8.677	1.313±0.042	m
5	1.738±0.092	1.850±0.127	3.588±0.200	6.180	1.066±0.055	m
6	1.439±0.073	1.755±0.064	3.194±0.081	5.473	1.223±0.084	m
7	1.280±0.142	1.616±0.116	2.950±0.201	5.029	1.213±0.131	m
8	1.074±0.142	1.212±0.105	2.285±0.242	3.937	1.135±0.073	m
9	2.346±0.092	4.783±0.133	7.094±0.246	12.221	2.041±0.046	sm
10	1.954±0.155	4.659±0.148	6.163±0.211	11.392	2.399±0.206	sm
11	1.045±0.136	2.675±0.190	3.704±0.311	6.380	2.417±0.207	sm

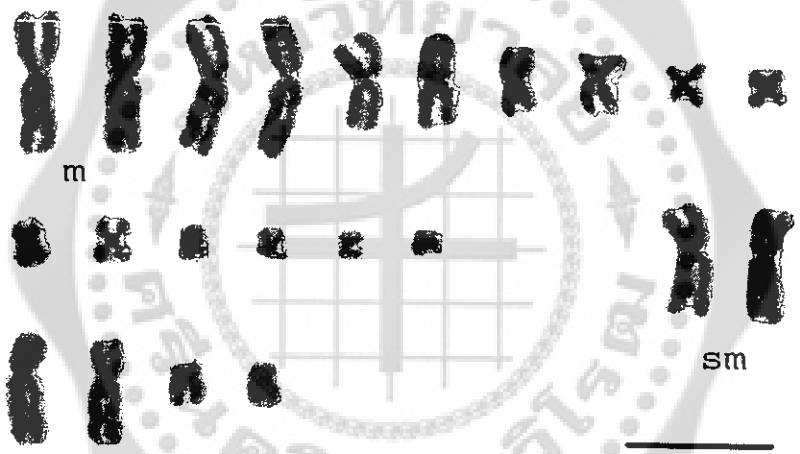
หมายเหตุ

m = metacentric chromosome

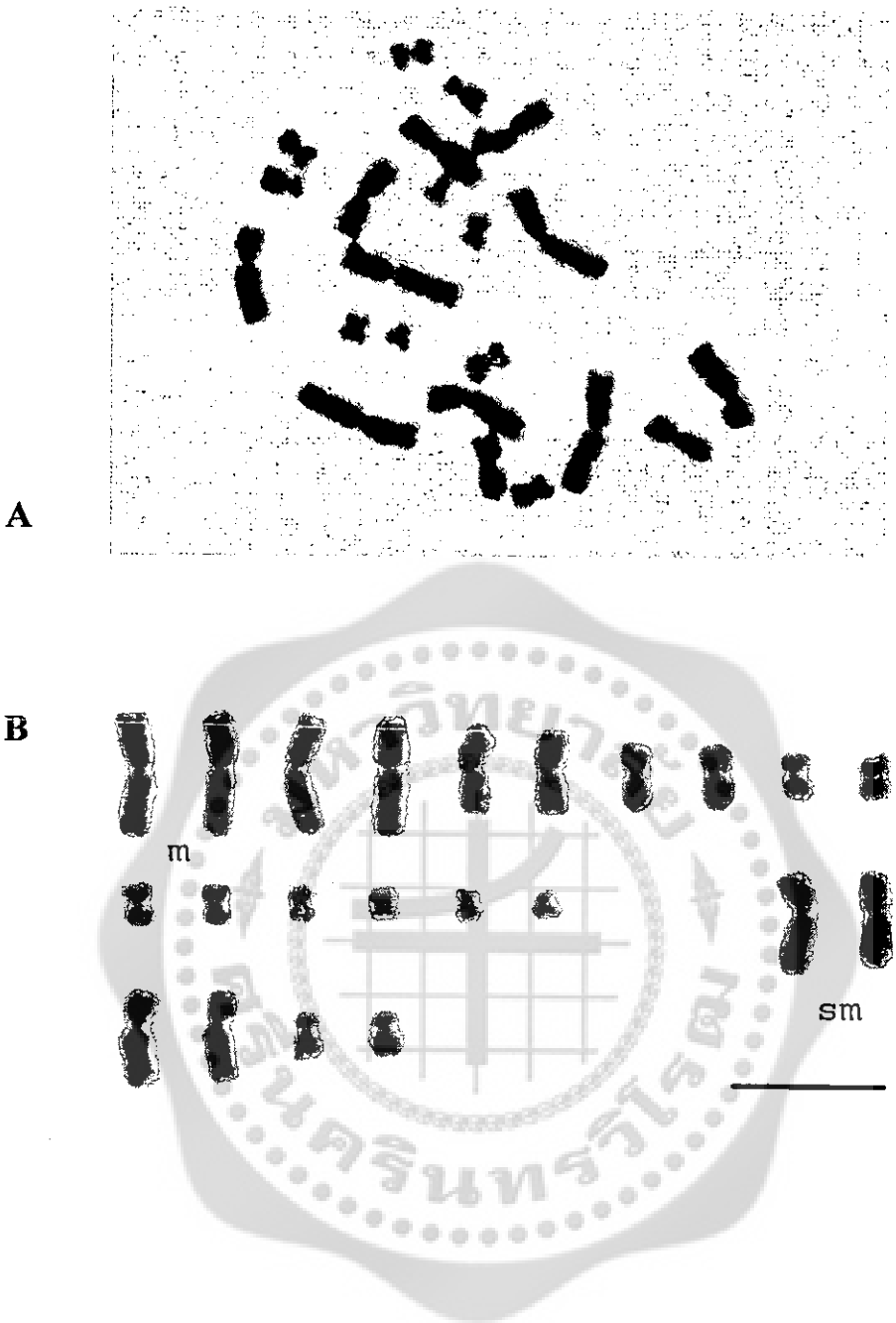
sm = submetacentric chromosome

A

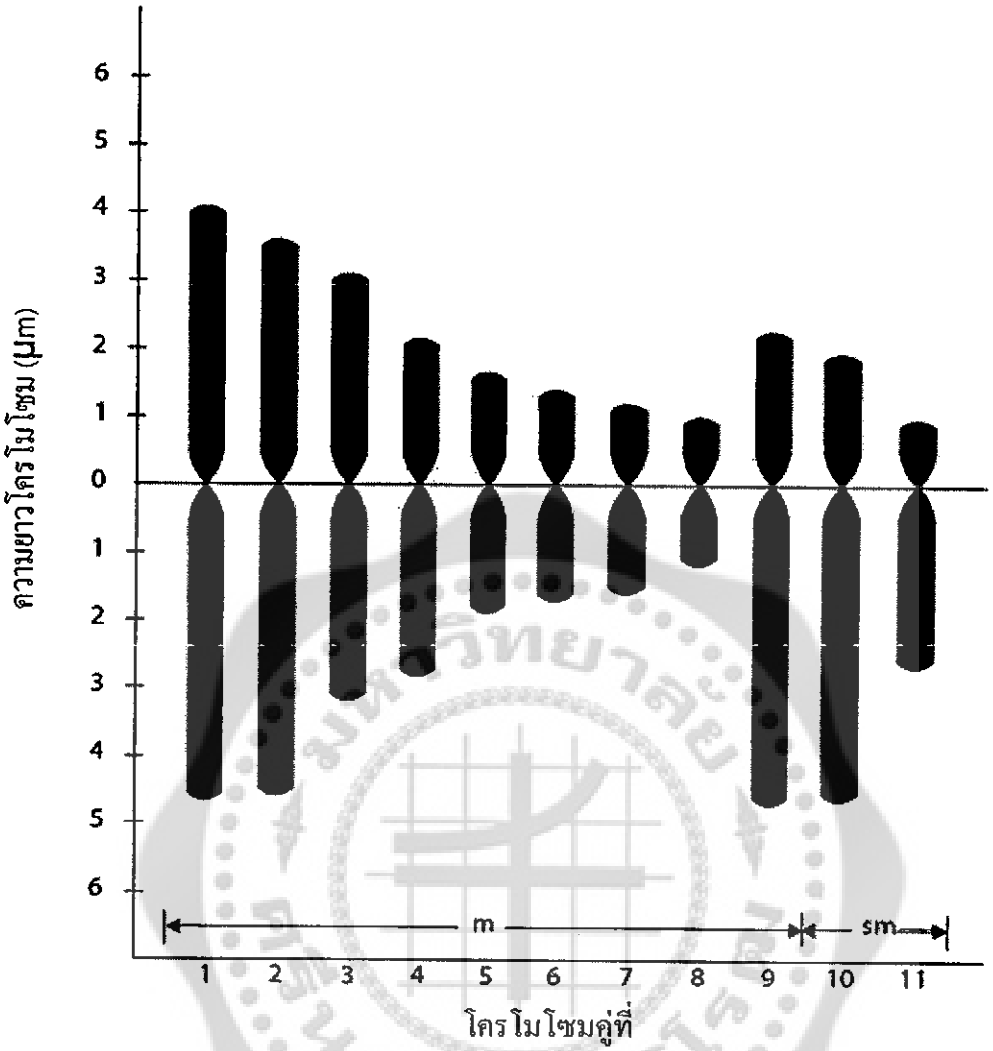
B



ภาพประกอบ 19 ภาพถ่ายการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสในระยะเมทาเฟสของจงโคร่ง *Bufo asper* เพศผู้ (A) และคาริโอไทป์ (B) scale bar = 10 μm



ภาพประกอบ 20 ภาพถ่ายการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสในระยะเมทาเฟสของจงโคร่ง *Bufo asper* เพศเมีย (A) และคาริโอไทป์ (B) scale bar = 10 μm



ภาพประกอบ 21 อิดิโอแกรมของจงโครง่ *Bufo asper* เรียงลำดับตามค่าเฉลี่ยความยาวแขนแบบสัมบูรณ์ อัตราส่วนระหว่างแขนยาวต่อแขนสั้นของคู่โครโมโซมหรือโครโมโซมคู่เหมือนจำนวน 5 เซลล์

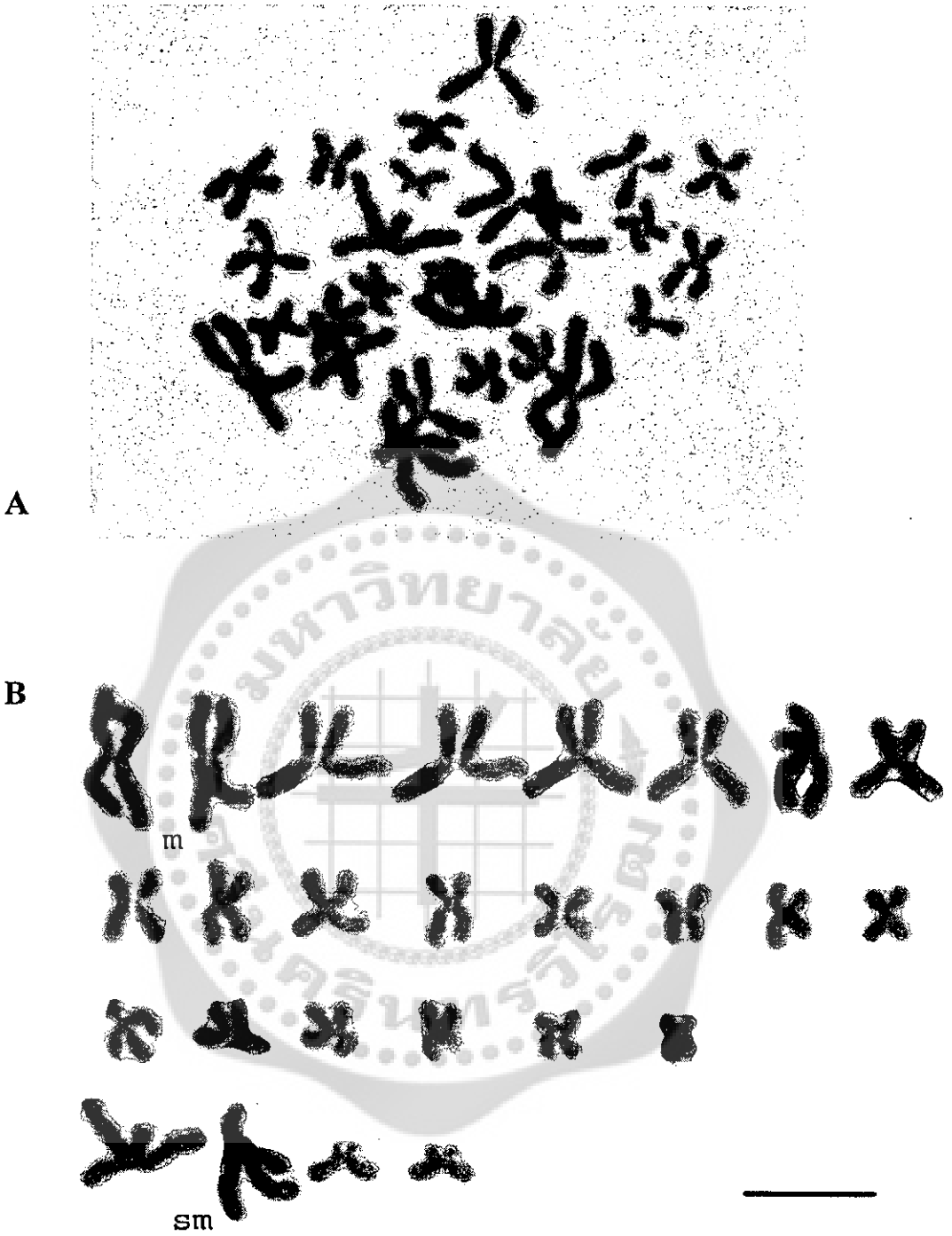
ตาราง 12 ค่าเฉลี่ยความยาวแขนสั้น (SL) ความยาวแขนยาว (LL) ความยาวทั้งแขนหรือความยาวสัมบูรณ์ (total length หรือ absolute length หรือ TL) ความยาวสัมพัทธ์ (relative length หรือ RL) อัตราส่วนระหว่างแขนยาวต่อแขนสั้น (LL/SL) และชนิดของโครโมโซมคู่เหมือน (CT) ในปาดบ้าน *Polypedates leucomystax* จากเซลล์ตับจำนวน 5 เซลล์

โครโมโซมคู่ที่	SL (µm) เฉลี่ย ± SD	LL (µm) เฉลี่ย ±SD	TL (µm) เฉลี่ย ±SD	RL เฉลี่ย (%)	LL/SL(µm) เฉลี่ย ±SD	CT
1	5.469±1.003	6.230±0.735	11.699±1.735	12.984	1.150±0.073	m
2	4.491±0.508	6.025±1.221	10.517±1.670	11.648	1.335±0.159	m
3	4.223±0.726	5.168±0.700	8.966±1.174	10.415	1.231±0.094	m
4	3.596±0.495	4.549±0.726	8.144±1.182	9.014	1.266±0.090	m
5	3.131±0.338	3.629±0.402	6.760±0.768	7.538	1.161±0.097	m
6	2.669±0.332	3.078±0.317	5.747±0.626	6.398	1.158±0.070	m
7	2.398±0.149	2.954±0.416	5.352±0.519	5.966	1.230±0.136	m
8	2.441±0.233	2.709±0.321	4.936±0.294	5.775	1.109±0.055	m
9	2.306±0.261	2.584±0.401	4.867±0.613	5.409	1.128±.088	m
10	2.172±0.329	2.442±0.263	4.614±0.580	5.127	1.131±0.074	m
11	1.954±0.209	2.201±0.248	4.155±0.436	4.630	1.128±0.076	m
12	3.192±0.796	6.237±0.958	9.429±1.748	10.433	1.994±0.238	sm
13	1.323±0.125	2.858±0.332	4.181±0.415	4.685	2.129±0.235	sm

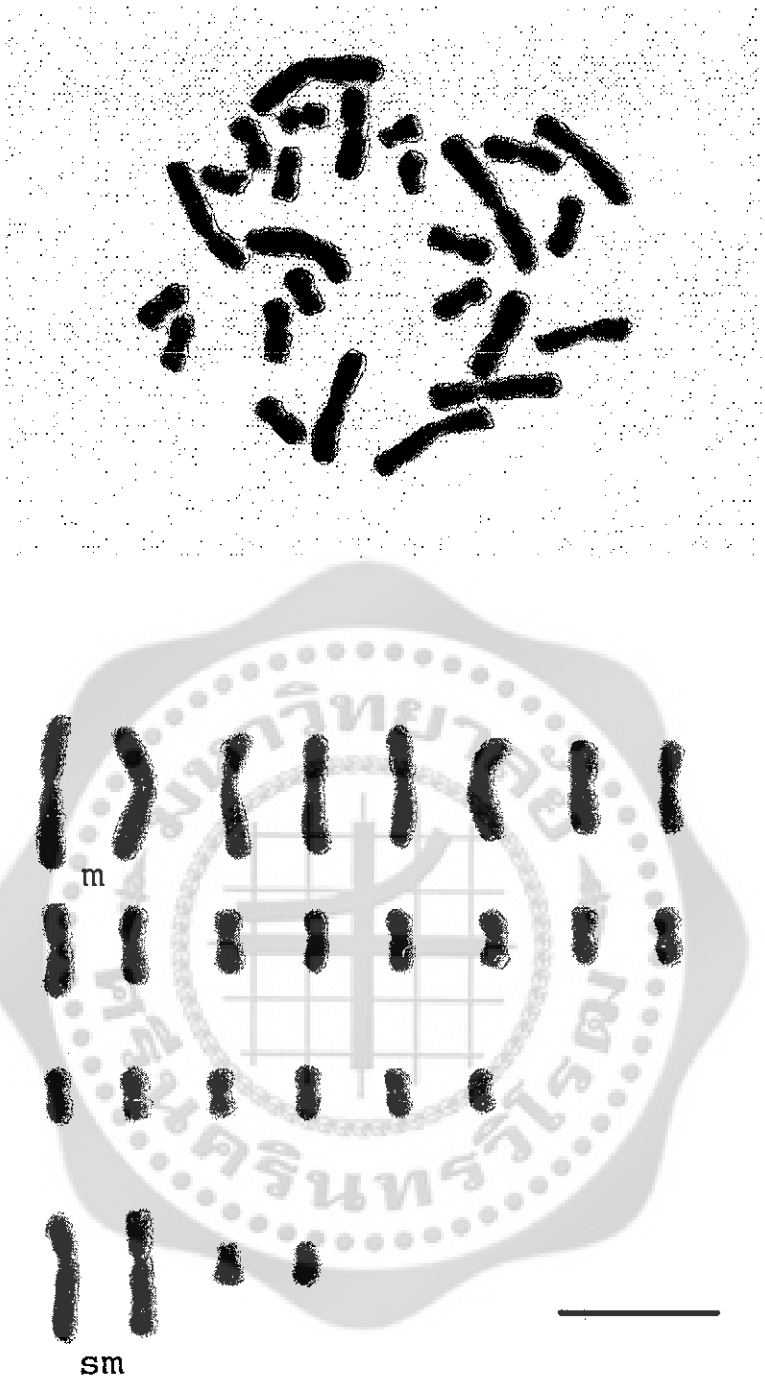
หมายเหตุ

m = metacentric chromosome

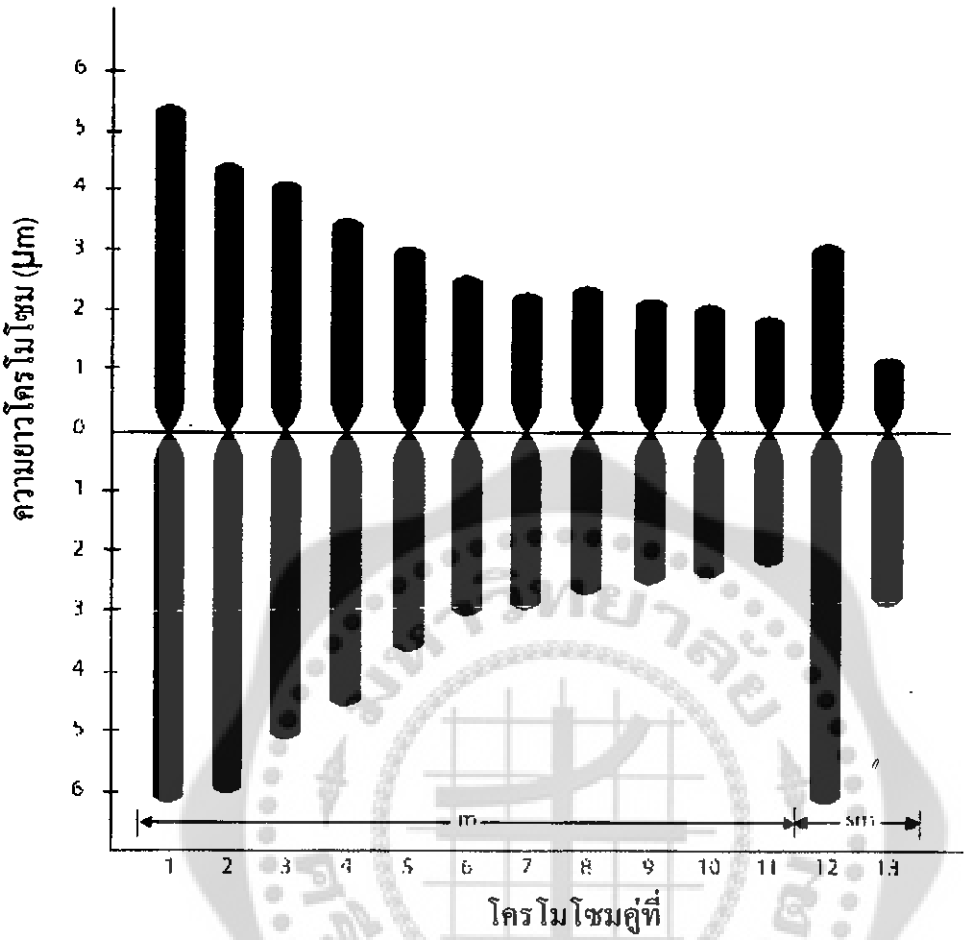
sm = submetacentric chromosome



ภาพประกอบ 22 ภาพถ่ายการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสในระยะเมทาเฟสของปาดบ้าน *Polypedates leucomystax* เพศผู้ (A) และคาริโอไทป์ (B) scale bar = 10 μm



ภาพประกอบ 23 ภาพถ่ายการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสในระยะเมทาเฟสของปาดบ้าน *Polypedates leucomystax* เพศเมีย (A) และคาริโอไทป์ (B) scale bar = 10 μm



ภาพประกอบ 24 อิดิโอแกรมของปาดบ้าน *Polypedates leucomystax* เรียงลำดับตามค่าเฉลี่ยความยาวแขนแบบสัมบูรณ์ อัตราส่วนระหว่างแขนยาวต่อแขนสั้นของคู่โครโมโซม หรือโครโมโซมคู่เหมือนจำนวน 5 เซลล์

ตาราง 13 ค่าความยาวทั้งแขนหรือความยาวสัมบูรณ์ (TL) ความยาวสัมพัทธ์ (RT) และขนาดโครโมโซมของกบนา กบหลังไพล กบหนอง เขียดทราย อึ่งลาย จงโคร่ง และปาดบ้าน

ชนิดของสัตว์	ความยาวสัมบูรณ์(TL) µm		ความยาวสัมพัทธ์ (RL) %		โครโมโซมขนาดใหญ่		โครโมโซมขนาดเล็ก	
	พิสัย(range)	เฉลี่ย±SD	พิสัย (range)	เฉลี่ย	จำนวน (คู่)	คู่ที่	จำนวน (คู่)	คู่ที่
กบนา	2.282-8.397	3.129±0.511	4.544-13.948	7.622	5	1,2,3,11,12	8	4,5,6,7,8,9,10,13
กบหลังไพล	3.178-8.738	5.247±0.660	4.381-12.793	7.669	7	1,2,3,4,5,9,10	6	6,7,8,11,12,13
กบหนอง	3.190-9.860	5.641±0.763	4.544-13.948	7.699	6	1,2,3,4,5,10	7	6,7,8,9,11,12,13
เขียดทราย	2.811-7.718	4.330±0.388	5.005-13.632	7.686	7	1,2,3,4,5,6,10	6	7,8,9,11,12,13
อึ่งลาย	3.365-11.411	6.312±1.016	4.120-13.784	7.136	6	1,2,3,4,11,12	7	5,6,7,8,9,10,13
จงโคร่ง	2.285-8.626	5.257±0.208	3.937-15.205	9.051	6	1,2,3,4,9,10	5	5,6,7,8,11
ปาดบ้าน	4.155-11.699	6.248±0.814	4.630-12.984	7.697	6	1,2,3,4,5,12	7	6,7,8,9,10,11,13

บทที่ 5

สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

สรุปผล

ผลการศึกษาคาริโอไทป์ของเซลล์ตับในกบนา กบหลังไพล กบหนอง เขียดทราย อึ่งลาย จงโคร่ง และปาดบ้านที่พบในประเทศไทยพบว่ามีคาริโอไทป์แตกต่างกันซึ่งสรุปได้ดังนี้

กบนา *Hoplobatrachus rugulosus* มีโครโมโซม 2n=26 คาริโอไทป์ประกอบด้วย 10m+3sm คู่ จำนวนแขนโครโมโซม (NF) = 52 มีแซทเทลไลท์ 1 คู่ตั้งอยู่ที่ปลายแขนข้างสั้นของโครโมโซมแบบเมทาเซนทริกคู่ที่ 10 ขนาดความยาวโครโมโซมแบบสัมบูรณ์ (TL) เฉลี่ย 3.1299±0.511 ไมโครเมตร ความยาวสัมพัทธ์ (RL) เฉลี่ย 7.622 เปอร์เซ็นต์ โครโมโซมขนาดใหญ่มี 5 คู่ ขนาดเล็กมี 8 คู่

กบหลังไพล *Rana lateralis* มีโครโมโซม 2n=26 คาริโอไทป์ประกอบด้วย 8m+5sm คู่ จำนวนแขนโครโมโซม (NF) = 52 ขนาดความยาวโครโมโซมแบบสัมบูรณ์ (TL) เฉลี่ย 5.247±0.660 ไมโครเมตร ความยาวสัมพัทธ์ (RL) เฉลี่ย 7.669 เปอร์เซ็นต์ โครโมโซมขนาดใหญ่มี 7 คู่ ขนาดเล็กมี 6 คู่

กบหนอง *Fejervarya limnocharis* มีโครโมโซม 2n=26 คาริโอไทป์ประกอบด้วย 9m+3sm+1st คู่ จำนวนแขนโครโมโซม (NF) = 52 ขนาดความยาวโครโมโซมแบบสัมบูรณ์ (TL) เฉลี่ย 5.641±0.760 ไมโครเมตร ความยาวสัมพัทธ์ (RL) เฉลี่ย 7.699 เปอร์เซ็นต์ โครโมโซมขนาดใหญ่มี 6 คู่ ขนาดเล็กมี 7 คู่

เขียดทราย *Occidozyga lima* มีโครโมโซม 2n=26 คาริโอไทป์ประกอบด้วย 9m+4sm คู่ จำนวนแขนโครโมโซม (NF) = 52 ขนาดความยาวโครโมโซมแบบสัมบูรณ์ (TL) เฉลี่ย 4.330±0.388 ไมโครเมตร ความยาวสัมพัทธ์ (RL) เฉลี่ย 7.686 เปอร์เซ็นต์ โครโมโซมขนาดใหญ่มี 7 คู่ ขนาดเล็กมี 6 คู่

อึ่งลาย *Calluella guttulata* มีโครโมโซม 2n=26 คาริโอไทป์ประกอบด้วย 10m+3sm คู่ จำนวนแขนโครโมโซม (NF) = 52 ขนาดความยาวโครโมโซมแบบสัมบูรณ์ (TL) เฉลี่ย 6.312±1.016 ไมโครเมตร ความยาวสัมพัทธ์ (RL) เฉลี่ย 7.136 เปอร์เซ็นต์ โครโมโซมขนาดใหญ่มี 6 คู่ ขนาดเล็กมี 7 คู่

จงโคร่ง *Bufo asper* มีโครโมโซม 2n=22 คาริโอไทป์ประกอบด้วย 8m+3sm คู่ จำนวนแขนโครโมโซม (NF) = 44 ขนาดความยาวโครโมโซมแบบสัมบูรณ์ (TL) เฉลี่ย 5.257±0.208 ไมโครเมตร ความยาวสัมพัทธ์ (RL) เฉลี่ย 9.051 เปอร์เซ็นต์ โครโมโซมขนาดใหญ่มี 6 คู่ ขนาดเล็กมี 5 คู่

ปาดบ้าน *Polypedates leucomystax* มีโครโมโซม 2n=26 คาริโอไทป์ประกอบด้วย 11m+2sm คู่จำนวนแขนโครโมโซม (NF) = 52 ขนาดความยาวโครโมโซมแบบสัมบูรณ์ (TL) เฉลี่ย 6.248±0.814 ไมโครเมตร ความยาวสัมพัทธ์ (RL) เฉลี่ย 7.697 เปอร์เซ็นต์ โครโมโซมขนาดใหญ่มี 6 คู่ ขนาดเล็กมี 7 คู่

อภิปรายผล

การเตรียมโครโมโซมเพื่อใช้ในการวิเคราะห์คาริโอไทป์จากเซลล์ของเนื้อเยื่อตับในครั้งนี้ ถือว่าเป็นการนำเซลล์ตับของกบนา กบหลังไพล กบหนอง เขียดทราย อึ่งลาย จงโคร่ง และปาดบ้าน มาใช้ในการศึกษาโครโมโซมครั้งแรกในประเทศไทย ซึ่งถือว่าใช้ได้ผลดีมีจำนวนโครโมโซมไม่แตกต่างจากการศึกษาของคนอื่นที่ผ่านมาโดยใช้เซลล์จากไขกระดูกและการเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์โดยเฉพาะ ข้อที่ดีกว่าคือตับมีขนาดใหญ่ เก็บเกี่ยวเซลล์ได้ง่ายกว่าเซลล์จากไขกระดูกโดยเฉพาะเมื่อสัตว์มีขนาดเล็ก และประหยัดค่าใช้จ่ายกว่าการเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์เฉพาะซึ่งสิ้นเปลืองค่าใช้จ่าย โครโมโซมจากเซลล์ตับมีรูปร่างลักษณะดีได้เซลล์แผ่กระจายดี ไม่เกาะจับกันเป็นก้อน เทคนิคการเตรียมโครโมโซมโดยวิธีการทำให้เซลล์แตก โครโมโซมแผ่กระจายออกจากกันด้วยวิธีเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ถือว่าใช้ได้ผลดีถึงแม้จะมีโครโมโซมของบางกลุ่มเซลล์หลุดกระเด็นออกไปบ้างแต่ก็มีเป็นส่วนน้อยอย่างเช่นในกรณีของ กบนา กบหนอง เขียดทราย อึ่งลาย ปาดบ้าน มีโครโมโซมกระเด็นออกไปจากกลุ่ม 1 โครโมโซมดังตาราง 4 ทำให้กลุ่มเซลล์ดังกล่าวนับโครโมโซม 2n ได้เท่ากับ 25,24,27,25 และ25 ตามลำดับ การนำเซลล์เข้าเครื่องปั่นเหวี่ยง ถ้าความเร็วรอบต่อนาทีสูงมากจนเกินไปหรือใช้เวลาในการปั่นนานจนเกินไป ก็จะทำให้โครโมโซมกระจัดกระจายมากและหลุดกระเด็นไปรวมกับกลุ่มโครโมโซมอื่น ด้วยเหตุนี้ในบางครั้งบางกลุ่มเซลล์จึงอาจมีจำนวนโครโมโซมมากกว่าหรือน้อยกว่าความเป็นจริง ดังนั้นความเร็วต่อรอบในการปั่นเหวี่ยงและเวลาที่ใช้จึงต้องระมัดระวังให้เกิดความเหมาะสม แต่ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิด ขนาดและอายุของตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา เพราะถ้าอายุมากเนื้อเยื่อเหนียวอายุน้อยเนื้อเยื่อนุ่มกว่า แต่ความเร็วรอบต่อนาทีที่ใช้ปั่น 800-1,000 รอบต่อนาที เป็นความเร็วที่เหมาะสมดี การแก้ปัญหาโดยการนับจำนวนเซลล์ให้มากขึ้นแล้วใช้ความถี่สูงสุด(mode) ของโครโมโซมเป็นเกณฑ์บอกจำนวนโครโมโซมแบบดิพลอยด์ การฉีดโคลชิซินความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์เข้าที่บริเวณช่องท้องเพื่อให้ได้จำนวนเซลล์ของการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสเพิ่มมากขึ้นใช้เวลาตั้งแต่ 9-23 ชั่วโมงเวลาที่เหมาะสมที่จะทำให้ได้จำนวนการแบ่งเซลล์เพิ่มมากขึ้นเฉลี่ยแล้วจะอยู่ประมาณ 15 ชั่วโมง ถ้าใช้เวลาน้อยเกินไปจะทำให้โครโมโซมยาวมากแยกออกจากกันได้ยาก ถ้าใช้เวลามากเกินไปโครโมโซมจะหดตัวสั้นมากทำให้ดูรูปร่างลักษณะของโครโมโซมได้ยากขึ้นโดยเฉพาะโครโมโซมที่มีขนาดเล็ก ดังนั้นการวัดขนาดโครโมโซมจึงจำเป็นต้องเลือกกลุ่มเซลล์ที่มี

โครโมโซมยาวพอประมาณและใช้หลาย ๆ กลุ่มเซลล์แล้วหาค่าเฉลี่ย ซึ่งจะทำให้ได้ขนาดโครโมโซมตรงตามธรรมชาติหรือความเป็นจริงมากที่สุด

การศึกษาเกี่ยวกับโครโมโซมและคาริโอไทป์ที่ผ่านมาของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในวงศ์รานิดี (Family Ranidae) หรือวงศ์กบเขียดพบว่า มีจำนวนโครโมโซมกระจายตั้งแต่ 2n=20 ในกบ *Centrolenella antisthenesi* (Schmid et al.,1989) ไปจนถึง 2n=108 ในกบ *Xenopus rumenzoriensis* (Tymoska and Fischberg,1973) แต่ส่วนมากแล้วกบสกุล *Rana* มีโครโมโซม 2n=26

การศึกษาคาริโอไทป์ของกบนา *Hoplobatrachus rugulosus* ในครั้งนี้พบว่ามีโครโมโซมแบบดิพลอยด์ 2n=26 คาริโอไทป์ประกอบด้วย 10m+3sm คู่มีแซทเทลไลท์ 1 คู่ ตั้งอยู่ที่ปลายแขนข้างสั้นของโครโมโซมแบบเมทาเซนทริกคู่ที่ 10 ซึ่งเป็นส่วนปลายของรอยคอดทุติยภูมิ (secondary constriction) ซึ่งเป็นเครื่องหมายโครโมโซม (chromosome marker) สำหรับกบนาชนิดนี้ จำนวนแขนโครโมโซมเท่ากับ 52 จำนวนโครโมโซมที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้มีจำนวนเท่ากับการศึกษาของนิชิโกะ และคณะ (Nishioka et al.,1987) ในกบ *Rana nigromaculatus, R. brevipoda, R. planceyi chosenica, R. plancyi fukiensis, R. lessonae, R. pipines, R. japonica, R. tsuchinensis, R. armuensis, R. temporaria, R. sylvatica* การศึกษาของเบอร์สไตน์ (Birstein,1984) ใน *R. latestei, R. macrocnemius, R. nigromaculata* การศึกษาของถาวรและคณะ (2534;2535) ในเขียดอีโม่ *R. limnocharis* เขียดเหลือง *R. lateralis* การศึกษาของถาวรและประจักษ์ (2542) ในเขียดจิกปกแหลม *R. macrodactyla* การศึกษาของถาวรและคณะ (2540) ในกบอกหนาม *R. lisculispina* การศึกษาของวรวุฒิและคณะ(2544) ในกบบลูฟร็อก *R. catesbeina* การศึกษาของ ธวัชและอัจฉริยา (2548) ในเขียดจิก *R. erythraea* เขียดกาญจนบุรี *R. leptoglossa* และการศึกษาของ วรวุฒิและคณะ (2544)ในกบนา *R. rugulosus* ที่พบในประเทศไทยซึ่งมีโครโมโซม 2n=26 เท่ากันแต่มีคาริโอไทป์ต่างกัน (8m+5sm คู่) จากการศึกษาในครั้งนี้มีโครโมโซมแบบเมทาเซนทริกมากกว่า 2 คู่แต่แบบซับเมทาเซนทริกน้อยกว่า 2 คู่ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะมาตรฐานที่ใช้ในการกำหนดชนิดของโครโมโซมแตกต่างกัน โดยของวรวุฒิ และคณะ (2544) ใช้ค่า Numerical Value of Centromeric position (NCV) และการวิจัยครั้งนี้ใช้ arm ratio ตามวิธีของลีแวนและคณะ (Levan et al., 1964) นอกจากคาริโอไทป์จะแตกต่างกันแล้วตำแหน่งที่อยู่ของรอยคอดทุติยภูมิก็ยังแตกต่างกันด้วย โดยของวรวุฒิและคณะ(2544) รอยคอดทุติยภูมิตั้งอยู่ที่แขนข้างยาวของโครโมโซมคู่ที่ 8 แต่การศึกษาในครั้งนี้รอยคอดทุติยภูมิตั้งอยู่ที่ปลายแขนข้างสั้นของโครโมโซมแบบเมทาเซนทริกคู่ที่ 10 ซึ่งตรงปลายสุดนั้นเป็นที่ตั้งของแซทเทลไลท์ (ดังภาพประกอบ 10)

กบหลังไพล *Rana lateralis* มีโครโมโซม 2n=26 คาริโอไทป์ประกอบด้วย 8m+5sm คู่ NF = 52 ซึ่งเท่ากับของกบนา แต่มีคาริโอไทป์ต่างกันกับกบนาคือมีโครโมโซมแบบเมทาเซนทริกน้อยกว่า 2 คู่ แต่มีซับเมทาเซนทริกมากกว่า 2 คู่ แต่ก็มีจำนวนโครโมโซมสอดคล้องกับ *Rana* ชนิดอื่น ๆ ตามที่กล่าวมาแล้วข้างต้น

กบหนอง *Fejervarya limnocharis* เป็นกบที่พบได้โดยทั่วไปตามสวนหรือหนองน้ำทั่วประเทศ มีโครโมโซม 2n=26 คาริโอไทป์ประกอบด้วย 9m+3sm คู่ NF = 52 ซึ่งมีโครโมโซมเท่ากับของกบนาและกบหลังไพล จำนวนแขนโครโมโซม 52 เท่ากัน และมีคาริโอไทป์ต่างกันเพียงเล็กน้อยผลการศึกษาไม่พบโครโมโซมเพศ และไม่มีเครื่องหมายโครโมโซม (chromosome marker) โดยเฉพาะแต่อย่างใด สำหรับจำนวนโครโมโซมที่ได้สอดคล้องกับสกุลกบเขียดชนิดอื่น ๆ ดังกล่าวมาแล้วข้างต้น

เขียดทราย *Occidozyga lima* มีโครโมโซม 2n=26 คาริโอไทป์ประกอบด้วย 9m+4sm คู่ NF = 52 ซึ่งมีจำนวนโครโมโซมเท่ากับ กบนา กบหลังไพลและกบหนอง และมีจำนวนแขนโครโมโซมเท่ากัน มีคาริโอไทป์ต่างจากกบนาและกบหนองเพียงเล็กน้อย มีจำนวนโครโมโซมเท่ากับกบ เขียดชนิดอื่น ๆ เป็นส่วนใหญ่ ทั้งกบนา กบหลังไพล กบหนองและเขียดทรายต่างอยู่ในวงศ์รานิดี (Family Ranidae) เดียวกัน ต่างมีโครโมโซมและจำนวนแขนโครโมโซมเท่ากัน และคาริโอไทป์ต่างกันเพียงเล็กน้อยดังนั้นสัตว์ทั้ง 4 ชนิดนี้จึงน่าจะมีความสัมพันธ์กันอย่างใกล้ชิดกว่าชนิดอื่นที่มีโครโมโซม 2n=24 เช่นในกบทูต (ธวัช และ อัจฉริยา,2548)

อึ่งลาย *Calluella guttulata* จัดอยู่ในวงศ์ไมโครไฮลิดี (Family Microhylidae) มีโครโมโซม 2n=26 คาริโอไทป์ประกอบด้วย 10m+3sm คู่ NF = 52 ไม่พบโครโมโซมเพศ มีโครโมโซมเท่ากับของอึ่งเผ้า *Glyphoglossus molossus* แต่มีคาริโอไทป์ต่างกัน (9m+4sm, NF = 52) ซึ่งมีจำนวนแขนโครโมโซมเท่ากัน (ธวัช และอัจฉริยา, 2548) และมีโครโมโซมต่างจากของอึ่งอ่างบ้าน *Kaloula pulchra* ซึ่งมีโครโมโซม 2n=28 คาริโอไทป์ประกอบด้วย 9m+3sm+2st คู่ NF = 56 (ธวัช, 2546) และอึ่งก้นขีด *Kaloula mediolineata* ซึ่งมีโครโมโซม 2n=28 โดยที่อึ่งเหล่านี้ต่างก็อยู่ในวงศ์เดียวกัน

จงโคร่ง *Bufo asper* มีโครโมโซม 2n=22 คาริโอไทป์ประกอบด้วย 8m+3sm คู่ NF = 44 ผลการศึกษามีโครโมโซมเท่ากับของคางคกบ้าน *B. melanostictus* และคาริโอไทป์เหมือนกันทุกประการ (ธวัช, 2546) และมีโครโมโซมเท่ากับจงโคร่ง *Bufo asper* คางคกหัวราบ *B. macrotis* และคางคกแคระ *B. parvus* (วรวุฒิ และคณะ, 2544) นอกจากนี้ยังมีโครโมโซมเท่ากับการศึกษาของอุลเลริช (Ullerich, 1966) ในคางคก *Bufo bufo* , *B. viridis*, *B.viridis* x *B. bufo* และ *B. calamita* การศึกษาของชมิด (Schmid, 1978a) ในคางคก *Bufo bufo, B. calamita, B. parvus, B. viridis, B. anuricamus, B. boreas, B. campactilis, B. fowleri, B. punctatus, B. borrestris, B. valliceps, B. arenarum, B. marinus, B. mouritaricus* ขณะเดียวกันจำนวนโครโมโซมดังกล่าวต่างจากของคางคก *B. gamani, B. poweri* และ *B. regularis* ซึ่งมีโครโมโซม 2n=20 จากการศึกษาของโบการ์ท (Bogart, 1966) ในคางคก *B. regularis* ของประเทศอียิปต์ เคนยา แอฟริกาเหนือ ไนจีเรีย โครีเซีย พบว่ามีโครโมโซม 2n=20 และเขาได้อธิบายว่า คางคกที่มีโครโมโซม 2n=20 ที่มีถิ่นกำเนิดอยู่ในทวีปแอฟริกาเป็นบรรพบุรุษของพวกที่มีโครโมโซม 2n=22 ดังนั้นพวกที่มีโครโมโซม 2n=22 จึงเป็นพวกที่มีโครโมโซมเปลี่ยนแปลงไปแล้ว และแพร่กระจายไปยังแหล่งต่าง ๆ ของโลก ถึงแม้จะเป็นคางคกใน

วงศ์บูโฟนิดี (Family Bufonidae) เดียวกันแต่ต่างชนิดกันและต่างถิ่นกำเนิดกันก็มีจำนวนโครโมโซมและคาริโอไทป์แตกต่างกัน

ปาดบ้าน *Polypedates leucomystax* จัดอยู่ในวงศ์ราโคฟอริดี (Family Rhacophoridae) มีโครโมโซม 2n=26 คาริโอไทป์ประกอบด้วย 11m + 2sm คู่ NF = 52 ซึ่งมีจำนวนโครโมโซมเท่ากับของวงศ์กบ เขียด (Family Ranidae) เป็นส่วนใหญ่ และมีจำนวนโครโมโซมสอดคล้องกับการศึกษาของ ถาวร และคณะ (2535) ในปาดบ้าน *Rhacophorus leucomystax* แต่มีคาริโอไทป์แตกต่างกันเล็กน้อย (10m + 3sm) โดยที่การศึกษาในครั้งนี้มีเมทาเซนทริกมากกว่า 1 คู่ แต่ซับเมทาเซนทริกน้อยกว่า 1 คู่ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะมาตราฐานที่ใช้ในการวัดโครโมโซมแตกต่างกันหรืออาจเป็นปาดคนละชนิดกันก็เป็นได้

ข้อเสนอแนะ

ควรจะได้มีการนำเอาเทคนิคและวิธีการต่าง ๆ ไปประยุกต์ใช้กับการศึกษาสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกชนิดอื่น ตลอดจนสัตว์มีกระดูกสันหลังกลุ่มอื่น ๆ ด้วย และควรมีการศึกษาการย้อมแถบสีแบบต่าง ๆ ควบคู่กันไป และควรจะได้มีการนำเอาเทคนิคด้านชีวโมเลกุลมาใช้ศึกษาการจัดจำแนก และศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในประเทศไทย โดยเฉพาะพวกที่มีรูปร่างลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายคลึงกันยากต่อการจัดจำแนกโดยใช้ลักษณะภายนอกแต่เพียงอย่างเดียว

บรรณานุกรม

จารุจินต์ นภีตะภัฏ. 2531. *สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก.* พิมพ์ที่โรงพิมพ์คุรุสภาลาดพร้าว. กรุงเทพฯ.

ถาวร สุภาพรม และ ประภาพร กัลยาประสิทธิ์. 2533. การศึกษาโครโมโซมของอึ่งบ้านและคางคกบ้าน. *บทคัดย่อการสัมมนาวิชาการพันธุศาสตร์ ครั้งที่ 7.* หน้า 107 –109.

ถาวร สุภาพรม, นงเยาว์ ฉาไธสง และนิยดา ห่อนาค. 2534. การศึกษาจำนวนโครโมโซมและคาริโอไทป์ของเขียดจิกและเขียดอีโม่. *การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 17.* ขอนแก่น. B – 060. หน้า 450 – 451.

ถาวร สุภาพรม, วาริณี อรุณมงคลผล และ แก้ว อุดมศิริชาคร. 2535. การศึกษาจำนวนโครโมโซมและคาริโอไทป์ของอึ่งปากขวดและปาดบ้าน.*บทคัดย่อการประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 30.* กรุงเทพฯ. หน้า 278.

ถาวร สุภาพรม, อริยาภรณ์ พงศ์รัตน์ และอุไรวรรณ นิลเพ็ชร. 2535. การศึกษาจำนวนโครโมโซมและคาริโอไทป์ของเขียดเหลืองและอึ่งแว่น. *การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 18.* กรุงเทพฯ. B057. หน้า 400 – 401.

ถาวร สุภาพรม, วาริณี พละสาร และปทุมทิพย์ บุญจูง. 2537. รายงานครั้งแรกเกี่ยวกับจำนวนโครโมโซม และคาริโอไทป์ของ อึ่งขาคำ (*Microhyla pulchra* Hollowell) และ อึ่งก้นขีด (*Kaloula mediolineata* Smith). *การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 20.* กรุงเทพฯ. B – 36. หน้า 326 – 327.

ถาวร สุภาพรม. 2541. การวิเคราะห์โครโมโซมที่ย้อมแถบซี (C- banding) ในอึ่งปากขวดและอึ่งบ้าน. *การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 24.* กรุงเทพฯ. B - 031. หน้า 488 – 489.

ถาวร สุภาพรม และ ประจักษ์ จันทร์ศรี. 2542. การศึกษาจำนวนโครโมโซม และคาริโอไทป์ของเขียดจิกปากแหลม และอึ่งกรายเอวจุด. *การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 25.* กรุงเทพฯ. B – 028. หน้า 614 – 615.

ถาวร สุภาพรม, ขนิษฐา ทุมมานนท์, ประจักษ์ จันทร์ศรี และวิสุทธิ์ ใบไม้. 2543. การศึกษาจำนวนโครโมโซม และคาริโอไทป์ของ กบอกหนาม และเขียดหลังปุ่ม. *การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 26.* กรุงเทพฯ. 19 – VP1152. หน้า 395.

ธวัช ดอนสกุล. 2546. คาริโอไทป์และบริเวณนิวคลีโอลัสออร์แกไนเซอร์ของเซลล์ตับใน กบนา อึ่งยาง และคางคกที่พบในประเทศไทย. *รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.* อัดสำเนา.

ธวัช ดอนสกุล และ อัจฉริยา รังษิรุจิ. 2548. คาริโอไทป์ของเซลล์ตับใน กบภูเขา เขียดบัว เขียดกาญจนบุรี เขียดน้ำนอง อึ่งเผ้า. *เรื่องเต็มการประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ครั้งที่ 43.* สาขาวิทยาศาสตร์. กรุงเทพฯ. หน้า 544 – 551.

ธัญญา จั่นอาจ . 2546 . *สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในเมืองไทย* . บริษัทด่านสุทธาการพิมพ์ จำกัด.

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

วิโรจน์ นุตพันธ์ . 2544 . *สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในประเทศไทย.* สำนักพิมพ์บ้าน และสวน. กรุงเทพฯ.

วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล, ผุสดี ปรียานนท์ และเพลินพิศ โชคชัยชำนาญกิจ. 2540. การศึกษาโครโมโซมของกบบลูฟร็อก. *การประชุมเสนอผลงานวิจัย เฉลิมฉลอง 80 ปี แห่งการสถาปนา จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย.* หน้า 736 – 742.

วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล, เพลินพิศ โชคชัยชำนาญกิจ, ละเอียด คงกุ่ม, พรณรงค์ สิริปิยสิงห์, ผุสดี ปรียานนท์ และมงคล เกษมประเสริฐ. 2544. การศึกษาคาริโอไทป์ของสิ่งมีชีวิต. *รายงานการวิจัยโครงการ BRT.* หน้า 360 – 378.

สมาคมพันธุศาสตร์แห่งประเทศไทย. 2548. *ปทานุกรมพันธุศาสตร์.* บริษัทเท็กซ์แอนเจอร์นัลพับลิเคชั่น จำกัด. กรุงเทพฯ.

สมชาย เลี้ยงพรพรรณ. 2540. *การอนุรักษ์ทรัพยากรสัตว์ป่าในประเทศไทย.* ภาควิชาภูมิศาสตร์ คณะมนุษยศาสตร์และสังคมศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

Birstein, V. J. and A.L. Mazin. 1982. Chromosomal polymorphism of *Bufo bufo* karyotype and C-banding pattern of *B.b. verrucossissima. Genetica* 59:93-98.

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

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

Campbell, N.A. 1996. *Biology*. The Benjamin Cummings Publishing Company, Inc., California.

Cestari, M.M. and P.M. Jr. Galetti. 1992. Chromosome studies of *Serrasalmus spiropleura* (Characidae, Serrasalminae) from the Parana-Paraguay rivers : evolution and cytotaxonomic considerations. *Copeia* 1 : 108 – 112.

De Almeida, C.G., T.U. Grafe, M. Guttenbach and M. schmid. 1990. Karyotype and chromosome banding in reed frog *Hyperodius ommatostictus* (Amphibia, Anura, Hyperoliidae). *Experientia* 46 : 509 – 511.

Denton, T.E. 1973. *Fish chromosome methodology*. Charles C. Thomas Publisher, Illinois.

Formas, J.R. 1978. Systematic problems in the frog specics *Eupsophus roseus* (Anura : Leptodactylidae) detected by karyotypes analysis. *Experientia* 34 : 646.

Formas, J.R. and M.I. Vera. 1983. Karyological relationships among frog of the genus *Alsodes*, with description of the karyotype of *A. vanzolinii* and *A. verrucosus*. *Copeia* 4 : 1104 – 1107.

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

Iturra, P. and A. Velosa. 1989 . Further evidence for early sex chromosome differentiation of anuran species. *Genetica* 78 : 25-31.

Kuramoto , M. 1980 . Karytypes of several frogs from Korea, Taiwan and the Philippines. *Experientia* 36 : 826 – 828.

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

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 bilingua* (Anura, Myobatrachidae). *Genome* 34 : 334-337.

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.

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

Rab, P.K. Yannis, R.Z. Morie and S.E Panos. 1996. Banded karyotype of the cyprinid fishes, *Leuciscus borysthenicus. Ichthyol. Res.* 463-468.

Rudi, A., M. Rosolind, S.G. Bikram and S.E. Panos. 1998. *Chromosome biology*. Kluwer Academic Publishers, Boston.

Schmid, M. 1978 a. Chromosome banding in amphibia I. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in *Bufo* and *Hyla*. *Chromosoma*. 66 : 361-368.

Schmid, M. 1982. Chromosome banding in amphibian VII. Analysis of the structure and variability of NORs in Anura. *Chromosoma* (Birl.). 87 : 327-344.

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

Schmid, M.,C. Steinlein, R. Friedl, C.G. de Almeida, T. Haaf, D.M. Hillies and W.E. Duellman. 1990. Chromosome banding in amphibian XV. Two types of Y chromosomes and heterochromatin hypervariability in *Gastrotheca pseustes* (Anura, Hylidae). *Chromosoma.* 99 : 413 – 423.

Schmid, M.,S. Ohta, C. steinlein and M, Guttenbach. 1993. Chromosome banding in amphibian XIX. Primitive ZW/ZZ sex chromosomes in *Buergaria buergeri* (Anura, Rhacophoridae). *Cytogen. Cell Genet.* 62 : 238-246.

Sharma, A. 1991. *Chromosomes*. Published by Moham Primrani for oxford & IBH Publishing Co. Pvt Ltd., New Delhi.

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

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

Tymoska, J. and M. Fischberg. 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. Chromosome of two species of spade toad (genus *Scaphiopus*) and their hybrid. *Copeia* 2 : 303-306.

ประวัติผู้วิจัย

นายธวัช ดอนสกุล

MR. THAWAT DONSAKUL

ตำแหน่ง รองศาสตราจารย์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2505	สำเร็จการศึกษามัธยมศึกษาปีที่ 6 จากโรงเรียนมัธยมพิบูลวิทยาลัย อำเภอพิบูลมังสาหาร จังหวัดอุบลราชธานี
พ.ศ. 2509	สำเร็จการศึกษาประกาศนียบัตรวิชาการศึกษาชั้นสูง จากวิทยาลัยครูอุบลราชธานี จังหวัดอุบลราชธานี
พ.ศ. 2511	สำเร็จการศึกษาปริญญาการศึกษาบัณฑิต (กศ.บ.) จากวิทยาลัยการศึกษาประสานมิตร
พ.ศ. 2514	สำเร็จการศึกษาปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต (กศ.ม.) สาขาอุดมศึกษาและการฝึกหัดครู วิชาเอกชีววิทยา จากวิทยาลัยวิชาการศึกษาประสานมิตร

ประสบการณ์ในการวิจัย

การศึกษาเกี่ยวกับโครโมโซมและคาริโอไทป์ของปลา สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก สัตว์เลื้อยคลาน และของพืชบางชนิดเป็นต้น

ผลงานวิจัย

1. ธวัช ดอนสกุล และวิเชียร มากตุ่น. 2532 . การศึกษาโครโมโซมของปลาดุกด้าน ปลาดุกอุยที่พบในประเทศไทย. *ในการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 27.* หน้า 421 – 428.
2. ธวัช ดอนสกุล และวิเชียร มากตุ่น. 2533. การศึกษาโครโมโซมของปลากราย ปลาตองลาย และปลาสลาดที่พบในประเทศไทย. *ในการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 28.* หน้า 459 – 466.
3. ธวัช ดอนสกุล และวิเชียร มากตุ่น. 2534. การศึกษาโครโมโซมของปลาช่อน ช่อนงูเห่า ชะโด กระสง และปลาก้างที่พบในประเทศไทย. *ในการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 29.* สาขาประมง. หน้า 561 – 574.
4. ธวัช ดอนสกุล และวิเชียร มากตุ่น. 2535a. การศึกษาโครโมโซมของปลาหลดจุด ปลาหลดภูเขา ปลาหลด และปลากระทิงดำที่พบในประเทศไทย. *ในเรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 30.* สาขาประมง. หน้า 621 – 630.
5. ธวัช ดอนสกุล และวิเชียร มากตุ่น. 2536. การศึกษาโครโมโซมของปลากาแดง ปลาทรงเครื่อง และปลาขี่สก. *ในเรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 31.* สาขาประมง. หน้า 534 – 541.
6. ธวัช ดอนสกุล. 2535b. การศึกษาโครโมโซมของปลาเนื้ออ่อน ปลาแดง และปลาชะโอนของไทย. *ในการประชุมทางวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทยครั้งที่ 18.* B-056: 398 – 399.
7. ธวัช ดอนสกุล และวิเชียร มากตุ่น. 2537. การศึกษาโครโมโซมของปลาไหลในภาคกลาง และภาคตะวันออกเฉียงเหนือของไทย. *ในเรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 32.* สาขาประมง. หน้า 532 – 538.
8. ธวัช ดอนสกุล และวิเชียร มากตุ่น. 2538. คาริโอไทป์ของปลาพรม ปลากระมัง ปลาแบม และปลาชิวควายที่พบในประเทศไทย. *ในเรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 33.* สาขาประมง. หน้า 129 – 138.
9. ธวัช ดอนสกุล. 2539a. การศึกษาโครโมโซมของปลาเค้าดำ ปลาเค้าขาว ปลาดางเบือน และปลาก้างพระร่วงที่พบในประเทศไทย. *ในเรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 34.* สาขาประมง. หน้า 368 – 377.
10. ธวัช ดอนสกุล และวิเชียร มากตุ่น. 2539b. การศึกษาโครโมโซมของปลาเสือพ่นน้ำ และปลาหมอช้างเหยียบที่พบในประเทศไทย. *ในการประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 22.* B-036 : 372 – 373.

11. ธวัช ดอนสกุล. 2540a. การศึกษาโครโมโซมของปลาสร้อยขาว ปลาร่องไม้ตับ ปลาเขยา และปลาชิวใบไผ่ที่พบในประเทศไทย. *ในเรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 35.* สาขาประมง. หน้า 155 – 164.

12. ธวัช ดอนสกุล และวิเชียร มากตุ่น. 2540b. การศึกษาโครโมโซมของปลาบู่ทรายและปลาบู่ที่พบในประเทศไทย. *ในการประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 23.* B-018 : 430 – 431.

13. ธวัช ดอนสกุล. 2541a. การศึกษาโครโมโซมของปลาจิ้มฟันจระเข้ ปลากะทุงเหว ปลาปล้องอ้อยและปลาแป้นที่พบในประเทศไทย. *ในเรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 36.* สาขาประมง. หน้า 1 – 13.

14. ธวัช ดอนสกุล และวิเชียร มากตุ่น. 2541b. การศึกษาโครโมโซมของปลานิล และปลาตะกรับ. *ในการประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 24.* B-032 : 490 – 491.

15. ธวัช ดอนสกุล และวิเชียร มากตุ่น. 2542a. การศึกษาโครโมโซมของปลาบึกและปลาเทพาที่พบในประเทศไทย. *ในเรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 37.* สาขาประมง. หน้า 221 – 226.

16. ธวัช ดอนสกุล และวิเชียร มากตุ่น. 2542b. การศึกษาโครโมโซมของปลากะพงขาวและปลากะพงเกล็ดห่างที่พบในประเทศไทย. *ในการประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 25.* B-002 : 562 – 563.

17. ธวัช ดอนสกุล. 2543a. การศึกษาโครโมโซมของปลาแขยงแถบขาว ปลาแขยงนวล และปลาแขยงธงที่พบในประเทศไทย. *ในเรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 38.* สาขาประมง. หน้า 217 – 226.

18. ธวัช ดอนสกุล และวิเชียร มากตุ่น. 2543b. คาริโอไทป์ของปลาใบไม้และปลายอดม่วงน้ำจืดที่พบในประเทศไทย. *ในการประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 26.* VII:19 – VII - 49.

19. ธวัช ดอนสกุล. 2544a. การศึกษาโครโมโซมของปลากดเหลือง กดดำ กดแก้ว และแขยงใบข้าวที่พบในประเทศไทย. *ในเรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 39.* สาขาประมง. หน้า 208 – 219.

20. ธวัช ดอนสกุล วิเชียร มากตุ่น และอนันต์ พู่พิทยาสถาพร. 2544b. คาริโอไทป์ของปลาร่องไม้ตับ ข้างลาย สร้อยนกเขา และปลาพรมที่พบในประเทศไทย. *ในสัมมนาวิชาการพันธุศาสตร์ ครั้งที่ 12: พันธุศาสตร์ยุคปฏิวัติยีน.* หน้า 218 – 221.

21. ธวัช ดอนสกุล และวิเชียร มากตุ่น. 2544c. คาริโอไทป์ของปลาตะเพียนปากหนวด และปลาปากหนวดที่พบในประเทศไทย. *ในการประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 27.* CD-ROM.

22. ธวัช ดอนสกุล. 2545a. การศึกษาโครโมโซมของปลาแขยงข้างลาย แขยงหิน ดุกมูน ดุกมูนครีบสูงที่พบในประเทศไทย. *ในเรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 40.* สาขาประมง. หน้า 681 – 691.

23. ธวัช ดอนสกุล และวิเชียร มากตุ่น. 2545b. คาริโอไทป์ของปลาตะพาก และปลากาดำ ที่พบในประเทศไทย. *ในการประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 28.* 09-02p : 380.

24. ธวัช ดอนสกุล และวิเชียร มากตุ่น. 2546a. คาริโอไทป์ของปลาดุกลำพัน อุกปากกว้าง และกดโพ ที่พบในประเทศไทย. *ในเรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 41.* สาขาประมง. หน้า 290 – 297.

25. ธวัช ดอนสกุล และวิเชียร มากตุ่น. 2546b. คาริโอไทป์ของปลาบัว หว้าหน้านอ และปลามูดที่พบในประเทศไทย. *ในสัมมนาวิชาการพันธุศาสตร์ครั้งที่ 13 : พันธุศาสตร์กับการพัฒนาที่ยั่งยืน.* หน้า 352 – 355.

26. ธวัช ดอนสกุล วิเชียร มากตุ่น และอัจฉริยา รังษิรุจิ. 2547a. คาริโอไทป์ของปลาเผาะ สังกะวาดเหลือง และสังกะวาดท้องคม ที่พบในประเทศไทย. *ในเรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 42.* สาขาประมง. หน้า 198 – 206.

27. ธวัช ดอนสกุล วิเชียร มากตุ่น และอัจฉริยา รังษิรุจิ. 2547b. คาริโอไทป์ของปลาปักเป้าควาย ปักเป้าดำ ปักเป้าซีลอน และปักเป้าเขียวที่พบในประเทศไทย. *ในการประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 30.* B-0018 : 47.

28. Achariya Rangsiruji, Tapawittra Pongpaw and Thawat Donsakul. 2004. A study of karyotypes and Molecular Phylogenetic of *Allium* (Liliaceae). *In 30th Congress on Science and Technology of Thailand.* B-0019 : 47.

29. Wichian, Magtoon and Thawat Donsakul. 2004. Morphology and Cytogenetic study on arowana fishes in Subfamily Osteoglossinae from Asia, Australia and South America. *In 30th Congress on Science and Technology of Thailand.* B 0081 : 62.

30. ธวัช ดอนสกุล วิเชียร มากตุ่น และอัจฉริยา รังษิรุจิ. 2548a. คาริโอไทป์ของปลาไส้ตัน ตะกาก จาด และปลาน้ำฝาย ที่พบในประเทศไทย. *ในเรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 43.* สาขาประมง. หน้า 344 – 351.

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

32. ธวัช ดอนสกุล และอนันต์ พู่พิทยาสถาพร. 2548b. คาริโอไทป์ของปลาวงศ์ไซไพนิดี 5 ชนิดที่พบในประเทศไทย. *ในการประชุมวิชาการพันธุศาสตร์แห่งชาติ ครั้งที่ 14.* หน้า 217 – 222.

33. ธวัช ดอนสกุล วิเชียร มากตุ่น และอัจฉริยา รังษิรุจิ. 2548b. การศึกษาคาริโอไทป์ของปลาวงศ์ปลาบู่ 7 ชนิดที่พบในประเทศไทย. *ในการประชุมวิชาการพันธุศาสตร์แห่งชาติ ครั้งที่ 14.* หน้า 223 – 228.

34. Thawat Donsakul, Wichian Magtoon and Achariya Rangsiruji. 2005c. Karyotypes of five teleostean fishes from Thailand. *In 31st Congress on Science and Technology of Thailand.* B0074 : 76.

35. Thawat Donsakul, Wichian Magtoon and Achariya Rangsiruji. 2005c. Karyotypes of five species of fishes (plasiew) in Subfamily Rasborinae. *In 31st Congress on Science and Technology of Thailand.* B0235 : 125.

36. Wichian Magtoon, Thawat Donsakul and Yuichi Sasayama. 2005. Effects of Change environmental water on sex of ricefishes *Oryzias minutillus* in the Central and South of Thailand. *In 31st Congress on Science and Technology of Thailand.* B0195 : 113.

37. ธวัช ดอนสกุล วิเชียร มากตุ่น และอัจฉริยา รังษิรุจิ. 2549a. การศึกษาคาริโอไทป์ของปลาหางบ่วง หางเหลือง ไส้ตัน และแก้มช้ำสาละวินที่พบในประเทศไทย. *ในเรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 44.* สาขาประมง. หน้า 469 – 476.

38. ธวัช ดอนสกุล วิเชียร มากตุ่น และอัจฉริยา รังษิรุจิ. 2549a. คาริโอไทป์ของปลาแรด ปลาแรดแม่น้ำโขง และปลาแรดแดง. *ในเรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 44.* สาขาประมง. หน้า 461 – 468.

39. Thawat Donsakul, Wichian Magtoon and Achariya Rangsiruji. 2006. Karyotypes of four cyprinid fishes (family Cyprinidae) from Thailand. *In 32nd Congress on Science and Technology of Thailand.* (STT. 32). B1 B0207 : 99.

40. Wichian Magtoon, Thawat Donsakul and Achariya Rangsiruji. 2006. Karyotypes of two channid fishes (Family Channidae) : *Channa maruloides and C. asiatica. In 32nd Congress on Science and Technology of Thailand.* B1 B0206 : 99.

41. Archariya Rangsiruji, Tapawittra Pongpaw and Thawat Donsakul. 2006. Molecular Phylogenetic relationship of some *Salacca* in Thailand, Malaysia and Indonesia. *In 32nd Congress on Science and Technology of Thailand.* B1 B0205 : 98.

42. ธวัช ดอนสกุล อัจฉริยา รังษิรุจิ และวิเชียร มากตุ่น. 2550a. คาริโอไทป์ของปลาจาด จาด ปาก เปลี่ยน และสร้อยน้ำเงินที่พบในประเทศไทย. *ในเรื่องเต็มการประชุมวิชาการ ครั้งที่ 45 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.* สาขาประมง. หน้า 740 – 748.

43. อัจฉริยา รังษิรุจิ วิเชียร มากตุ่น และธวัช ดอนสกุล. 2550a. คาริโอไทป์ของปลาแค้วัว แค้ ควาย แค้ง และแค้ติดหินสามแถบที่พบในประเทศไทย. *ในการประชุมทางวิชาการครั้งที่ 45 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.* สาขาประมง. หน้า 732 –739.

44. ธวัช ดอนสกุล วิเชียร มากตุ่น และอัจฉริยา รังษิรุจิ. 2550b. คาริโอไทป์ของปลาปึกไก่ ปลาเนื้ออ่อนหนวดยาว และปลานงที่พบในประเทศไทย. *ในการประชุมวิชาการพันธุศาสตร์แห่งชาติ ครั้งที่ 15 : พันธุศาสตร์กับการพัฒนาประเทศตามแนวทางเศรษฐกิจพอเพียง.* หน้า 279 –283.

45. อัจฉริยา รังษิรุจิ วิเชียร มากตุ่น และธวัช ดอนสกุล. 2550b. คาริโอไทป์ของปลาแกง ปลาปึกแดง ปลากะมัง และปลาตามิน (วงศ์ไซไพนิดี) ที่พบในประเทศไทย. *ในการประชุมวิชาการพันธุศาสตร์แห่งชาติ ครั้งที่ 15 : พันธุศาสตร์กับการพัฒนาประเทศตามแนวทางเศรษฐกิจพอเพียง.* หน้า 208 – 212.

46. Thawat Donsakul, Achariya Rangsiruji and Wichian Magtoon. 2005. Karyotypes of seven species of freshwater fishes from Thailand. *In The seven Indo – Pacific Fish Conference. Taipei, Taiwan.* P15 – 11 :190.

47. Magtoon, W. and T. Donsakul. 1987. Karyotype of Pangasiid Cat fishes, *Pangasius sutchi* and *P. larnaudii*, from Thailand. *Jap. J. Ichthyol.* 34 (3) : 396 –398.

48. Achariya Rangsiruji, Hiromu Sagiyama, Yasuyuki Morishima, Yasuke Kemeoke, Thawat Donsakul, Sutheewan Binchai and Punsin Ketudat. 2006. A new record of *Paragonimus* other than *P. westermani* in Southern Thailand. *Southeast Asian J. Trop Med Public Heath.* 37 (Suppl 3) : 57 – 61.

49. อัจฉริยา รังษิรุจิ , ฐปวิตรา ผ่องแผ้ว และธวัช ดอนสกุล. 2549. คาริโอไทป์ของพืชสกุลระกำ (*Salacca*) บางชนิดในประเทศไทยและประเทศอินโดนีเซีย. *วารสารวิทยาศาสตร์ มศว.* 22 (2) : 44 – 61.

50. Thawat Donsakul, W. Magtoon and A. Rangsiruji 2007b. Karyotypes of five teleostean fishes from Thailand. In the 33rd Congress on Science and Technology of Thailand (STT.33). B3 B0065: 94.

ประวัติการรับทุน

พ.ศ. 2531 การศึกษาโครโมโซมของปลาดุกด้าน และปลาดุกอุยที่พบในประเทศไทย ทุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

พ.ศ. 2532 การศึกษาโครโมโซมของปลากระทิง และปลากระทิงไฟที่พบในประเทศไทย ทุนจากงบประมาณแผ่นดินของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ บางเขน

พ.ศ. 2533 การศึกษาโครโมโซมของปลาสลาด ปลากราย และปลาตองลายที่พบในประเทศไทย ทุนจากงบประมาณแผ่นดินของมหาวิทยาลัยศรีนครินทร-วิโรฒ บางเขน

พ.ศ. 2534 การศึกษาโครโมโซมของปลาเนื้ออ่อน ปลาแดงและปลาชะโอนของไทย ทุนจากงบประมาณแผ่นดินของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ บางเขน

พ.ศ. 2534 การศึกษาโครโมโซมของปลาช่อน ช่อนงูเห่า ชะโด กระสง และปลาก้างที่พบในประเทศไทย ทุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

พ.ศ. 2535 การศึกษาโครโมโซมของปลาหลดจุด ปลาหลดภูเขา ปลาหลด และปลากระทิงดำที่พบในประเทศไทยทุนจากงบประมาณแผ่นดินของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ บางเขน

พ.ศ. 2538 การศึกษาโครโมโซมของปลาบึก เทพา และปลาบู่ทรายที่พบในประเทศไทย ทุนจากเงินรายได้ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร

พ.ศ. 2545 คาริโอไทป์ของปลาวงศ์ไซไพรนิดี 15 ชนิดที่พบในประเทศไทย ทุนจากงบประมาณแผ่นดินของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

พ.ศ. 2546 คาริโอไทป์และบริเวณนิวคลีโอลัสออร์แกไนเซอร์ของเซลล์ตับใน กบนาอึ่งยาง และคางคกที่พบในประเทศไทย ทุนจากงบประมาณเงินรายได้ของภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ