

รายงานการวิจัย

การโอโทปและบริเวณนิวคลีโอลัสออร์แกโนเซอร์ของเซลล์ตับ
ในกบนา อีงาย และคางคกที่พบในประเทศไทย

LIVER KARYOTYPES AND NUCLEOLUS ORGANIZER
REGIONS IN *Rana tigerina*, *Kaloula pulchra* AND *Bufo
melanostictus* (AMPHIBIA, ANURA) FROM THAILAND

รองศาสตราจารย์รัช วัฒนกุล

สิงหาคม ๒๕๔๘

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจาก

งบประมาณเงินรายได้ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ปี ๒๕๔๖

บทคัดย่อ

งานวิจัยครั้งนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อศึกษาการโอไทป์และบริเวณนิวคลีโอไทด์สตอร์เกนเซอร์หรือเอ็นโออาร์ของกบนา อีงขาง และคางคกที่พบในประเทศไทย โดยใช้ตัวอย่างชนิดละ 10 ตัวในการเตรียมโครโมโซม โครโมโซมเตรียมจากเซลล์ตับโดยฉีดด้วยโคลชิซิน - แช่ในสารละลายไฮโปโทนิค - โฮโมจีไนส์ - ฟิกเซชัน - แพรกชันเนชัน - ผึ่งตะกอนให้แห้งในอากาศ ย้อมด้วยสีซ้อมกิมซาและซิลเวอร์ไนเตรท ตรวจโครโมโซมและถ่ายภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ผลการวิเคราะห์โครโมโซมพบว่า กบนามีโครโมโซม $2n = 26$ คาร์ิโอไทป์ประกอบด้วย $7m + 5sm + 1st$ คู่ จำนวนแขนโครโมโซม (NF) เท่ากับ 52 NORs มี 1 คู่ ตั้งอยู่บนแขนข้างยาวของโครโมโซมแบบซับเมทาเซนทริกคู่ที่ 5 อีงขางมีโครโมโซม $2n = 28$ คาร์ิโอไทป์ประกอบด้วย $9m + 3sm + 2st$ คู่ NF เท่ากับ 56 NORs มี 3 คู่ 2 คู่ตั้งอยู่บนแขนข้างสั้นของโครโมโซมแบบเมทาเซนทริกคู่ที่ 5 และ 8 กับอีก 1 คู่ ตั้งอยู่ปลายสุดแขนข้างยาวของโครโมโซมแบบซับเทโลเซนทริกคู่ที่ 1 คางคกมีโครโมโซม $2n = 22$ คาร์ิโอไทป์ประกอบด้วย $8m + 3sm$ คู่ NF เท่ากับ 44 NORs มี 1 คู่ ตั้งอยู่ปลายสุดแขนข้างยาวของโครโมโซมแบบเมทาเซนทริกคู่ที่ 8 ข้อมูลด้านเซลล์พันธุศาสตร์นี้สามารถนำไปใช้ศึกษาด้านเซลล์อนุกรมวิธาน และความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของกบ อีงอ่าง และคางคกได้

Abstract

The purpose of this research was to examine karyotypes and nucleolar organizer regions (NORs) in *Rana tigerina*, *Kaloula pulchra* and *Bufo melanostictus* from Thailand. Ten specimens of each species of frogs and toads were used for chromosomal preparations. Methods of chromosomal preparations from liver cells include colchicine – hypotonic – homogenize – fixation – fractionation – air drying – giemsa and silver nitrate staining. Photography of the chromosomes under microscope were carried out. Results of chromosome analyses were as follows: *R. tigerina* had $2n = 26$, $7m + 5sm + 1st$ pairs, $NF = 52$ and 1 pair of NORs located on the long arm of the fifth pair of submetacentric chromosome; *K. pulchra* had $2n = 28$, $9m + 3sm + 2st$ pairs, $NF = 56$ and 3 pairs of NORs (2 pairs located on the short arm of the fifth and the eighth pairs of metacentric chromosome and the other pair situated at the terminal end of the long arm of the first pair of subtelocentric chromosome; *B. melanostictus* had $2n = 22$, $8m + 3sm$ pairs, $NF = 44$ and 1 pair of NORs located on the terminal end of the long arm of the eighth pair of metacentric chromosome. These cytogenetic data obtained could be used for studies of cytotaxonomy and evolutionary relationships of frogs and toads.

ประกาศคุณประการ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินรายได้ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประจำปี 2546 ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงมา ณ ที่นี้ด้วย

รวิช คอนสกุล



สารบัญ

บทที่ 1	หน้า
1. บทนำ	
ภูมิหลัง	1
ความมุ่งหมายของการวิจัย	3
ความสำคัญของการวิจัย	3
ขอบเขตของการวิจัย	3
ประชากรและกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัย	3
นิยามศัพท์เฉพาะ	4
สมมติฐานในการวิจัย	4
2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
ชีววิทยาของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก	5
ลักษณะสำคัญของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในอันดับกบ เขียด	5
ลักษณะสำคัญของวงศ์กบ เขียด (Family Ranidae) กบนา <i>Rana tigerina</i>	6
ลักษณะสำคัญของวงศ์อึ่งอ่าง (Family Microhylidae) อึ่งขาง <i>Kaloula pulchra</i>	6
ลักษณะสำคัญของวงศ์คางคก (Family Bufonidae) คางคก <i>Bufo melanostictus</i>	7
การศึกษาเกี่ยวกับโครโมโซมและคาริโอไทป์	9
การศึกษาเกี่ยวกับบริเวณนิวคลีโอลัสออร์แกไนเซอร์ (nucleolar organizer regions หรือ NORs)	14
3. วิธีดำเนินการวิจัย	17
อุปกรณ์และสารเคมี	17
วิธีดำเนินการ	19
การวินิจฉัยและตรวจสอบชื่อวิทยาศาสตร์ของกบนา อึ่งขาง และคางคก	20
ลักษณะสัณฐานวิทยาบางประการของกบนา อึ่งขาง และคางคก	20
การศึกษาคาร์ิโอไทป์	20
การเตรียมโครโมโซมจากเนื้อเยื่อตับ	20
การถ่ายรูปโครโมโซม	21
การวิเคราะห์โครโมโซม	22
การหาจำนวนโครโมโซม	22

การวัดโครโมโซมและการจัดการโอท็อป	22
การหาจำนวนแขนโครโมโซม	23
การหาขนาดโครโมโซม	23
การสร้างอิดิโอแกรม	23
การหาความยาวสัมพัทธ์ (relative length หรือ RL)	24
การหาบริเวณนิวคลีโอลัสออร์แกไนเซอร์ (nucleolar organizer regions หรือ NORs)	24
การเตรียมสไลด์	24
การถ่ายรูปโครโมโซมที่มี NORs	24
การวิเคราะห์ NORs	25
การสร้างอิดิโอแกรม	25
4. ผลการวิเคราะห์ข้อมูล	26
5. สรุปผล อภิปรายผล ข้อเสนอแนะ	43
สรุปผล	43
อภิปรายผล	43
ข้อเสนอแนะ	48
บรรณานุกรม	49
ประวัติผู้วิจัย	54

บัญชีตาราง

ตาราง		หน้า
1.	จำนวน แหล่งที่เก็บรวบรวมตัวอย่างกบนา อึ่งขาง และคางคกที่นำมาใช้ในการศึกษาโครโมโซม	19
2.	ชนิดโครโมโซมตามอัตราส่วนระหว่างแขนยาวต่อแขนสั้นตามวิธีของลีแวนและคณะ	22
3.	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาบางประการของกบนา <i>Rana tigerina</i> อึ่งขาง <i>Kaloula pulchra</i> และคางคก <i>Bufo melanostictus</i> ชนิดละ 10 ตัว	26
4.	ความถี่ในการกระจายของจำนวนโครโมโซมแบบดิพลอยด์ (2n) ที่นับได้จากกบนา <i>Rana tigerina</i> อึ่งขาง <i>Kaloula pulchra</i> และคางคก <i>Bufo melanostictus</i>	28
5.	จำนวนโครโมโซมแบบดิพลอยด์ (2n) โครโมโซม X และจำนวนแขนโครโมโซมของกบนา อึ่งขาง และคางคก	28
6.	ค่าเฉลี่ยความยาวแขนสั้น (p) ความยาวแขนยาว (q) ความยาวทั้งแขนหรือความยาวสัมบูรณ์ (absolute length หรือ T) ความยาวสัมพัทธ์ (relative length หรือ RL) อัตราส่วนระหว่างแขนยาวต่อแขนสั้น (q/p) และชนิดของโครโมโซมคู่เหมือน (CT) ในกบนา <i>Rana tigerina</i> จากเซลล์ต้นจำนวน 5 เซลล์	29
7.	ค่าเฉลี่ยความยาวแขนสั้น (p) ความยาวแขนยาว (q) ความยาวทั้งแขนหรือความยาวสัมบูรณ์ (absolute length หรือ T) ความยาวสัมพัทธ์ (relative length หรือ RL) อัตราส่วนระหว่างแขนยาวต่อแขนสั้น (q/p) และชนิดของโครโมโซมคู่เหมือน (CT) ในอึ่งขาง <i>Kaloula pulchra</i> จากเซลล์ต้นจำนวน 5 เซลล์	30
8.	ค่าเฉลี่ยความยาวแขนสั้น (p) ความยาวแขนยาว (q) ความยาวทั้งแขนหรือความยาวสัมบูรณ์ (absolute length หรือ T) ความยาวสัมพัทธ์ (relative length หรือ RL) อัตราส่วนระหว่างแขนยาวต่อแขนสั้น (q/p) และชนิดของโครโมโซมคู่เหมือน (CT) ในคางคก <i>Bufo melanostictus</i> จากเซลล์ต้นจำนวน 5 เซลล์	31
9.	ค่าความยาวสัมบูรณ์ (T) ความยาวสัมพัทธ์ (RL) และขนาดโครโมโซมในกบนา อึ่งขาง และคางคก	32
10.	ความถี่ในการกระจายของบริเวณนิวคลีโอลัสออร์แกนเซอร์ (NORs) ที่พบบนโครโมโซมของกบนา อึ่งขาง และคางคก	32
11.	จำนวนและตำแหน่งที่ตั้งของ NORs ที่พบบนโครโมโซมคู่เหมือน (homologous chromosome pair) ในกบนา อึ่งขาง และคางคกจากจำนวนเซลล์ที่นับรวม 8 เซลล์	33

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ	หน้า
1. ภาพถ่ายกบนา <i>Rana tigerina</i> อีงช้าง <i>Kaloula pulchra</i> และคางคก <i>Bufo melanostictus</i>	8
2. โครงสร้างทางเคมีของโคลชิซิน	9
3. ภาพถ่ายการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสในระยะเมทาเฟสของกบนาเทศผู้ (A) คาริโอไทป์ (C) และ NORs 1 คู่ (#) (B และ C) * คือรอยคอดที่สอง	34
4. ภาพถ่ายการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสในระยะเมทาเฟสของกบนาเทศเมีย (A) คาริโอไทป์ (C) และ NORs 1 คู่ (#) (B และ C) * คือรอยคอดที่สอง	35
5. อิติโอแกรมของกบนา <i>Rana tigerina</i> เรียงลำดับตามค่าเฉลี่ยความยาวแขนแบบสัมบูรณ์ อัตราส่วนระหว่างแขนยาวต่อแขนสั้นของคู่โครโมโซมหรือโครโมโซมคู่เหมือนจำนวน 5 เซลล์ จุดสีดำเข้มสองจุดของโครโมโซมแบบเมทาเซนทริกคู่ที่ 5 คือ NORs ซึ่งอยู่ที่บริเวณรอยคอดที่สอง	36
6. ภาพถ่ายการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสในระยะเมทาเฟสของอีงช้างเทศผู้ (A) คาริโอไทป์ (C) และ NORs 3 คู่ (#) (B และ C) * คือรอยคอดที่สอง	37
7. ภาพถ่ายการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสในระยะเมทาเฟสของอีงช้างเทศเมีย (A) คาริโอไทป์ (C) และ NORs 3 คู่ (#) (B และ C) * คือรอยคอดที่สอง	38
8. อิติโอแกรมของอีงช้าง <i>Kaloula pulchra</i> เรียงลำดับตามค่าเฉลี่ยของความยาวแขนแบบสัมบูรณ์ อัตราส่วนระหว่างแขนยาวต่อแขนสั้นของคู่โครโมโซมหรือโครโมโซมคู่เหมือนจำนวน 5 เซลล์ จุดสีดำเข้มสองจุดของโครโมโซมแบบเมทาเซนทริกคู่ที่ 5, 8 และแบบซัพเทโลเซนทริกคู่ที่ 1 คือ NORs ซึ่งอยู่ที่บริเวณรอยคอดที่สอง	39
9. ภาพถ่ายการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสในระยะเมทาเฟสของคางคกเทศผู้ (A) คาริโอไทป์ (C) และ NORs 1 คู่ (#) (B และ C) * คือรอยคอดที่สอง	40
10. ภาพถ่ายการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสในระยะเมทาเฟสของคางคกเทศเมีย (A) คาริโอไทป์ (C) และ NORs 1 คู่ (#) (B และ C) * คือรอยคอดที่สอง	41
11. อิติโอแกรมของคางคก <i>Bufo melanostictus</i> เรียงลำดับตามค่าเฉลี่ยของความยาวแขนแบบสัมบูรณ์ อัตราส่วนระหว่างแขนยาวต่อแขนสั้นของคู่โครโมโซมหรือโครโมโซมคู่เหมือนจำนวน 5 เซลล์ จุดสีดำเข้มสองจุดของโครโมโซมแบบเมทาเซนทริกคู่ที่ 8 คือ NORs ซึ่งอยู่ที่บริเวณรอยคอดที่สอง	42

บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

ประเทศไทยมีความหลากหลายทางชีวภาพสูง การศึกษาสิ่งมีชีวิตด้านเซลล์พันธุศาสตร์มีค่อนข้างน้อย ถึงแม้ว่าข้อมูลพื้นฐานที่ได้จากการศึกษาจะมีความสำคัญในการนำไปประยุกต์ใช้ด้านต่างๆ เช่น ด้านการจัดจำแนก การศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ การปรับปรุงพันธุ์ อนุรักษ์พันธุ์ นอกจากนี้ยังสามารถใช้ประโยชน์ในด้านการศึกษาโรคทางพันธุกรรมที่เกิดจากความผิดปกติของโครโมโซม

การใช้ทรัพยากรธรรมชาติอย่างไม่มีขอบเขตจำกัด ขาดการอนุรักษ์ การควบคุม และการรักษา ทำให้ทรัพยากรธรรมชาติพืชและสัตว์มีจำนวนลดลงอย่างรวดเร็ว ประกอบกับประเทศไทยมีจำนวนประชากรเพิ่มมากขึ้น จำเป็นต้องอาศัยพื้นดินและแหล่งน้ำในการทำมาหากิน พื้นที่ป่าถูกบุกรุกมากขึ้น และมีการปล่อยของเสียลงในแหล่งน้ำ ทำให้เกิดมลพิษขึ้นในสิ่งแวดล้อม ส่งผลกระทบต่อประชากรพืชและสัตว์ รวมทั้งกลุ่มสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในกลุ่มกบ เขียด อึ่งอ่าง คางคก และปลา ซึ่งต้องอาศัยแหล่งน้ำเป็นที่อยู่อาศัยในวัยอ่อน ซึ่งมีประโยชน์ต่อมนุษย์ทั้งทางตรงและทางอ้อม กบ เขียด อึ่งอ่างเป็นแหล่งอาหารโปรตีน โดยเฉพาะกับประชากรที่อาศัยอยู่ในชนบท คางคกถึงจะใช้เป็นอาหารไม่ได้ แต่ก็มีส่วนช่วยในการกำจัดแมลงศัตรูพืชไม่ให้แพร่ระบาดมากเกินไป ตัวอ่อนหรือลูกอ๊อดที่อาศัยอยู่ในน้ำก็เป็นตัวช่วยควบคุมปริมาณของสัตว์น้ำขนาดเล็กให้อยู่ในสภาวะสมดุล ตัวมันเองก็เป็นอาหารของสัตว์น้ำชนิดอื่นๆ นอกจากนี้สภาพความสมบูรณ์ของตัวเต็มวัยยังเป็นดัชนีบ่งบอกถึงสภาพมลภาวะในอากาศ และสิ่งแวดล้อมได้เป็นอย่างดี

สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกมีประโยชน์ต่อการเกษตรกรรมแผนใหม่ที่ลดการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืช โดยปล่อยให้สัตว์ในธรรมชาติเข้ามาควบคุมแทน คางคกบ้านหนึ่งตัวสามารถกำจัดปลวกได้นับพันตัวในช่วงเวลาคืนเดียว กบอื่นๆ ก็สามารถกำจัดแมลงทั้งที่อยู่ในน้ำและบนบกได้มากมาย (ธัญญา จันอาจ, 2546)

สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกกลุ่มอึ่งอ่าง คางคกมีโอกาสเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ เนื่องจากการทำลายป่าต้นน้ำลำธาร ซึ่งเป็นแหล่งที่อยู่อาศัยตามธรรมชาติ ที่สำคัญอย่างยิ่งคือขาดความรู้พื้นฐานที่จะนำมาใช้ในการจัดการอย่างเหมาะสม เพื่อประโยชน์ในแนวทางการอนุรักษ์ (จารุจินต์ นกิตะภักดิ์, 2531) ปัจจุบันกรมป่าไม้ออกพระราชบัญญัติให้คางคก 3 ชนิดคือ จงโคร่ง คางคกหัวราบ คางคกแคระเป็นสัตว์ป่าคุ้มครองประเภทที่ 1 คือเป็นสัตว์ป่าซึ่งตามปกติไม่นิยมใช้บริโภคเป็นอาหาร หรือไม่ล่าเป็นเกมกีฬา แต่เป็นสัตว์ป่าที่ช่วยทำลายศัตรูพืชหรือขจัดสิ่งปฏิกูล หรือเป็นสัตว์ป่าที่ควรสงวนไว้ประดับความงามตามธรรมชาติ หรือสงวนไว้เพื่อมิให้จำนวนลดลง (สมชาย เลียงพรพรรณ, 2540) ดังนั้นเพื่อเป็นการจัดการทรัพยากรธรรมชาติอย่างเหมาะสม และแนวทางในการอนุรักษ์สัตว์กลุ่มนี้ จึงควรมีการศึกษารวบรวม

ข้อมูลทั้งด้านอนุกรมวิธาน ด้านเซลล์พันธุศาสตร์ เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการศึกษาในระดับลึกต่อไป

กบนา *Rana trigerina* Daudin, 1820 อึ่งขางหรืออึ่งอ่างบ้าน *Kaloula pulchra* Gray, 1831 และ คางคกหรือคางคกบ้าน *Bufo melanostictus* Schneider, 1799 เป็นสัตว์มีกระดูกสันหลังจัดอยู่ในชั้นแอมฟิเบีย (Class Amphibia) มีอยู่ด้วยกัน 3 อันดับ (order) คือ อันดับกะท่างหรือซาลาแมนเดอร์ (Order Caudata) มี 1 ชนิด อันดับเขียดงู (Order Gymnophiona) มี 6 ชนิด และอันดับกบ (Order Anura) ในประเทศไทยมีอยู่ด้วยกัน 6 วงศ์ (family) จำนวน 134 ชนิด สำหรับพวกกะท่างและเขียดงู พบได้ยากไม่ค่อยคุ้นเคยกัน ที่คนไทยเรารู้จักคุ้นเคยกันดีได้แก่ อันดับกบ ซึ่งประกอบด้วย กบ เขียด อึ่งอ่าง คางคกและปาด จากการศึกษาสำรวจสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในประเทศไทยมาตั้งแต่ต้นจนถึงปัจจุบันนี้ พบ 141 ชนิด (ธัญญา จันอาจ, 2546)

การศึกษาด้านเซลล์พันธุศาสตร์ (cytogenetics) เป็นการศึกษาเกี่ยวกับส่วนประกอบของเซลล์ที่อยู่ในภายในนิวเคลียสทำหน้าที่ในการถ่ายทอดลักษณะจากพ่อแม่ไปสู่ลูกหลาน นั่นคือการศึกษาเกี่ยวกับรูปร่าง ลักษณะ ขนาด จำนวนของโครโมโซมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ด้วยการย้อมสีแบบต่างๆ เพื่อให้เห็นรูปร่าง ลักษณะของโครโมโซมได้ชัดเจน การศึกษาเกี่ยวกับโครโมโซมของกบ เขียด อึ่งอ่าง คางคก และปาด ในประเทศไทยมีผู้ศึกษากันไว้บ้างแต่ไม่มาก ส่วนใหญ่เป็นการศึกษาด้วยการย้อมสีแบบธรรมดาเพื่อช่วยทำให้ทราบจำนวนโครโมโซม เช่น นงลักษณ์ นาคเกษม (2518) ศึกษาโครโมโซมของอึ่งน้ำเต้า *Microhyla ornata* เขียดอีโม *Rana limnocharis* คางคกบ้าน *Bufo melanostictus* พบว่ามีโครโมโซม $2n = 24, 26$ และ 22 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังมีผู้ศึกษากันในอึ่งอ่างบ้าน *Kaloula pulchra* เขียดจิก *Rana erythraea* เขียดเหลือง *Rana lateris* อึ่งแว่น *Calluella guttulata* อึ่งขาคำ *Microhyla pulchra* อึ่งก้นจืด *Kaloula mediolineata* กบบูลฟร็อก *Rana catesbeina* กบอกหนาม *Rana fasciispina* เขียดหลังปุ่ม *Phrynoglossus martensii* กบนา *Rana rugulosa* จงโคร่ง *Bufo asper* คางคกหัวราบ *B. macrotis* และคางคกแคระ *B. parvus* พบว่ามีโครโมโซม $2n = 28, 26, 26, 24, 28, 26, 26, 26, 26, 22, 22$ และ 22 ตามลำดับ (ถาวร สุภาพรม และประภาพร กัลยาประสิทธิ์, 2533; ถาวร สุภาพรม และคณะ, 2534; 2535; 2537; วรวิทย์ จุฬาลักษณ์านุกูล และคณะ, 2540; ถาวร สุภาพรม และคณะ, 2543; วรวิทย์ จุฬาลักษณ์านุกูล และคณะ, 2544) เป็นต้น ปัจจุบันยังไม่ปรากฏรายงานเกี่ยวกับคาริโอไทป์และการกระจายบริเวณนิวคลีโอลัสออร์แกไนเซอร์ (nucleolar organizer regions) หรือ NORs โดยใช้เซลล์ตับในกบนา อึ่งขาง และคางคกบ้านเลย ดังนั้นผลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้จะมีประโยชน์อย่างมากในการเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการนำไปใช้ในด้านต่างๆ ตามที่กล่าวมาแล้วข้างต้น

ความมุ่งหมายของการวิจัย

เพื่อศึกษาการโอไทป์และบริเวณนิวคลีโอไทด์สอร์แกนเซอร์ หรือ NORs ของกบนา อี๋ยาง และคางคกที่พบในประเทศไทย

ความสำคัญของการวิจัย

1. เพื่อให้ทราบจำนวนโครโมโซม การโอไทป์ ของกบนา อี๋ยางและคางคก
2. เพื่อให้ทราบจำนวน ที่ตั้ง NORs ของกบนา อี๋ยางและคางคก
3. เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการนำไปประยุกต์ใช้ด้านเซลล์อนุกรมวิธาน ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ และเซลล์พันธุศาสตร์ของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก
4. เพื่อให้ทราบเทคนิคและวิธีการในการใช้เซลล์ตับในการศึกษาโครโมโซมของกบนา อี๋ยางและคางคก เพื่อนำไปประยุกต์ใช้กับสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกชนิดอื่นๆ

ขอบเขตของการวิจัย

ประชากรและกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัย

ประชากรที่ใช้ในการวิจัย

กบนา อี๋ยาง และคางคก จากภาคตะวันออกและภาคกลางของประเทศไทย

กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัย

กบนาเพศผู้และเพศเมีย จากอำเภอบ้านนา จังหวัดนครนายก จำนวน 8 ตัว

กบนาเพศผู้และเพศเมีย จากอำเภอบางพลี จังหวัดนครนายก จำนวน 6 ตัว

กบนาเพศผู้และเพศเมีย จากอำเภอมวกเหล็ก จังหวัดสระบุรี จำนวน 5 ตัว

อี๋ยางเพศผู้และเพศเมีย จากเขตบางกะปิ กรุงเทพมหานคร จำนวน 3 ตัว

อี๋ยางเพศผู้และเพศเมีย จากอำเภอเมือง จังหวัดสมุทรสาคร จำนวน 8 ตัว

อี๋ยางเพศผู้และเพศเมีย จากเขตบางเขน กรุงเทพมหานคร จำนวน 5 ตัว

คางคกเพศผู้และเพศเมีย จากเขตวัฒนา กรุงเทพมหานคร จำนวน 3 ตัว

คางคกเพศผู้และเพศเมีย จากเขตบางเขน กรุงเทพมหานคร จำนวน 10 ตัว

คางคกเพศผู้และเพศเมีย จากอำเภอบ้านนา จังหวัดนครนายก จำนวน 5 ตัว

คางคกเพศผู้และเพศเมีย จากอำเภอเมือง จังหวัดสมุทรสาคร จำนวน 7 ตัว

รายละเอียดเกี่ยวกับตัวอย่างประชากรที่ใช้ในการวิจัยปรากฏตามตาราง 1

นิยามศัพท์เฉพาะ

คาริโอไทป์ (karyotype) หมายถึง ภาพแสดงการจัดโครโมโซมเป็นคู่ตามรูปร่าง และขนาดของคู่โครโมโซมในสิ่งมีชีวิตในระยะเมทาเฟส (ในไมโทซิส) โดยมีการจัดเรียงกันให้ตำแหน่งของเซนโทรเมียร์อยู่ในระดับเดียวกัน ในกรณีที่โครโมโซมมีแขนยาวไม่เท่ากันจะเรียงกันให้แขนสั้นอยู่ด้านบน และแขนยาวอยู่ด้านล่าง เพื่อศึกษาจำนวนโครโมโซม และความผิดปกติของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ

บริเวณนิวคลีโอลัสออร์แกไนเซอร์ (nucleolar organizer regions) หรือ NORs หมายถึง ส่วนของโครโมโซมตรงบริเวณรอยคอดที่สอง (secondary constriction) ประกอบด้วยยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์ไรโบโซมอลาร์เอ็นเอ (ribosomal RNA) หรือบริเวณที่เป็นที่อยู่ของ 18s + 28s rRNA gene บนโครโมโซม

สมมติฐานในการวิจัย

กบนา อีงช้างหรืออีงอ่างบ้าน และคางคกหรือคางคกบ้าน ซึ่งเป็นสัตว์ที่อยู่คนละวงศ์กัน น่าจะมีคาริโอไทป์ จำนวน และที่ตั้งของ NORs แตกต่างกัน



บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ชีววิทยาของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก

สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก (amphibians) เป็นสัตว์มีกระดูกสันหลังจัดอยู่ในไฟลัมคอรีดาตา (Phylum Chordata) ชั้นไฟลัมเวอร์เทบราตา (Subphylum Vertebrata) ชั้นแอมฟิเบีย (Class Amphibia) เป็นสัตว์มีกระดูกสันหลังพวกแรกๆ ที่ขึ้นจากน้ำมาอาศัยอยู่บนบก แบ่งออกเป็นอันดับต่างๆ ด้วยกัน 6 อันดับ ได้แก่

1. อันดับลาบรินโทดอนเทีย (Order Labrynthodontia)
2. อันดับฟิโลสพอนดิไล (Order Phyllospondyli)
3. อันดับเลปโทสพอนดิไล (Order Leptospondyli)
4. อันดับคอคดาตาหรือยูโรเดลา (Order Caudata หรือ Urodela) ได้แก่ พวกซาลาแมนเดอร์ (salamanders)
5. อันดับอะโพดาหรือจิมโนฟิโอนา (Order Apoda หรือ Gymnophiona) ได้แก่ พวกเชียนจู (caecilians)
6. อันดับแอนูราหรือซาลิเอนเทีย (Order Anura หรือ Salientia) ได้แก่ พวกกบ เขียด อึ่งอ่าง (frogs) และคางคก (toads)

สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกใน 3 อันดับแรกได้สูญพันธุ์ไปนานแล้ว พบซากโบราณในยุคคาร์บอนิเฟอรัส (Carboniferous) ยุคเพอร์เมียน (Permian) ยุคดีโวเนียน (Devonian) ถึงไทรแอสสิก (Triassic) ส่วนที่ยังมีชีวิตอยู่ในปัจจุบันได้แก่ 3 อันดับสุดท้าย (Taylor, 1962; วิโรจน์ นุตพันธุ์, 2540: รัชญา จันอาจ, 2546)

ลักษณะสำคัญของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกคือ เป็นพวกสัตว์ที่มีต่อมตามผิวหนัง มีเมือกชื้น ไม่มีเกล็ดโผล่ออกมาให้เห็นนอกลำตัว ที่รู้จักกันค่อนข้างดีได้แก่พวกกบ เขียด อึ่งอ่าง คางคก มีขา 2 คู่ มีเหงือกไม่เป็นคู่ มีช่องจมูก 2 ช่องติดต่อกับช่องปาก กระโหลกศีรษะมีปุ่มออกซิพิทอล (occipital condyle) 2 ปุ่ม หัวใจมี 3 ห้อง หายใจด้วยผิวหนัง เหงือกและปอด ไข่มีสารจำพวกวุ้นหุ้ม ปกติวางไข่ในน้ำ ตัวอ่อนอาศัยอยู่ในน้ำ ตัวเต็มวัยอาศัยอยู่ในน้ำหรือในที่ที่มีความชื้นบนบก พบตั้งแต่ยุคดีโวเนียนจนถึงปัจจุบัน มีอยู่ประมาณ 2,500 ชนิด (Taylor, 1962; Storer and Usinger, 1957) จากการสำรวจสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในประเทศไทยตั้งแต่ต้นจนถึงปี 2544 พบ 107 ชนิด (จารุจินต์ นฤภูษิต, 2531; วิโรจน์ นุตพันธุ์, 2544) และล่าสุด รัชญา จันอาจ (2546) รายงานไว้ 141 ชนิด

ลักษณะสำคัญของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในอันดับกบเขียด (Order Anura) หรือกบ เขียด อึ่งอ่าง คางคก มีดังนี้

สัตว์ในอันดับนี้มีลำตัวค่อนข้างสั้น มี 4 ขา มีหลายกลุ่ม และมีรูปร่างแตกต่างกันหลายแบบ มีทั้ง ลำตัวขนาดเล็กจนถึงขนาดใหญ่ เช่นสกุลเขียดน้ำองมีขนาดเล็กจนถึงขนาดใหญ่เช่นในกบหูตหรือกบภูเขา บางกลุ่มมีตัวแบนเรียวยาว เช่นในสกุลกบเวียดนาม สัตว์ในอันดับนี้มีมากกว่า 2,000 ชนิด (Taylor, 1962; รัชญา จันอาจ, 2546) มีอยู่ด้วยกัน 14 วงศ์ แต่ในประเทศไทยพบด้วยกันทั้งหมด 6 วงศ์ (รัชญา จันอาจ, 2546) ได้แก่

1. วงศ์อึ่งกราย (Family Megaphryidae)
2. วงศ์กบ เขียด (Family Ranidae)
3. วงศ์อึ่งอ่าง (Family Microhylidae)
4. วงศ์ปาดเมืองจีน (Family hylidae)
5. วงศ์ปาด (Family Rhacophoridae)
6. วงศ์คางคก (Family Bufonidae)

ลักษณะสำคัญของวงศ์กบเขียด (Family Ranidae)

หัวเรียบค่อนข้างโค้ง ปลายปากแหลมมน ตัวโตเต็มวัยไม่มีหาง กระดูกรองรับขาหน้าเป็นแบบอกแผ่นหรืออกติด (firmisternum) มีพื้นที่ขากรรไกรบนและที่กระดูกฐานจมูก ส่วนปีกของกระดูกสันหลัง ข้อก่อนกระดูกกันกบเป็นท่อนทรงกระบอกหรือแบนเล็กน้อย ไม่มีกระดูกอ่อนแทรกอยู่ระหว่างกระดูก นิ้ว 2 ท่อนตอนปลาย (รัชญา จันอาจ, 2546)

กบนา *Rana tigerina* Daulin, 1822

เป็นกบที่คนไทยรู้จักกันทั่วไป เนื้อใช้รับประทานเป็นอาหาร หัวมีส่วนกว้างมากกว่าความยาวของปากสั้นๆ จมูกตั้งอยู่บริเวณโค้งตอนปลายของงอยปาก นัยน์ตาโต ลำตัวมีปุ่มหรือสันนูน จัดเรียงตัวเป็นแถวตามยาว (longitudinal ridge) และมีตุ่ม (tubercle) ขนาดใหญ่อยู่บริเวณ 2 ข้างลำตัว นิ้วมือ นิ้วเท้าแหลม หนังขี้ (web) ที่ขาหลังจะเต็มถึงเฉพาะที่หัวแม่เท้าเท่านั้น ขนาดโตเต็มที่ประมาณ 140 มิลลิเมตร ส่วนมากพบในภาคกลางของประเทศไทย นอกจากนี้ยังพบในพม่า ใต้หวัน และประเทศในแถบแหลมอินโดจีน (ลักษณะดังภาพประกอบ 1) (Taylor, 1962; วิโรจน์ นุตพันธุ์, 2544)

ลักษณะสำคัญของวงศ์อึ่งอ่าง (Family Microhylidae)

ลำตัวมีขนาดเล็กถึงขนาดใหญ่ หัวเล็ก สั้น ส่วนใหญ่แผ่นหู (tympanic membrane) ช่อนอยู่ใต้ผิวหนัง ขาสั้น บางสกุลมีตุ่มที่ฝ่าเท้าด้านในแหลมคมเหมือนพลั่ว เช่นสกุลอึ่งลาย *Calluella* สกุลอึ่งเพ้า *Glyphoglossus* และสกุลอึ่งบ้าน *Kaloula* ส่วนใหญ่ผิวหนังตามลำตัวเรียบ ยกเว้นสกุลอึ่งปุ่ม *Kalophrynus* ที่เต็มไปด้วยตุ่มเล็กๆ หนาแน่น ตัวเต็มวัยมีความแตกต่างทางด้านความเป็นอยู่และแหล่งอาศัยมาก แตกกัน

อาหารคล้ายกัน ส่วนใหญ่เป็นพวกมด ปลวก และแมลงขนาดเล็ก ขณะที่เป็กลูกอ๊อดหากินตามผิวน้ำและกลางน้ำ (ธัญญา จันอาจ, 2546)

อิงยาง *Kaloula pulchra* Gray, 1831

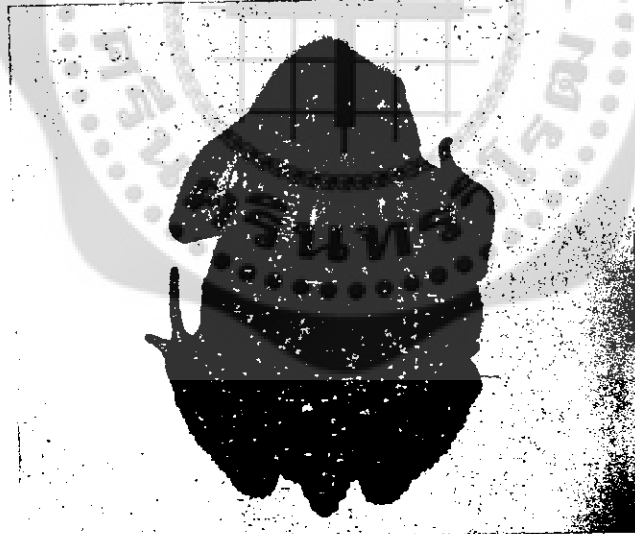
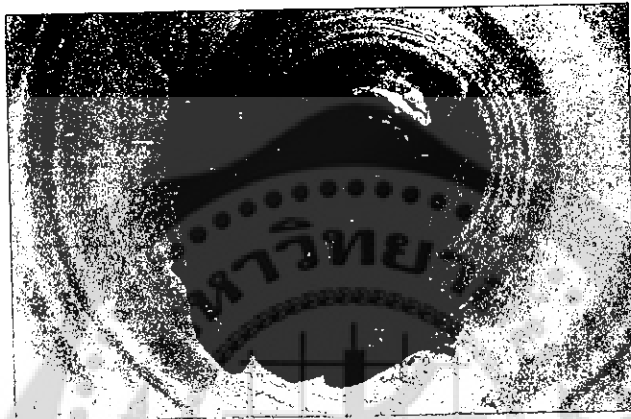
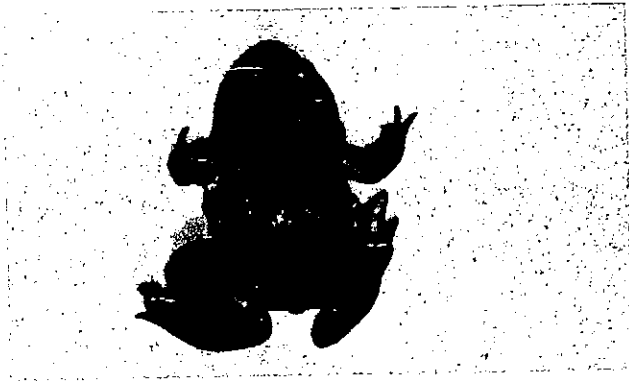
อิงยางบางครั้งเรียกอีกอย่างหนึ่งว่าอิงอ่างบ้าน เพราะพบได้ทั่วไปตามบ้านเรือนอาศัย ลำตัวป้อม ขนาดกลางถึงขนาดใหญ่ รูปร่างกลม แผ่นหูอยู่ใต้ผิวหนัง ขาสั้น นิ้วขาหน้าไม่มีแผ่นหนังจึง ปลาย นิ้วเท้าแหลมหรือขยายออกเป็นแผ่นปลายตัด ด้านหลังสีน้ำตาลเข้มคล้ายรูปน้ำเต้า สองข้างของลำตัวมี แถบลายสีน้ำตาลอ่อนพาดจากด้านท้ายของลูกตาไปยังด้านท้ายของลำตัว ด้านหลังของลำตัวมีตุ่มเล็ก กระจายทั่วไป ขาหน้าค่อนข้างยาว ปลายนิ้วเท้าขยายออก ขาหลังมีหนังจึงเล็กน้อย ขนาดเมื่อโตเต็มที่ ประมาณ 70 มิลลิเมตร (ลักษณะดังภาพประกอบ 1) พบทั่วทุกภาคของประเทศ นอกจากนี้ยังพบกระจาย ตั้งแต่มาเลเซีย ซิลอน ถึงอินเดีย (Taylor, 1962; วิโรจน์ นุดพันธุ์, 2544; ธัญญา จันอาจ, 2546)

ลักษณะสำคัญของวงศ์คางคก (Family Bufonidae)

คางคกในประเทศไทยส่วนใหญ่มีลักษณะจำได้ง่าย มีลำตัวป้อม ขาสั้น ผิวหนังหยาบเต็มไปด้วยปุ่ม ปม ส่วนใหญ่มีต่อมพิษ (parotoid gland) ใหญ่อยู่ด้านหลังของแผ่นหูเห็นชัดเจน นิ้วขาหน้าไม่มีแผ่นหนัง จึงชิด รูปร่างอยู่ในแนวราบ แห้งอาศัยหลากหลาย เช่น ตามพื้นป่า ลำธาร บางชนิดอยู่บนต้นไม้ เช่น คางคกต้นไม้ คางคกในประเทศไทยมีอยู่ด้วยกัน 4 สกุลคือ สกุลคางคกขาขาว *Leptophryne* สกุลคางคกหัวย *Ansonia* สกุลคางคกต้นไม้ *Pedostebes* และสกุลคางคกบ้าน *Bufo* สกุลคางคกบ้านมีอยู่ด้วยกัน 5 ชนิดคือ จงโคร่ง (River toad) *Bufo asper* คางคกหัวราบ (Flat – headed Toad) *Bufo macrotis* คางคกแคระมลายู (Malayan dwarf toad) *Bufo divergens* คางคกแคระ (Indochinese dwarf toad) *Bufo parvus* และคางคก บ้าน (Black – spine toad) *Bufo melanostictus* (ธัญญา จันอาจ, 2546)

คางคกหรือคางคกบ้าน *Bufo melanostictus* Schneider, 1799

เป็นคางคกที่มีขนาดกลาง ลำตัวป้อม ขาหน้าและขาหลังสั้น ลื่นรูปไข่หรือรี ปลายลิ้นไม่หยัก นิ้วขา หน้าไม่มีแผ่นหนังจึงระหว่างนิ้ว มีสันแข็งบนหัว (canthal ridge) นิ้วเท้าหลังมีแผ่นหนังยึดหนา รูปร่าง อยู่ในแนวราบ ผิวหนังตามลำตัวมีปุ่มจำนวนมาก ตรงกลางปุ่มมีหนามสีดำเล็กๆ ยื่นออกมา ต่อมพิษ ด้านหลังยาวและใหญ่ นิ้วเท้าอันแรกปกติยาวกว่านิ้วเท้าอันที่สอง ขาหลังมีแผ่นหนังจึงระหว่างนิ้วเพียง 1 ใน 3 ขนาดโตเต็มที่ยาวประมาณ 90 มิลลิเมตร (ลักษณะดังภาพประกอบ 1) พบกระจายทั่วไปทั้ง ประเทศตามบริเวณบ้านเรือนและเสาไฟ นอกจากนี้ยังพบตั้งแต่อินเดีย เทือกเขาหิมาลัย จีน พม่า มาเลเซีย และประเทศในแหลมอินโดจีน (Taylor, 1962; วิโรจน์ นุดพันธุ์, 2544; ธัญญา จันอาจ, 2546)

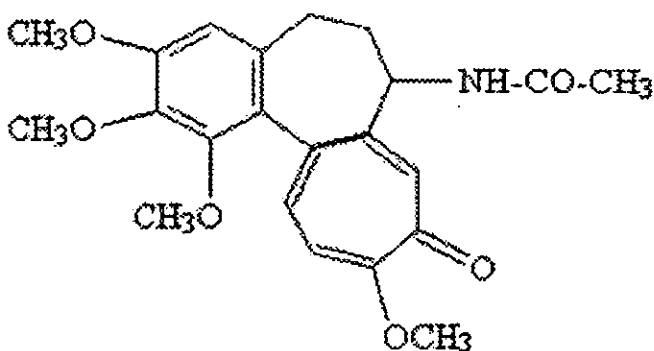


ภาพประกอบ 1 ภาพถ่ายกบนา *Rana tigerina* อึ่งขาง *Kaloula pulchra* และคางคก *Bufo melanostictus*

การศึกษาเกี่ยวกับโครโมโซมและคาริโอไทป์

คาริโอไทป์ หมายถึงภาพแสดงการจัดโครโมโซมเป็นคู่ตามรูปร่าง และขนาดของคู่โครโมโซมในสิ่งมีชีวิตในระยะเมทาเฟส โดยมีการจัดเรียงกันให้ตำแหน่งของเซนโทรเมียร์อยู่ในระดับเดียวกัน ในกรณีที่มีแขนยาวไม่เท่ากันจะเรียงกันให้แขนสั้นอยู่ด้านบน และแขนยาวอยู่ด้านล่าง เพื่อศึกษาจำนวนโครโมโซมและความผิดปกติในสิ่งมีชีวิตนั้นๆ ไลอะแกรมของคาริโอไทป์เรียก อิดิโอแกรม (idiogram) การวิเคราะห์คาริโอไทป์หรือการจัดคาริโอไทป์มักใช้โครโมโซมในระยะโพรเฟสหรือเมทาเฟสของการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส นอกจากนี้ยังใช้โครโมโซมในบางระยะของการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสมาใช้ได้ด้วย (Sharma, 1991; Rudi et al., 1998; สมาคมพันธุศาสตร์แห่งประเทศไทย, 2548) การจัดคาริโอไทป์อาจจัดได้ด้วย 2 แบบคือ จัดเรียงโครโมโซมคู่เหมือนจากโครโมโซมที่มีขนาดใหญ่หรือยาวที่สุดไปหาโครโมโซมที่มีขนาดเล็กที่สุดหรือสั้นที่สุด กับการจัดคาริโอไทป์โดยจัดเรียงโครโมโซมคู่เหมือนจากโครโมโซมที่มีขนาดใหญ่ไปหาโครโมโซมที่มีขนาดเล็ก โดยจัดเรียงตามชนิดหรือแบบโครโมโซมจากที่มีขนาดใหญ่สุดไปหาเล็กสุด จากโครโมโซมแบบเมทาเซนตริก (metacentric) ไปเป็นซับเมทาเซนตริก (submetacentric) ซับเทโลเซนตริก (subtelocentric) และอะโครเซนตริก (acrocentric) หรือเทโลเซนตริก (telocentric) ตามลำดับ (Cestari and Galetti, 1992)

การที่จะได้มาซึ่งโครโมโซมในระยะเมทาเฟสเพื่อนำมาใช้ในการศึกษาโครโมโซมและวิเคราะห์คาริโอไทป์ ตลอดจนการหาบริเวณกระจายของนิวคลีโอลัสออร์แกไนเซอร์ (nucleolar organizer regions) หรือเอ็นโออาร์ (NORs) นิยมใช้สารเคมี เช่น โคลชิซิน (colchicine) โคลซิמיד (colcimid) เวลบาน (velban) เวลบลาสตินซัลเฟต (velblastin sulphate) นอร์มัล - โบรโมแนปทาไลน์ (n - bromonaphthalin) 8 - ไฮดรอกซีควิโนลิน (8 - hydroxyquinolin) อะซีนแนปทีน (acenaphthene) คอรัลไฮเดรต (choral hydrate) แกมมีเซน (gammexane) (Denton, 1973; Sharma, 1991; Rudi et al., 1998) แต่สารที่นิยมใช้กันมากคือ โคลชิซิน โคลชิซินเป็นสารประกอบอัลคาลอยด์ สกัดได้มาจากเมล็ดและเหง้า (corm) ของต้นออกทัมโครคัส (autumn crocus) ที่มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Colchicum autumnale* โดยโคลชิซินมีโครงสร้างทางเคมีดังภาพประกอบ 2 (Rudi et al., 1998)



ภาพประกอบ 2 โครงสร้างทางเคมีของโคลชิซิน

โคลชิซินที่ใช้จะไปยับยั้งการทำงานของสปีนเดิลไมโครทิวบูล (spindle microtubule) คือทำให้ปลายข้างหนึ่งของไมโครทิวบูลของสปีนเดิลไฟเบอร์ (spindle fiber) เกิดการแตกหัก คือทำให้อัลฟาทูบูลิน (α -tubulin) และบีตาทูบูลิน (β -tubulin) ของไมโครทิวบูลไม่สามารถเกาะจับกันได้ จึงทำให้ไมโครทิวบูลของสปีนเดิลไฟเบอร์ไม่สามารถเกาะจับกับไคนีโทคอร์ (kinetochore) ของโครโมโซม จึงทำให้โครโมโซมของการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส ไม่สามารถผ่านเข้าสู่การแบ่งเซลล์ในระยะต่อไปได้ ทำให้การแบ่งเซลล์หยุดอยู่ที่ระยะเมทาเฟส ด้วยเหตุนี้ การใช้สารโคลชิซินฉีดหรือแช่เซลล์ของพืชและสัตว์จึงทำให้ได้การแบ่งเซลล์ในระยะเมทาเฟสเพิ่มขึ้น (Denton, 1973; Campbell, 1996; Rudi et al., 1998)

การเตรียมโครโมโซมเพื่อวิเคราะห์คาริโอไทป์และหา NORs ในปลาและสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก มักใช้โคลชิซินที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0.01% - 0.3% ฉีดเข้าบริเวณช่องท้องในปริมาณ 0.25 - 1.5 มิลลิลิตร ต่อน้ำหนักตัวประมาณ 2 - 3 กรัม ใช้เวลาประมาณ 2 ชั่วโมงครึ่งไปจนถึง 23 ชั่วโมง แต่ถ้าเป็นลูกอ๊อดอาจใช้ความเข้มข้น 0.001% แช่เป็นเวลาประมาณ 2 - 5 ชั่วโมง แล้วตัดเอาครีบหางของลูกอ๊อดออกมาเตรียมโครโมโซมแบบกดบีบให้แบน (Wasserman and Bogart, 1968; Schmid, 1982)

อวัยวะของกบ เขียด อึ่งอ่าง คางคก ปาด ซาลาแมนเดอร์ และสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกอื่นๆ ที่นิยมนำมาใช้ในการเตรียมโครโมโซมได้แก่ เยื่อบุแก้วตา (corneal epithelium) ตับ (liver) ซึ่งเกิดจากการแบ่งเซลล์ของพวกเซลล์พาราคีมา (parenchyma cell) ม้าม (spleen) ซึ่งเกิดจากการแบ่งเซลล์ของเซลล์ลิมโฟซัยต์ (lymphoid cell) ไต (kidney) ซึ่งเกิดจากการแบ่งเซลล์ในเนื้อเยื่อไมอีลอยด์ (myeloid) และลิมโฟซัยต์ (lymphoid) เซลล์เยื่อไขกระดูกของท่อทางเดินอาหารหรือถ้าได้ เซลล์ไขกระดูก (bone marrow cell) เซลล์สเปิร์มาโทโกเนีย (spermatogonial cell) ของอวัยวะ ตับ ม้าม และไต ถือเป็นอวัยวะที่เป็นศูนย์กลางของการสร้างและทำลายเซลล์เม็ดเลือด ดังนั้นอวัยวะเหล่านี้จึงมีการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสอยู่ตลอดเวลา นอกจากจะใช้เซลล์ร่างกายของการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสในการศึกษาคาริโอไทป์และ NORs แล้ว เซลล์ในระยะเมทาเฟสของการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสก็ใช้ในการศึกษาคาริโอไทป์ได้เช่นเดียวกัน อวัยวะที่นิยมใช้ในการเตรียมโครโมโซมคืออวัยวะ นอกจากเตรียมโครโมโซมโดยตรงจากเซลล์ของอวัยวะตามที่กล่าวมาแล้ว ยังนิยมเตรียมโครโมโซมจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ วิธีที่นิยมใช้กันคือการเพาะเลี้ยงเซลล์จากเซลล์เม็ดเลือดขาวลิมโฟไซท์ (lymphocyte) และจากเซลล์เนื้อเยื่อไตในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์โดยเฉพาะเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงจะทำให้ได้เซลล์ที่มีการแบ่งเซลล์ในระยะเมทาเฟสสูง แต่เทคนิคและวิธีการค่อนข้างยาก ลงทุนสูง ผลที่ได้จากการเตรียมโครโมโซมจากเนื้อเยื่อโดยตรงมิได้มีผลแตกต่างกันมากมายนัก (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)

เทคนิคการเตรียมโครโมโซมเพื่อศึกษาคาริโอไทป์ที่นิยมใช้กันในปัจจุบันได้แก่ การเตรียมโครโมโซมแบบกดบีบให้แบน (squash technique) วิธีไฮโปโทไนเซชัน แอร์รายอิงเทคนิค (hypotonization air drying technique) วิธีไฮโปโทนิค - โอโมจิโนส - ฟิกเซชัน - แพรกชันเนชัน - แอร์

ครายอิง เทคนิค (hypotonic – homogenize – fractionation – air drying technique) คือการแช่เซลล์หรือเนื้อเยื่อนั้นในโพแทสเซียมคลอไรด์ที่เป็นไฮโพโทนิกแล้วสับออกเป็นชิ้นเล็กๆ เข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงเพื่อให้เกิดการตกตะกอนแล้วนำตะกอนนั้นมาหยดบนสไลด์ แล้วผึ่งไว้ให้แห้งในอากาศ (Wasserman and Bogart, 1968; Denton, 1973; Bogart, 1974; de Almeida et al., 1990; Campbell, 1996)

การย้อมสีโครโมโซมเพื่อวิเคราะห์คาร์ิโอไทป์เพื่อแสดงบริเวณนิวคลีโอลัสหรือแกโนเซอร์ หรือ NORs ซึ่งเป็นบริเวณที่ตั้งของนิวคลีโอลัส (nucleolus) (Sumner, 1990) หรือบริเวณที่ตั้งของ 18S และ 28S rRNA gene (Rab et al., 1996) วิธีการย้อมโครโมโซมมีอยู่ด้วยกันหลายแบบ แบบที่ใช้กันทั่วไป (conventional staining) คือการย้อมสีโครโมโซมด้วยสีย้อมกิมา (giemsa) หรือสีย้อมออร์ซีน (orcein) นอกจากนี้ยังนิยมย้อมด้วยสีย้อมคาร์มิน (carmine) และย้อมด้วยสีย้อมฟอลเกน (feulgen) ซึ่งบ่งบอกถึงตำแหน่งที่อยู่ของดีเอ็นเอ (DNA specific staining) การวิเคราะห์คาร์ิโอไทป์ นอกจากวิธีการย้อมแบบมาตรฐานดังกล่าวมาแล้ว ยังนิยมย้อมแถบโครโมโซมแบบต่างๆ เพื่อให้การจัดคาร์ิโอไทป์แม่นยำขึ้นและมีประโยชน์ในแง่อื่นๆ เช่น

การย้อมแถบซี (C - band) นอกจากจะช่วยในการจัดคาร์ิโอไทป์ของโครโมโซมคู่เหมือนได้ถูกต้องแม่นยำขึ้นแล้ว ยังช่วยตรวจสอบว่าโครโมโซมมีวิวัฒนาการถึงขั้นที่มีการสะสมเฮเทอโรโครมาทิน (heterochromatin) แล้วหรือยัง ตามสมมติฐานเกี่ยวกับวิวัฒนาการของโครโมโซมเพศของโอโน (Ohno, 1967) การย้อมแถบสีแบบนี้ถ้ามีแถบสีแตกต่างกันของโครโมโซมคู่ใดคู่หนึ่งแสดงว่ามีวิวัฒนาการของโครโมโซมถึงขั้นที่มีการสะสมเฮเทอโรโครมาทิน แต่ถ้าไม่ต่างกันหรือเหมือนกันแสดงว่ายังไม่เกิดวิวัฒนาการถึงขั้นสะสมเฮเทอโรโครมาทิน (วรวิทย์ จุฬาลักษณ์นากุล และคณะ, 2544)

การย้อมแถบจี (G - band) นอกจากจะช่วยในการจัดโครโมโซมคู่เหมือนได้ถูกต้องแม่นยำแล้ว ยังช่วยตรวจสอบว่าโครโมโซมมีการเกิดอินเวอร์ชัน (inversion) หรือไม่ ซึ่งการเกิดอินเวอร์ชันเป็นขั้นตอนหนึ่งของวิวัฒนาการของโครโมโซมเพศตามสมมติฐานเกี่ยวกับวิวัฒนาการของโอโน (Ohno, 1967) ถ้าแถบสีของโครโมโซมไม่แตกต่างกัน แสดงว่าไม่มีการเกิดวิวัฒนาการของโครโมโซมจนเกิดอินเวอร์ชัน (วรวิทย์ จุฬาลักษณ์นากุล และคณะ, 2544)

การย้อมแถบสีด้วยวิธี Ag - NOR staining นอกจากจะบอกถึงตำแหน่งที่ตั้งของนิวคลีโอลัส หรือ 18S และ 28S rRNA gene แล้ว การย้อมแบบนี้ยังช่วยในการวิเคราะห์เพศได้ด้วย ถ้าตรวจพบว่าโครโมโซมคู่เหมือนคู่ใดที่มีตำแหน่ง NORs เพียงโครโมโซมเดียวแสดงว่าโครโมโซมนั้นเป็นโครโมโซมเพศ (Schmid et al., 1993)

การย้อมแถบสีแบบ BrdU - replication banding เป็นวิธีการย้อมเพื่อช่วยในการตรวจสอบว่าโครโมโซมมีกลไกป้องกันการเกิด crossing over หรือไม่ ถ้าแถบสีที่พบของโครโมโซมคู่เหมือนไม่แตกต่างกัน แสดงว่าไม่มีวิวัฒนาการถึงขั้นที่มีการป้องกันการเกิด crossing over ตามสมมติฐานของโอโน (Ohno, 1967)

นอกจากที่กล่าวมาแล้วยังมีการย้อมแถบสีแบบ แถบคิว (Q - band) การย้อมแบบแถบอาร์ (R - band) การย้อมแบบแถบเอ็น (N - band) (Rudi et al., 1991) เป็นต้น

การศึกษาเซลล์พันธุศาสตร์ในต่างประเทศเกี่ยวกับโครโมโซมและคาริโอไทป์นั้น อุลเลริช (Ullerich, 1966) ศึกษาโครโมโซมของคางคก *Bufo bufo*, *B. viridis*, *B. bufo* x *B. viridis* และ *B. calamita* พบว่าคางคกทั้งหมดมีโครโมโซม $2n = 22$ เท่ากัน

วาสเซอร์แมนและโบการ์ท (Wasserman and Bogart, 1968) ศึกษาโครโมโซมของคางคก *Scaphiopus holbrookii hurterii* และ *S. couchii* พบว่าคางคกทั้งสองมีโครโมโซม $2n = 26$ เท่ากัน แต่มีคาริโอไทป์แตกต่างกัน นอกจากนี้ยังได้ศึกษาลูกผสมชั่วที่หนึ่ง ที่ได้จากการผสมระหว่างคางคก 2 ชนิด (*S. couchii* x *S. holbrookii hurterii*) พบว่ามีโครโมโซม $2n = 26$ เช่นเดียวกัน

ไทโมสกาและฟิชเบิร์ก (Tymoska and Fischberg, 1973) ศึกษาโครโมโซมของกบสกุล *Xenopus* 11 ชนิด ได้แก่ *X. laevis laevis*, *X. laevis peltersi*, *X. laevis victoreanus*, *X. (laevis) borealis*, *X. gilli*, *X. muelleri* และ *X. fraseri* พบว่ามีโครโมโซม $2n = 36$ เท่ากัน และ *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. bufonius*, *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 $2n = 22$ เท่ากันหมด ส่วน *L. marmoratus* มีโครโมโซม $2n = 24$ และอีก 2 ชนิด คือ *L. hylaelactylus* และ *L. andreae* มีโครโมโซม $2n = 26$ เท่ากัน จากการศึกษาดังกล่าว เขาได้แบ่งกบออกเป็น 3 กลุ่มคือ กลุ่มที่มีโครโมโซม 22, 24 และ 26 และได้ให้ข้อเสนอแนะว่ากลุ่มที่มีโครโมโซม 26 น่าจะเป็นบรรพบุรุษของพวกที่มีโครโมโซม 22 และ 24 และพวกที่อาศัยอยู่บนบก มีแนวโน้มที่จะไปอาศัยอยู่ในน้ำไม่ใช่พวกที่อาศัยอยู่ในน้ำขึ้นมาอาศัยอยู่บนบก ตามข้อเสนอของเฮย์เยอร์ (Heyer, 1969) และของลิงค์ (lynch, 1971, 1973)

ชมิท (Schmid, 1978a) ศึกษาโครโมโซมของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในวงศ์คางคก (Family Bufonidae) และวงศ์ปาดเมืองจีน (Family Hylidae) 22 ชนิด ได้แก่ คางคก *Bufo bufo*, *B. calamita*, *B. parvus*, *B. viridis*, *B. americanus*, *B. boreas*, *B. compactilis*, *B. fowleri*, *B. punctatus*, *B. terrestris*, *B. valliceps*, *B. arenarum*, *B. marinus*, *B. mouritaricus* และ *Pedostibes hosii* มีโครโมโซม $2n = 22$ อีก 4 ชนิด ได้แก่ ปาด *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 Leptodactylidae ได้แก่ *Eupsophus roseus* ซึ่งประชากรดังกล่าวได้มาจากที่แตกต่างกัน 3 แห่งของประเทศชิลี พบว่าประชากรทั้ง 3 แห่งมีโครโมโซม $2n = 30$ เท่ากันแต่มีคาริโอไทป์แตกต่างกัน

กูราโมโต (Kuramoto, 1980) ศึกษาโครโมโซมของกบเขียด 6 ชนิด ได้แก่ *Rana amurensis coreana*, *R. plancyi chosenica*, *R. latouchi*, *R. morina*, *Ooeidozyga laevis* พบว่ามีจำนวนโครโมโซม $2n = 26$ และ *R. kuhlii* มีโครโมโซม $2n = 22$ อีกรูปแบบ *Kaloula picta* มีโครโมโซม $2n = 28$ นอกจากนี้ยังพบว่าโครโมโซมคู่ที่ 8 ของ *R. marina* มีขนาดไม่เท่ากัน มีแนวโน้มที่เป็นไปได้ว่ามีโครโมโซมเพศในกบชนิดนี้

ฟอร์มาสและวีรา (Forma and Vera, 1983) ศึกษาโครโมโซมของกบ *Alsodes vauzolinii* และ *A. verucosus* พบว่ามีจำนวนโครโมโซม $2n = 26$ เท่ากัน แต่มีคาริโอไทป์ต่างกัน และไม่พบโครโมโซมเพศ

นิชิโอกะ และคณะ (Nishioka et al., 1987) ศึกษาโครโมโซมของกบ *Rana nigromaculata*, *R. brevipoda*, *R. plancyi chosenica*, *R. plancyi fukienensis*, *R. lessonae*, *R. pipines*, *R. japonica*, *R. tsushinensis*, *R. armuensis*, *R. temporaria* และ *R. sylvatica* พบว่ามีจำนวนโครโมโซม $2n = 26$ เท่ากัน และศึกษาโครโมโซมของ *R. omativentris*, *R. chensinensis* และ *R. dybowskii* พบว่ามีจำนวนโครโมโซม $2n = 24$ ทั้ง 3 ชนิด จากการศึกษากบเหล่านี้ไม่พบโครโมโซมเพศ

ชมิคและคณะ (Schmid et al., 1989) ได้ศึกษาโครโมโซมในกบ *Centrolenella antisthenesi* พบว่ามีจำนวนโครโมโซม $2n = 20$ และพบโครโมโซมเพศชนิด XY โดยโครโมโซม X และ Y โครโมโซม มีความยาวของโครโมโซมเท่ากันแต่มีอัตราส่วนของแขนโครโมโซมระหว่างแขนยาวต่อแขนสั้นต่างกัน คือโครโมโซม Y มีแขนข้างสั้น สั้นกว่าโครโมโซม X

ไอเทอร์ร่า และวีโลโซ (Iurra and Veloso, 1989) ศึกษาโครโมโซมในกบ *Eupsophus migueli* และ *E. roseus* พบว่ากบทั้งสองชนิดมีโครโมโซม $2n = 30$ เท่ากัน และพบโครโมโซมเพศชนิด XY ในกบ ชนิดแรกคือโครโมโซมคู่ที่ 14 เป็นโครโมโซมเพศชนิด XY โดยโครโมโซม X และ Y มีขนาดเท่ากัน แต่โครโมโซม X มีรูปร่างเป็นแบบเทโลเซนทริก (telocentric) ส่วนโครโมโซม Y มีรูปร่างเป็นแบบเมทาเซนทริก (metacentric) สำหรับกบ *E. roseus* เมื่อzoomแถบซีพบว่าโครโมโซมคู่ที่ 14 เป็นโครโมโซมแบบ XY โดยทั้งโครโมโซม X และ Y มีรูปร่างเป็นแบบเมทาเซนทริก แต่ในโครโมโซม Y ไม่มี constitutive heterochromatin บริเวณเซนโทรเมียร์ ส่วนโครโมโซม X มี constitutive heterochromatin บริเวณเซนโทรเมียร์

มาฮอนี (Mahony, 1991) ศึกษาคาริโอไทป์ของกบ *Crinia bilinea* พบว่ามีจำนวนโครโมโซม $2n = 24$ และพบว่ามีโครโมโซมเพศ โดยโครโมโซมคู่ที่ 12 เป็นโครโมโซมเพศแบบ ZW โดยโครโมโซม W มีรูปร่างเป็นแบบซับเมทาเซนทริก (submetacentric) ส่วนโครโมโซม Z มีรูปร่างเป็นแบบซับเทโลเซนทริก (subtelocentric) และมีขนาดเล็กกว่าโครโมโซม W

ชมิค และคณะ (Schmid et al., 1993) ศึกษาคาริโอไทป์ของกบ *Buergeria buergeria* ด้วยการzoomซี แถบซีและzoomด้วยซิลเวอร์ไนเตรท พบว่ามีโครโมโซม $2n = 26$ และพบโครโมโซมเพศในโครโมโซมคู่

ที่ 7 ซึ่งเป็นแบบ ZW ซึ่งโครโมโซมทั้ง Z และ W เป็นแบบขับเคลื่อนเทโลเซนทริก แต่พบว่าโครโมโซม W มี NORs บริเวณดังกล่าวนี้เป็น constitutive heterochromatin ซึ่งทั้งสองลักษณะนี้ไม่พบในโครโมโซม Z

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

การศึกษาเกี่ยวกับบริเวณนิวคลีโอลัสออร์แกไนเซอร์ (nucleolar organizer regions) หรือเอ็นโออาร์ (NORs)

ในต่างประเทศได้มีการศึกษากันในพวกกบ เขียด อึ่งอ่าง ปาด คางคก ดังนี้
ชมิค (Schmid, 1978 b) ศึกษาโดยย้อมแถบสีแบบต่างๆ ในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก 3 วงศ์ด้วยกัน ได้แก่ วงศ์กบเขียด วงศ์ปาด และวงศ์อึ่งอ่าง จากการย้อมแถบแบบซี และการย้อมแบบ Ag - NOR staining พบว่า

Rana sphenoccephalus มีโครโมโซม $2n = 26$ มี NORs 3 คู่ คือคู่ที่ 9 NORs ตั้งอยู่ที่แขนข้างยาว คู่ที่ 10 NORs ตั้งอยู่ที่แขนข้างยาว และคู่ที่ 13 NORs ตั้งอยู่ที่แขนข้างสั้น

R. palustris มีโครโมโซม $2n = 26$ มี NORs 5 คู่ คู่ที่ 6, 7 มี NORs ตั้งอยู่ปลายแขนข้างสั้นและข้างยาว คู่ที่ 10 NORs ตั้งอยู่ที่แขนข้างยาว และคู่ที่ 12 และ 13 NORs ตั้งอยู่ที่ปลายแขนข้างยาว

R. catesbeiana มีโครโมโซม $2n = 26$ มี NORs 3 คู่ คู่ที่ 8 และ 12 มี NORs ตั้งอยู่ที่ปลายแขนข้างสั้น และคู่ที่ 10 NORs ตั้งอยู่ที่แขนข้างยาว

R. emporaria มีโครโมโซม $2n = 26$ มี NORs 1 คู่ ตั้งอยู่ที่ปลายแขนข้างยาวของโครโมโซมคู่ที่ 10

R. erythraea มีโครโมโซม $2n = 26$ มี NORs 5 คู่ คู่ที่ 6 และ 10 มี NORs ตั้งอยู่ที่ปลายแขนข้างยาว คู่ที่ 8 NORs ตั้งอยู่ที่ปลายแขนข้างสั้นและข้างยาวคู่ที่ 11 และ 13 NORs ตั้งอยู่ที่ปลายแขนข้างสั้น

R. esculenta มีโครโมโซม $2n = 26$ NORs คู่เดียวอยู่ที่คู่ที่ 10 และตั้งอยู่ที่ปลายแขนข้างยาว ของโครโมโซม

Pyxicephalus delalandii มีโครโมโซม $2n = 26$ NORs มี 1 คู่ ตั้งอยู่ที่ปลายแขนข้างสั้นของโครโมโซมคู่ที่ 13

Kaloula pulchra มีโครโมโซม $2n = 28$ มี NORs 3 คู่ ตั้งอยู่ที่แขนข้างสั้นของโครโมโซมคู่ที่ 5, 11 และ 13

Chiromantis xelampelina มีโครโมโซม $2n = 26$ มี NORs 2 คู่ ตั้งอยู่ที่แขนข้างยาวของโครโมโซมคู่ที่ 12 และ 13

Leptopelis bocagei มีโครโมโซม $2n = 22$ มี NORs 1 คู่ ตั้งอยู่ที่แขนข้างสั้นของโครโมโซมคู่ที่ 13

Kassina wealii มีโครโมโซม $2n = 24$ มี NORs 1 คู่ ตั้งอยู่ที่แขนข้างยาวของโครโมโซมคู่ที่ 9

เบอร์สไตน์ และมาซิน (Birstein and Mazin, 1982) ศึกษาโครโมโซมและที่ตั้งของ NORs ในคางคก *Bufo bufo verrucosissima* พบว่ามีโครโมโซม $2n = 22$ มี NORs ตั้งอยู่ที่ปลายแขนข้างยาวของโครโมโซมคู่ที่ 6 และที่น่าสนใจคือ โครโมโซมคู่ดังกล่าวนี้ย้อมติด NORs เพียงโครโมโซมเดียว ซึ่งตามสมมติฐานแล้ว อาจเป็นโครโมโซมเพศของคางคกชนิดนี้

เบอร์สไตน์ (Birstein, 1984) ศึกษาที่ตั้งของ NORs ในคางคกโหว่ของกบ *Rana latastei*, *R. macrocnemius*, *R. nigromaculata* มีโครโมโซม $2n = 26$ และมี NORs ตั้งอยู่ที่แขนข้างยาวของโครโมโซมคู่ที่ 10 ซึ่งเป็นแบบจับเมทาเซนทริก ในกบ *R. nigromaculata* และ *R. latastei* และมี NORs ตั้งอยู่เกือบตรงกึ่งกลางของแขนข้างยาวซึ่งเกือบเป็นโครโมโซมแบบเมทาเซนทริกของโครโมโซมคู่ที่ 10 ของ *R. macrocnemius* ส่วน *R. chensinensis* มีโครโมโซม $2n = 24$ NORs ตั้งอยู่ที่แขนข้างยาวของโครโมโซมคู่ที่ 10 (หรือ 11)

ชมิทและคณะ (Schmid et al., 1988) ศึกษาโครโมโซมพวกสัตว์ในวงศ์ปลาเมืองจีน 4 ชนิดได้แก่ *Gastrotheca walkeri*, *G. ovifera* มีโครโมโซม $2n = 26$ โครโมโซมคู่ที่ 2 และคู่ที่ 1 เป็นโครโมโซม X และ Y ตามลำดับ NORs มีอยู่ 1 คู่ ตั้งอยู่ที่แขนข้างสั้นของโครโมโซมคู่ที่ 6 ใน *G. walkeri* และแขนข้างยาวของโครโมโซมคู่ที่ 6 ใน *G. ovifera* สำหรับ *G. fuscipes* มีโครโมโซม $2n = 26$ ไม่พบโครโมโซมเพศ มี NORs 1 คู่ ตั้งอยู่ที่ปลายแขนข้างสั้นของโครโมโซมคู่ที่ 6 ส่วน *Flectonotus pygmaeus* มีโครโมโซม $2n = 28$ ไม่พบโครโมโซมเพศ NORs มี 1 คู่ ตั้งอยู่ปลายสุดของแขนของโครโมโซมแบบอะโครเซนทริกคู่ที่ 2

เดอ อัลไมดา และคณะ (de Almeida et al., 1990) ศึกษาการโอโทปีด้วยการย้อมแถบสีแบบต่างๆ ของกบ *Hyperodius viridiflavus ommatostictus* พบว่ามีโครโมโซม $2n = 24$ จากการย้อมแถบสีแบบจีและแบบคิวพบว่า มี NORs 1 คู่ ตั้งอยู่ที่ปลายแขนข้างยาวของโครโมโซมแบบเมทาเซนทริกคู่ที่ 8 และไม่พบโครโมโซมเพศ

ชมิท และคณะ (Schmid et al., 1990) ศึกษาโครโมโซมและที่ตั้งของ NORs ด้วยการย้อมด้วย Ag-NOR staining ในปลา *Gastrotheca pseustes* พบว่ามีโครโมโซม $2n = 26$ NORs มี 1 คู่ ตั้งอยู่ที่แขนข้างยาวของโครโมโซมคู่ที่ 6 ใกล้กับบริเวณเซนโทรเมียร์

ชมิท และสไตน์ไลน์ (Schmid and Steinlein, 1991) ศึกษาโครโมโซมของ *Xenopus laevis* ด้วยการย้อมแถบสีแบบ BrdU – replication staining (5 – bromodeoxy uridine) ย้อมด้วย deoxythymidine (dT) และย้อมแบบ Ag – NOR staining พบว่ามีจำนวนโครโมโซม $2n = 36$ มี NORs 1 คู่ ตั้งอยู่ที่แขนข้างสั้นของโครโมโซมคู่ 12 ซึ่งเป็นที่อยู่ของรอยคอดที่สอง (secondary constriction) นอกจากนี้ยังพบโครโมโซมเพศแบบ ZW ในเพศเมียและ ZZ ในเพศผู้

การศึกษาเซลล์พันธุศาสตร์ของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในประเทศไทยมีการศึกษากันน้อยเพียงไม่กี่คน และเริ่มศึกษากันเมื่อไม่นานมานี้เอง โดยนงลักษณ์ นาคเกษม (2518) ศึกษาโครโมโซมของอึ่ง

น้ำเต้า *Microhyla ornata* เขียดอีโม *Rana limnocharis* และคางคกบ้าน *Bufo melanostictus* พบว่ามีโครโมโซม $2n = 24, 26$ และ 22 ตามลำดับ

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

ถาวร สุภาพร และคณะ (2534) ศึกษาโครโมโซมของเขียดจิก *Rana erythraea* และเขียดอีโม *R. limnocharis* พบว่ามีโครโมโซม $2n = 26$ เท่ากัน แต่มีรูปแบบของโครโมโซมแตกต่างกัน

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

ถาวร สุภาพร และคณะ (2535) ศึกษาโครโมโซมและคาริโอไทป์ของเขียดเหลือง *Rana lateris* และอึ่งแว่น *Calluella guttulata* พบว่ามีโครโมโซม $2n = 26$ เท่ากันแต่มีรูปแบบของโครโมโซมต่างกัน

ถาวร สุภาพร และคณะ (2537) ศึกษาโครโมโซมของอึ่งขาคำ *Microhyla pulchra* และอึ่งก้นจืด *Kaloula medilineata* พบว่ามีโครโมโซม $2n = 24$ และ 28 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังได้ศึกษาโครโมโซมของกบจุก *Rana pileata* โดยการย้อมสีแบบแถบจี พบว่ามีโครโมโซม $2n = 26$

วรวิทย์ จุฬาลักษณ์านุกูล และคณะ (2540) ได้ศึกษาโครโมโซมเพศของกบบูลฟร็อก *Rana catesbeiana* พบว่ามีโครโมโซม $2n = 26$ แต่ไม่พบโครโมโซมเพศ

ถาวร สุภาพร (2541) ศึกษาโครโมโซมด้วยการย้อมแถบจีของอึ่งปากขวด *Glyphoglossus molossus* และอึ่งบ้าน *Kaloula pulchra* พบว่ามีโครโมโซม $2n = 26$ และ 28 ตามลำดับ และมีคาริโอไทป์แตกต่างกัน

ถาวร สุภาพร และประจักษ์ จันทศรี (2542) ศึกษาโครโมโซมของเขียดจิกปากแหลม *Rana macrodactyla* และอึ่งกรายเอวจุด *Kalophrynus pleurostigma* พบว่ามีโครโมโซม $2n = 26$ เท่ากันแต่มีคาริโอไทป์แตกต่างกัน

ถาวร สุภาพร และคณะ (2543) ศึกษาจำนวนโครโมโซมของกบออกหนาม *Rana fasciculispina* และเขียดหลังป้อม *Phrynoglossus martensii* พบว่ามีโครโมโซม $2n = 26$ เท่ากันแต่มีคาริโอไทป์แตกต่างกัน

วรวิทย์ จุฬาลักษณ์านุกูล และคณะ (2544) ศึกษาโครโมโซมกบนา *Rana rugulosa* โดยการย้อมสีแบบธรรมดา ย้อมแถบจี ย้อมแถบจี ย้อม Ag – NOR และย้อมแบบ BrdU replication banding พบว่ามีโครโมโซม $2n = 26$ แต่ไม่พบโครโมโซมเพศ นอกจากนี้ยังได้ศึกษาโครโมโซมของคางคก 4 ชนิดคือ คางคกบ้าน *Bufo melanostictus* จงโคร่ง *B. asper* คางคกหัวราบ *B. macrotis* และคางคกแคระ *B. parvus* พบว่าคางคกทั้ง 4 ชนิดมีโครโมโซม $2n = 22$ เท่ากัน และมีรูปแบบของโครโมโซมคล้ายๆ กัน

ธวัช ดอนสกุล และอัจฉริยา รังษิรุจิ (2548) ศึกษาคาริโอไทป์ของกบภูเขา *Rana blythi* เขียดบัว *R. erythraea* เขียดกาญจนบุรี *R. leptoglossa* เขียดน้ำนอง *Occidozyga martensii* และอึ่งเผ้า *Glyphoglossus molossus* พบว่ามีโครโมโซม $2n = 26$ เท่ากัน ยกเว้นกบภูเขามีโครโมโซม $2n = 24$

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

1. อุปกรณ์และสารเคมี

1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

กล้องจุลทรรศน์แบบผสม

กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ

กล้องจุลทรรศน์พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพแบบอัตโนมัติ

ฟิล์มขาวดำฟอมาแพน ฟิล์มสีโคดัก 200 และฟิล์มโคดัก BW 400 CN

คาลิเปอร์เวอร์เนีย

จานเพาะเชื้อ (petri-dish)

หลอดหยดปลายแหลมพร้อมจุกยาง

ชุดเครื่องมือผ่าตัด

หลอดแก้ว (testube)

กระบอกตวง และกรวยกรองสาร

ภาชนะใส่สีย้อม (coplin jar)

ที่วางหลอดแก้ว

เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)

แปรงล้างขวด

ขวดดองตัวอย่าง

เข็มฉีดยาพร้อมกระบอกฉีดขนาด 1 มิลลิลิตร

ตู้กระจกขนาด 12 x 24 นิ้ว

กระจกสไลด์และกระจกปิดสไลด์

กล่องเก็บสไลด์

เครื่องอุ่นสไลด์ (Slide warmer)

ขวดบรรจุน้ำกลั่นพร้อมหัวพ่นล้างสไลด์

ตาชั่งแบบละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง (analytic balance)

กระดาษกรอง

ขวดหยด

1.2 สารเคมี

โคลชิซินความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์

กรดน้ำส้มถั่ว (glacial acetic acid)

เอทิลแอลกอฮอล์สัมบูรณ์ (absolute ethyl alcohol)

เอทิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์

เอทิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์

น้ำยาคงสภาพคาร์นอย (Carnoy's fixative) ประกอบด้วยกรดน้ำส้มถั่ว 1 ส่วน และเอทิลแอลกอฮอล์สัมบูรณ์ 3 ส่วน

โพแทสเซียมคลอไรด์ (potassium chloride) 0.075 เปอร์เซ็นต์

ไดเบสิกโซเดียมฟอสเฟต (dibasic sodium phosphate) 9.465 กรัมกับน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร

โพแทสเซียม แอซิด ฟอสเฟต (potassium acid phosphate) 9.07 กรัมกับน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร

ซอเรนเสน ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ (Sorensen's phosphate buffer) ประกอบด้วยสารละลายไดเบสิกโซเดียมฟอสเฟตต่อสารละลายโพแทสเซียม แอซิด ฟอสเฟตในอัตราส่วน 1:1

สีซ็อมกิมซา (Giemsa's stain) (สีซ็อมของเมอร์ค 4 มิลลิลิตรรวมกับซอเรนเสน ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ 100 มิลลิลิตร)

น้ำยาผนึกเพอร์แมนท์ (permount)

ฟอร์มาลิน 10 เปอร์เซ็นต์

ซิลเวอร์ไนเตรท (silver nitrate) 50 % (ซิลเวอร์ไนเตรท 50 กรัม ละลายในน้ำกลั่นบริสุทธิ์ที่ปราศจากไอออน 100 มิลลิลิตร)

น้ำยาคีเวลอปเปอร์ (developer solution) ประกอบด้วยเจลาติน (gelatin) 2 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร และกรดฟอร์มิก (formic acid) 1 มิลลิลิตร

ไซลีน (xylene)

อีเทอร์

เอทิลแอลกอฮอล์ 50 เปอร์เซ็นต์

เอทิลแอลกอฮอล์ 30 เปอร์เซ็นต์

น้ำกลั่น

2. วิธีดำเนินการ

2.1.1 ศึกษาเอกสารแหล่งที่พบ และแหล่งแพร่กระจายของกบนา อึ่งขาง และคางคกที่จะนำมาใช้ในการวิจัย

2.1.2 ติดต่อพ่อค้าที่นำกบ เขียด มาขายที่ตลาดนัดจตุจักร และตลาดนัด อำเภอเมือง จังหวัดนครนายก เพื่อให้หาตัวอย่างกบนา อึ่งขาง หรืออึ่งอ่างบ้าน คางคกหรือคางคกบ้าน โดยกำชับให้บอกถึงแหล่งที่มาของตัวอย่างดังกล่าว

2.1.3 นำตัวอย่างที่ได้มาบรรจุในถุงพลาสติกใส่น้ำให้เปียกชื้นเพียงเล็กน้อย อัดออกซิเจน นำกลับมายังห้องปฏิบัติการแล้วปล่อยลงในตู้กระจกขนาด 12 x 14 นิ้ว หล่อตู้กระจกด้วยน้ำสูงประมาณ 1 นิ้ว มีก้อนอิฐวางไว้เป็นระยะเพื่อให้เป็นที่ขึ้นมานั่ง ปล่อยตัวอย่างตู้ละประมาณ 5 – 6 ตัว ปิดตู้กระจกด้วยมุ้งไนลอน ตัวอย่างดังกล่าวเก็บรวบรวมตั้งแต่เดือนมิถุนายน 2546 ถึงเดือนธันวาคม 2546 เป็นเวลาประมาณ 7 เดือน

2.1.4 กบ อึ่งขาง คางคกที่เลี้ยงไว้ให้อาหารจำพวกหนอนนก (milk worm) วันละครั้ง

2.1.5 กบนา อึ่งขาง และคางคกที่เลี้ยงไว้เพื่อนำมาใช้ในการวิจัย มีจำนวน เพศ และแหล่งที่ได้มา มีรายละเอียดดังแสดงในตาราง 1

ตาราง 1 จำนวนแหล่งที่เก็บรวบรวมตัวอย่างกบนา อึ่งขาง และคางคก ที่นำมาใช้ในการศึกษา
คาร์ิโอไทป์ และ NORs

ชนิดของสัตว์	จำนวน (ตัว)		แหล่งที่มาของตัวอย่าง	
	เพศผู้	เพศเมีย	อำเภอ	จังหวัด
กบนา	5	3	บ้านนา	นครนายก
	2	4	ปากพลี	นครนายก
	3	2	มวกเหล็ก	สระบุรี
อึ่งขาง	2	1	บางกะปิ	กรุงเทพมหานคร
	5	3	เมือง	สมุทรสาคร
	2	3	บางเขน	กรุงเทพมหานคร
คางคก	1	2	วัฒนา	กรุงเทพมหานคร
	7	3	บางเขน	กรุงเทพมหานคร
	2	3	บ้านนา	นครนายก
	2	5	เมือง	สมุทรสาคร

3. การวินิจฉัย และตรวจสอบชื่อวิทยาศาสตร์ของกบนา อีงยาง และคางคก

นำตัวอย่างที่เก็บรวบรวมมาได้ชนิดละ 3-4 ตัว นำด้วยอีเทอร์ ดองด้วยฟอร์มาลิน 10 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 2-3 วัน จากนั้นจึงเปลี่ยนเก็บดองไว้ในเอทิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เพื่อใช้ในการวินิจฉัย และตรวจสอบความถูกต้องของชื่อวิทยาศาสตร์ โดยถือตามแนวของเทเลอร์ (Taylor, 1962) วิโรจน์ นุตพันธุ์ (2544)

4. ลักษณะทางสัณฐานวิทยาบางประการของกบนา อีงยาง และคางคก

ตัวอย่างกบนา อีงยาง และคางคกที่ใช้ในการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา เป็นตัวอย่างที่ผ่านการเตรียมโครโมโซมมาแล้ว โดยตัวอย่างทั้งกบนา อีงยาง และคางคกดองเก็บไว้ในเอทิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ ภายหลังดองในฟอร์มาลิน 10 เปอร์เซ็นต์มาแล้วเป็นเวลา 2-3 วัน นำกบนา อีงยาง และคางคกที่ดองไว้มาวัดหาขนาดความยาวของลำตัว (head body length) ความยาวหัว (head length) ความยาวขาหน้า (fore limb length) ความยาวขาหลัง (hind limb length) การวัดดังกล่าวถือตามแนวของเทเลอร์ (Taylor, 1962) วิโรจน์ นุตพันธุ์ (2544) และธัญญา จันอาจ (2546)

การวัด

ความยาวลำตัว วัดจากปลายสุดของปากถึงรูก้น

ความยาวหัว วัดจากปลายสุดของปากถึงขอบด้านท้ายแผ่นหู (tympanic membrane)

ความยาวขาหน้า วัดจากข้อมุมขาหน้าไปยังข้อเท้าขาหน้า

ความยาวขาหลัง วัดจากรูก้นไปยังข้อเท้าของขาหลัง

5. การศึกษา kariotype

โครโมโซมที่ใช้ในการศึกษา kariotype ได้มาจากโครโมโซมของการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสในระยะเมทาเฟสของเซลล์จากเนื้อเยื่อตับ

5.1 การเตรียมโครโมโซมจากเนื้อเยื่อตับ

ดัดแปลงมาจากเทคนิคและวิธีการของอีดาและคิโ (Ida and Kyo, 1980) ซึ่งพอสรุปเป็นขั้น ๆ ได้ดังนี้

5.1.1 นำกบนา อีงยาง และคางคกแต่ละชนิดที่เลี้ยงไว้มาฉีดด้วยโคลชิซินที่มีความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ เข้าที่บริเวณช่องท้องในปริมาณ 0.1 มิลลิลิตรต่อน้ำหนักตัวประมาณครึ่งกรัม ครั้งละตัวต่อชนิด นำกบ อีงยาง และคางคกที่ฉีดโคลชิซินแล้วปล่อยไว้ในตู้กระจกหล่อด้วยน้ำเล็กน้อย ปล่อยไว้เป็นเวลาประมาณ 9-23 ชั่วโมง

5.1.2 นำคบนาน้ำอย่าง และคางคกที่ฉีดด้วยโคลชิซินและครบเวลาแล้วมาฆ่าด้วยอีเทอร์ หรือแช่ด้วยน้ำแข็งเป็นเวลาประมาณ 20 นาที หรือจนตาย ใช้กรรไกรขลิบเปิดช่องท้องใช้ปากคีบดึงเอาตับแช่ลงในสารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ 0.075 เปอร์เซ็นต์ซึ่งบรรจุในงานเพาะเชื้อ ถ้างหลาย ๆ ครั้ง เพื่อชะล้างสิ่งสกปรกและเลือดออกจากตับ

5.1.3 ใช้ปากคีบ คีบเอาตับที่แช่อยู่ในงานเพาะเชื้อขึ้นวางบนกระจกสไลด์ หยดสารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ลงไปเล็กน้อย ใช้มีดผ่าตัดตัดตับให้ละเอียด แล้วใช้หลอดหยดดูดโพแทสเซียมคลอไรด์ล้าง นำลงแช่ในงานเพาะเชื้อ ปลอยทิ้งไว้เป็นเวลาประมาณ 45 นาที เพื่อให้เซลล์บวมและแตกได้ง่าย

5.1.4 ดูดเอาตับในงานเพาะเชื้อใส่ลงในหลอดแก้ว นำหลอดแก้วเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงโดยใช้ความเร็วประมาณ 800 – 1,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที

5.1.5 ดูดน้ำใส ๆ ที่อยู่ด้านบนของหลอดแก้วทิ้งไป เหลือไว้แต่ส่วนที่เป็นตะกอนก้นหลอด แล้วดูคูน้าคางสภาพการนอยซึ่งประกอบด้วยเอทิลแอลกอฮอล์สัมบูรณ์ 3 ส่วน ต่อกรดน้ำส้มกล้วน 1 ส่วนลงไปแทนที่ ตั้งไว้เป็นเวลาประมาณ 25 นาที แล้วนำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงใช้ความเร็วต่อรอบเท่าเดิมเป็นเวลา 5 นาที

5.1.6 ดูดน้ำคางสภาพการนอยออก เติมน้ำคางสภาพใหม่ลงไปแทนที่ แล้วนำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงอีก โดยใช้ความเร็วต่อรอบและเวลาเท่าเดิม ปฏิบัติเช่นนี้อีก 1 ครั้ง รวมเป็น 4 ครั้ง

5.1.7 ดูดตะกอนที่ก้นหลอด หยดลงบนกระจกสไลด์ที่สะอาด 1-2 หยด และผึ่งไว้ให้แห้งสนิทในอากาศ

5.1.8 นำสไลด์ที่มีเซลล์แห้งสนิทแล้วลงย้อมในสีซ็อมกิมซา 4 เปอร์เซ็นต์ในซอเรนเสน ฟอสเฟต บัปเฟอร์ ใช้เวลาในการย้อมประมาณ 20-30 นาที หรือจนกระทั่งเห็นโครโมโซมย้อมติดสีชัดเจน ถ้างสไลด์ด้วยน้ำกลั่นและผึ่งไว้ให้แห้งสนิทในอากาศ

5.1.9 นำสไลด์ที่ผึ่งไว้จนแห้งดีแล้วไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ สุ่มหาเซลล์ที่มีกลุ่มของโครโมโซมแผ่กระจายดี มีรูปร่างลักษณะดี ทำเครื่องหมายกลุ่มโครโมโซมที่แผ่กระจายดีไว้สำหรับนำไปใช้ในการถ่ายภาพ และใช้ในการย้อมด้วยซิลเวอร์ไนเตรท (AgNO_3) เพื่อหาบริเวณนิวคลีโอลัสออร์แกไนเซอร์ (nucleolar organizer regions) หรือเอ็นโออาร์ (NORs) เก็บสไลด์ดังกล่าวไว้ในกล่องเก็บสไลด์ เพื่อป้องกันมิให้ฝุ่นหรือสิ่งสกปรกต่าง ๆ ตกลงเกาะบนสไลด์

5.2 การถ่ายรูปโครโมโซม

นำสไลด์ที่เตรียมไว้แล้วในข้อ 5.1.9 ไปตรวจหาโครโมโซมที่ทำเครื่องหมายไว้ด้วยกล้องจุลทรรศน์ สำหรับใช้ถ่ายภาพแบบ BH-2 ของโอลิมปัส บันทึกภาพไว้ด้วยกล้องถ่ายภาพพร้อมอุปกรณ์ควบคุมแสงแบบอัตโนมัติ PM 20 โดยใช้เลนส์วัตถุกำลังขยาย 100 เท่า เลนส์ถ่ายภาพ

(photo eye piece) กำลังขยาย 5 เท่า บันทึกภาพไว้ด้วยฟิล์มขาวดำฟอร์มาแพน (Forma pan) ฟิล์มโกดัก (Kodak BW 400 CN) โดยถ่ายภาพกบนา อึ่งขาง และคางคกตัวละ 3-5 กลุ่มเซลล์จนครบทุกชนิด

5.3 การวิเคราะห์โครโมโซม

5.3.1 การหาจำนวนโครโมโซม

นำเอาฟิล์มของกบนา อึ่งขาง และคางคกที่บันทึกไว้ด้วยฟิล์มขาวดำไปล้างอัดขยายที่ร้านไฟศาลโฟโต้ ถนนแจ้งวัฒนะ ตำบลอนุสาวรีย์ เขตบางเขน กรุงเทพมหานคร โดยอัดขยายภาพขนาด 4 x 6 นิ้ว หรือภาพโปสการ์ด นำภาพเหล่านี้มานับจำนวนโครโมโซม ความถี่ของจำนวนโครโมโซมที่นับได้สูงสุด (mode) ของสัตว์แต่ละชนิดถือเป็นจำนวนโครโมโซมแบบดิพลอยด์ (2n) ของสัตว์ชนิดนั้น

5.3.2 การวัดโครโมโซมและการจัดคาริโอไทป์

เลือกรูปที่มีจำนวนโครโมโซมเท่ากัน มีรูปร่างลักษณะและการแผ่กระจายดีที่สุดจำนวน 5 กลุ่มเซลล์มาวัดหาขนาดความยาวแขนโครโมโซมด้วยคาลิเปอร์เวอร์เนียร์ ตรวจสอบความถูกต้องโดยการวัดฟิล์มด้วยออกคูตาร์ไมโครมิเตอร์ (ocular micrometer) เทียบกับการวัดด้วยคาลิเปอร์เวอร์เนียร์ว่าได้เท่ากันหรือใกล้เคียงกันหรือไม่ เมื่อเห็นว่าได้ค่าเท่ากันหรือใกล้เคียงกันแล้วจึงวัดฟิล์มและภาพขยายด้วยคาลิเปอร์เวอร์เนียร์ โดยวัดความยาวแขนโครโมโซมจากตำแหน่งเซนโทรเมียร์ คือตำแหน่งรอยคอดของโครโมโซมไปยังปลายแขนทั้งสองข้างของโครโมโซม ค่าตัวเลขที่วัดได้ถ้าน้อยกว่าถือเป็นแขนข้างสั้น ถ้ามากกว่าถือเป็นแขนข้างยาว ปฏิบัติเช่นเดียวกันนี้กับกบนา อึ่งขาง และคางคกจนครบทั้ง 5 กลุ่มโครโมโซม หรือจากกลุ่มโครโมโซมจากทั้ง 5 เซลล์ แล้วหาค่าเฉลี่ย จากนั้นจึงคำนวณหาอัตราส่วนระหว่างแขนยาวต่อแขนสั้น (arm ratio) ตามวิธีของลีเวนและคณะ (Levan et al., 1964) เพื่อแบ่งชนิดของโครโมโซมตามอัตราส่วนที่ปรากฏตามตาราง 2

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

อัตราส่วนระหว่าง แขนยาวต่อแขนสั้น	ชนิดของโครโมโซม	สัญลักษณ์
1.0 – 1.7	metacentric	m
1.7 – 3.0	submetacentric	sm
3.0 – 7.0	subtelocentric	st
7.0 – ∞	acrocentric	t

จับคู่โครโมโซมคู่เหมือน (homologous chromosome) โดยอาศัยค่าอัตราส่วนระหว่างแขนยาวต่อแขนสั้นที่เท่ากันหรือใกล้เคียงกันมากที่สุด ความยาวของโครโมโซมที่เท่ากันหรือใกล้เคียงกันประกอบด้วยลักษณะที่คล้ายคลึงกันมากที่สุด แล้วตัดภาพโครโมโซมจากรูปขยายขนาด 4 x 6 นิ้ว จัดเรียงคาร์ิโอไทป์โดยเรียงตามลำดับจากโครโมโซมคู่ที่ยาวที่สุดหรือใหญ่ที่สุดไปหาคู่ที่สั้นที่สุดหรือเล็กที่สุด โดยให้แขนข้างสั้นอยู่ด้านบน แขนด้านยาวอยู่ด้านล่าง จากเมทาเซนตริก (metacentric) ไปเป็นซับเมทาเซนตริก ซับเทโลเซนตริก (subtelocentric) และอะโครเซนตริก หรือเทโลเซนตริก (acrocentric หรือ telocentric) ตามแนวของ เซสตารี และกาเลตตี (Cestari and Galetti, 1992)

5.3.3 การหาจำนวนแขนโครโมโซม (fundamental number หรือ arm number หรือ NF)

จำนวนแขนโครโมโซมแบ่งออกเป็น 2 พวก คือ พวกที่โครโมโซมมี 2 แขน (biarmed group) ได้แก่ โครโมโซมแบบเมทาเซนตริก ซับเมทาเซนตริก และซับเทโลเซนตริก กับ พวกที่มีแขนเดียว ได้แก่ โครโมโซมแบบอะโครเซนตริก หรือเทโลเซนตริก

5.3.4 การหาขนาดโครโมโซม (chromosome size)

ถือเอาตามวิธีของอุลเลริช (Ullrich, 1966) โดยแบ่งโครโมโซมออกเป็น 2 พวก คือ พวกที่มีขนาดใหญ่ กับพวกที่มีขนาดเล็ก พวกที่มีขนาดใหญ่คือพวกที่โครโมโซมยาวเกินครึ่งหนึ่งของคู่โครโมโซมหรือโครโมโซมคู่เหมือนที่ยาวที่สุด ส่วนที่เหลือจัดเป็นพวกที่มีขนาดเล็ก

5.3.5 การสร้างอิดิโอแกรม (idiogram)

คำนวณหาค่าเฉลี่ยความยาวแขนสั้นของโครโมโซม (short arm length หรือ p) ความยาวแขนยาว (long arm length หรือ q) อัตราส่วนระหว่างแขนยาวต่อแขนสั้น (q/p) ของโครโมโซมคู่เหมือน ด้วยวิธีนี้ทำให้เราได้ค่าเฉลี่ยต่างๆ ของโครโมโซมคู่เหมือน (chromosome pair) ปฏิบัติเช่นเดียวกันนี้กับกลุ่มโครโมโซมที่เหลืออีก 4 กลุ่ม รวมเป็น 5 กลุ่มเซลล์ ด้วยวิธีดังกล่าวนี้ทำให้เราได้ค่าเฉลี่ยความยาวแขนสั้น ความยาวแขนยาว ความยาวทั้งแขนหรือความยาวสมบูรณ์ (total length หรือ absolute length) (แขนสั้นบวกแขนยาว) อัตราส่วนระหว่างแขนยาวต่อแขนสั้น และชนิดของโครโมโซม (chromosome type) นำค่าเฉลี่ยที่ได้ดังกล่าวมาเขียนเป็นอิดิโอแกรม โดยเรียงลำดับจากโครโมโซมคู่เหมือนที่ยาวที่สุดไปหาคู่ที่สั้นที่สุด โดยให้แขนสั้นตั้งขึ้นด้านบน แขนยาวอยู่ด้านล่างจากโครโมโซมแบบ เมทาเซนตริกไปเป็นซับเมทาเซนตริก ซับเทโลเซนตริก และอะโครเซนตริกหรือ เทโลเซนตริก ตามลำดับ ตามวิธีของ เซสตารี และกาเลตตี (Cestari and Galetti, 1992) ให้ตำแหน่งของเซนโทรเมียร์อยู่ในแนวเดียวกัน โดยใช้อัตราส่วนความยาว 1 เซนติเมตร ต่อความยาวโครโมโซม 1 ไมโครเมตร (micrometer หรือ μm) โดยให้แกนอนหรือแกน x เป็นคู่โครโมโซมหรือโครโมโซมคู่เหมือน แกนตั้ง หรือแกน y เป็นแกนความยาว

โครโมโซมแบบสัมบูรณ์ (total length หรือ absolute length หรือความยาวจริงตามธรรมชาติ) หรือ ความยาวสัมพัทธ์ (relative length) ซึ่งจะกล่าวถึงต่อไป ปฏิบัติเช่นเดียวกันกับกบนา อีซาง และ คางคก

6. การหาความยาวสัมพัทธ์ (relative length หรือ RL) จากความยาวสัมบูรณ์

หาได้จากความยาวทั้งแขนหรือความยาวสัมบูรณ์ของโครโมโซมแต่ละคู่หรือโครโมโซมคู่เหมือนแต่ละคู่ คูณด้วย 100 หารด้วยผลบวกโครโมโซมคู่เหมือนแต่ละคู่ที่เป็นแบบแฮพลอยด์หรือเขียนเป็นสูตรได้ดังนี้

$$RL = \frac{\text{ความยาวสัมบูรณ์ของโครโมโซมคู่เหมือน} \times 100}{\text{ผลบวกของโครโมโซมหรือโครโมโซมคู่เหมือนแบบแฮพลอยด์}}$$

7. การหาบริเวณนิวคลีโอลัสออร์แกไนเซอร์ (nucleolar organizer regions หรือ NORs)

7.1 การเตรียมสไลด์ ดัดแปลงจากวิธีของโฮเวลล์และแบล็ก (Howell and Black, 1980)

7.1.1 นำสไลด์ที่ผ่านการถ่ายรูปโครโมโซมมาแล้วในข้อ 5.2 ที่ทำเครื่องหมายมาแล้ว ถ้างาบน้ำมันซีดาร์ (cedar oil) ออกด้วยไซลิน 2 ซ้ำ ใช้เวลาซ้ำละประมาณ 10 นาที

7.1.2 ถ่ายสไลด์จากไซลินซ้ำที่ 2 ลงในเอทิลแอลกอฮอล์สัมบูรณ์ 2 ซ้ำ ๆ ละ 5 นาที

7.1.3 นำน้ำผ่านเข้าสู่โครโมโซม (hydration) โดยผ่านสไลด์ต่อลงในเอทิลแอลกอฮอล์ 95%, 70%, 50%, 30% และน้ำกลั่น ใช้เวลาขั้นละ 1-2 นาที แล้วผึ่งสไลด์ไว้ให้แห้งในอากาศ

7.1.4 นำสไลด์ในข้อ 7.1.3 ขึ้นวางบนเครื่องอุ่นสไลด์ซึ่งตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 60 °C หยดซิลเวอร์ไนเตรท (AgNO₃) ความเข้มข้น 50% ลงไป 1 หยด ตรงกลุ่มโครโมโซมที่ทำเครื่องหมายไว้แล้ว และหยดน้ำยาคีเวลอปเปอร์ (developer) ตามลงไป 2 หยดในที่เดียวกัน ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ ปลอ่ยสไลด์ไว้เป็นเวลาประมาณ 5-7 นาที หรือจนมองเห็นเป็นสีเขียวแกมเหลืองหรือสีซีมัว นำเอาสไลด์ที่มีสีดังกล่าวออกจากเครื่องอุ่นสไลด์ ค่อย ๆ ปลอ่ยน้ำกลั่นให้ไหลผ่านกระจกปิดสไลด์ เพื่อให้กระจกปิดสไลด์หลุดออกแล้วล้างด้วยน้ำกลั่นอย่างรวดเร็ว ผึ่งสไลด์ไว้ให้แห้งสนิทในอากาศ

7.2 การถ่ายรูปโครโมโซมที่มี NORs

หยดน้ำยาคีเวลอปเปอร์บนที่ตรงบริเวณที่มีโครโมโซมซึ่งทำเครื่องหมายไว้แล้ว ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ นำสไลด์ไปตรวจหาโครโมโซมตรงตำแหน่งที่ทำเครื่องหมายไว้ ซึ่งเป็น

โครโมโซมกลุ่มเดียวกันกับที่ใช้ในการจัดการโอไทป์ เมื่อพบกลุ่มโครโมโซมที่ติดสีเหลืองเข้ม มีจุดสีดำเข้ม หรือแถบสีดำติดอยู่บนโครโมโซมให้บันทึกกลุ่มโครโมโซมดังกล่าวไว้ด้วยฟิล์มถ่ายรูป เช่นเดียวกับที่กล่าวมาแล้วในตอนต้น ปฏิบัติเช่นเดียวกันนี้จนครบ 8 กลุ่มโครโมโซมหรือโครโมโซมจาก 8 เซลล์ ปฏิบัติเช่นเดียวกันนี้กับสัตว์ที่ศึกษาจนครบทุกชนิด

7.3 การวิเคราะห์ NORs

7.3.1 นำฟิล์มที่บันทึกไว้ไปอัดขยายให้มีขนาด 4x6 นิ้ว นำรูปที่ได้จากการอัดขยายมาหาบริเวณนิวคลีโอลัสหรือแกนเซอร์หรือ NORs ของโครโมโซมคู่เหมือน โดย NORs จะย้อมติดด้วยซิลเวอร์ในเตรทเป็นสีดำเข้มบนโครโมโซมที่มีสีเหลืองเข้มโดยทำการเปรียบเทียบกับรูปที่ถ่ายไว้ในตอนหาการโอไทป์ นับจำนวน NORs ของโครโมโซมคู่เหมือนว่ามีจำนวนกี่คู่แล้ว บันทึกผล

7.3.2 นำภาพการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสที่ย้อมด้วยซิลเวอร์ในเตรทเปรียบเทียบกับการย้อมด้วยสีย้อมกิมซาโดยให้ภาพที่ย้อมด้วยสีกิมซาอยู่ด้านบนซ้าย ภาพที่ย้อมด้วยซิลเวอร์ในเตรทอยู่ด้านล่างขวา

7.3.3 คัดโครโมโซมคู่เหมือนที่มี NORs ไปจัดไว้ได้คู่โครโมโซมคู่เหมือนที่ย้อมด้วยสีย้อมกิมซาที่จัดการโอไทป์ไว้แล้ว

7.4 การสร้างอิดิโอแกรม

ใช้อิดิโอแกรมเดียวกันกับที่สร้างมาแล้วใน 5.3.5 โดยเพิ่มส่วนที่เป็น NORs เข้าไปที่โครโมโซม โดยให้วงกลมสีดำเข้มแทน NORs ซึ่งอยู่บริเวณสีขาวของรอยคอดที่สอง

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

กบนา อึ่งยาง และคางคก ที่ใช้ในการศึกษาโครโมโซมและบริเวณนิวคลีโอไลัสของแกโนเซอร์ หรือ NORs มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาบางประการปรากฏดังในตาราง 3

ตาราง 3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาบางประการของ กบนา *Ranatigerina* อึ่งยาง *Kaloula pulchra* และคางคก *Bufo melanostictus* จำนวนชนิดละ 10 ตัว

ชนิดของสัตว์	ความยาวหัว (ซ.ม.) (เฉลี่ย) $\pm$ SD	ความยาวลำตัว(ซ.ม.) (เฉลี่ย) $\pm$ SD	ความยาวขาหน้า (ซ.ม.) (เฉลี่ย) $\pm$ SD	ความยาวขาหลัง (ซ.ม.) (เฉลี่ย) $\pm$ SD
กบนา	2.3 $\pm$ 0.324	6.2 $\pm$ 1.207	1.6 $\pm$ 0.348	4.3 $\pm$ 0.618
อึ่งยาง	1.6 $\pm$ 0.273	5.1 $\pm$ 0.631	1.6 $\pm$ 0.296	3.6 $\pm$ 0.527
คางคก	2.2 $\pm$ 0.548	6.5 $\pm$ 0.986	2.4 $\pm$ 0.641	4.7 $\pm$ 0.916

ผลการศึกษาโครโมโซมและ NORs ของกบนา อึ่งยาง และคางคก พบว่า

กบนา *R. tigerina* มีความถี่ในการกระจายของจำนวนโครโมโซมแบบดิพลอยด์ (2n) สูงสุดอยู่ที่ 2n = 26 จำนวน 70 เซลล์ จากจำนวนเซลล์ที่นับรวมทั้งหมด 71 เซลล์ คิดเป็น 98.59 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นกบนาจึงมีจำนวนโครโมโซมแบบดิพลอยด์ 2n = 26 ตามตาราง 4 และ 5 ภาพประกอบ 3A , 3B และ 4A , 4B ครีโอลโซมประกอบด้วยโครโมโซมแบบเมทาเซนทริก 7 คู่ ซับเมทาเซนทริก 5 คู่ และอะโครเซนทริกหรือเทโลเซนทริก 1 คู่ ตามตาราง 5 และ 6 ภาพประกอบ 3C, 4C และ 5 จำนวนแกนโครโมโซม (NF) เท่ากับ 52 ตามตาราง 5 ลักษณะที่สำคัญคือมีรอยคอดที่สอง (secondary constriction) อยู่ที่แขนข้างยาวของโครโมโซมแบบซับเมทาเซนทริกคู่ที่ 5 ซึ่งเป็น marker chromosome ของกบชนิดนี้ ดังภาพประกอบ 3A, 3C และ 4A, 4 C โครโมโซมมีความยาวทั้งแขน (total length หรือ T) หรือความยาวแขนแบบสัมบูรณ์ (absolute length) ตั้งแต่ 1.922 – 7.554 ไมโครเมตร (micrometer) เฉลี่ย 3.778 ไมโครเมตร โครโมโซมมีความยาวสัมพัทธ์ (relative length หรือ RL)ตั้งแต่ 2.91 – 16.93 เปอร์เซ็นต์ เฉลี่ย 7.69 เปอร์เซ็นต์ โครโมโซมขนาดใหญ่มี 5 คู่ ได้แก่ โครโมโซมคู่ที่ 1, 2, 3, 8 และ 9 โครโมโซมขนาดเล็กมี 8 คู่ ได้แก่ คู่ที่ 4, 5, 6, 7, 10, 11, 12 และ 13 ตามตาราง 6 และ 9

ผลการศึกษา NORs ของกบ พบว่า มีความถี่ของจำนวน NORs กระจายสูงสุดอยู่ที่จำนวน 1 คู่จำนวน 8 เซลล์จากจำนวนเซลล์ที่นับรวมทั้งหมด 8 เซลล์คิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นกบนาจึงมี NORs จำนวน 1 คู่ ตั้งอยู่ที่แขนข้างยาวของโครโมโซมแบบซับเมทาเซนทริกคู่ที่ 5 (5 smq) ตามตาราง 10 และ 11 ภาพประกอบ 3B, 3C, 4B, 4C และ 5

อึ้งยาง หรืออึ้งยางบ้าน *K. pulchra* มีความถี่ในการกระจายของจำนวนโครโมโซมแบบดิพลอยด์ ($2n$) สูงสุดอยู่ที่ $2n = 28$ จำนวน 60 เซลล์ จากจำนวนเซลล์ที่นับรวมทั้งหมด 61 เซลล์ คิดเป็น 98.36 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นอึ้งยางจึงมีจำนวนโครโมโซมแบบดิพลอยด์ $2n = 28$ ตามตาราง 4 และ 5 ภาพประกอบ 6A, 6B และ 7A, 7B คาร์ิโอไทป์ประกอบด้วยโครโมโซมแบบเมทาเซนทริก 9 คู่ ซับเมทาเซนทริก 3 คู่ ซับเทโลเซนทริก 2 คู่ ตามตาราง 5 และ 7 ภาพประกอบ 6C, 7C และ 8 จำนวนแขนโครโมโซม (NF) เท่ากับ 56 ตามตาราง 5 ลักษณะที่สำคัญคือมีรอยคอดที่สองอยู่ที่แขนข้างสั้นของโครโมโซมแบบเมทาเซนทริกคู่ที่ 5 ซึ่งเป็น marker chromosome ของอึ้งยาง ดังภาพประกอบ 6A, 6C และ 7A, 7C โครโมโซมมีความยาวทั้งแขนหรือความยาวแขนแบบสัมบูรณ์ตั้งแต่ 1.898-7.140 ไมโครเมตร เฉลี่ย 3.742 ไมโครเมตร โครโมโซมมีความยาวสัมพัทธ์ (RL) ตั้งแต่ 3.91-14.69 เปอร์เซ็นต์ เฉลี่ย 7.14 เปอร์เซ็นต์ โครโมโซมขนาดใหญ่มี 6 คู่ ได้แก่โครโมโซมคู่ที่ 1, 2, 3, 4, 5 และ 10 โครโมโซมขนาดเล็กมี 8 คู่ ได้แก่โครโมโซมคู่ที่ 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13 และ 14 ตามตาราง 7 และ 9

ผลการศึกษา NORs ของอึ้งยางพบว่า มีความถี่ของจำนวน NORs กระจายสูงสุดอยู่ที่จำนวน 3 คู่ จำนวน 7 เซลล์ จากจำนวนเซลล์ที่นับรวมทั้งหมด 8 เซลล์ คิดเป็น 87.50 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นอึ้งยางจึงมี NORs จำนวน 3 คู่ตั้งอยู่ที่ปลายแขนข้างสั้น (p) ของโครโมโซมแบบเมทาเซนทริกคู่ที่ 5 คู่ที่ 8 (5mp, 8mp) และที่ปลายสุดของแขนข้างยาว (q) ของโครโมโซมแบบซับเทโลเซนทริกคู่ที่ 1 (1st q ter) ตามตาราง 10 และ 11 ภาพประกอบ 6B, 6C, 7B, 7C และ 8

คางคกหรือคางคกบ้าน *B. melanostictus* มีความถี่ในการกระจายของจำนวนโครโมโซมแบบดิพลอยด์ ($2n$) สูงสุดอยู่ที่ $2n = 22$ จำนวน 54 เซลล์ จากจำนวนเซลล์ที่นับรวมทั้งหมด 55 เซลล์ คิดเป็น 98.18 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นคางคกจึงมีจำนวนโครโมโซมแบบดิพลอยด์ $2n = 22$ ตามตาราง 4 และ 5 ภาพประกอบ 9A, 9B และ 10A, 10B คาร์ิโอไทป์ประกอบด้วยโครโมโซมแบบเมทาเซนทริก 8 คู่ และซับเมทาเซนทริก 3 คู่ ภาพประกอบ 9C, 10C และ 11 จำนวนแขนโครโมโซม (NF) เท่ากับ 44 ตามตาราง 5 ลักษณะที่สำคัญคือมีรอยคอดที่สองอยู่ที่แขนข้างยาวของโครโมโซมแบบเมทาเซนทริก คู่ที่ 8 ซึ่งเป็น marker chromosome ของคางคก ดังภาพประกอบ 9A, 9C และ 10A, 10C โครโมโซมมีความยาวทั้งแขนหรือความยาวแขนแบบสัมบูรณ์ตั้งแต่ 1.680-9.784 ไมโครเมตร เฉลี่ย 5.253 ไมโครเมตร โครโมโซมมีความยาวสัมพัทธ์ตั้งแต่ 2.91-16.93 เปอร์เซ็นต์ เฉลี่ย 9.09 เปอร์เซ็นต์ โครโมโซมขนาดใหญ่มี 6 คู่ ได้แก่โครโมโซมคู่ที่ 1, 2, 3, 4, 9 และ 10 โครโมโซมขนาดเล็กมี 5 คู่ ได้แก่โครโมโซมคู่ที่ 5, 6, 7, 8 และ 11 ตามตาราง 8 และ 9

ผลการศึกษา NORs ของคางคกพบว่า มีความถี่ของจำนวน NORs กระจายสูงสุดอยู่ที่จำนวน 1 คู่ จำนวน 8 เซลล์ จากจำนวนเซลล์ที่นับรวมทั้งหมด 8 เซลล์ คิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นคางคกจึงมี NORs จำนวน 1 คู่ ตั้งอยู่ที่ปลายแขนข้างยาวของโครโมโซมแบบเมทาเซนทริกคู่ที่ 8 (8 m q ter) ตามตาราง 10 และ 11 ภาพประกอบ 9B, 9C, 10B, 10C และ 11

ตาราง 4 ความถี่ในการกระจายของจำนวนโครโมโซมแบบดิพลอยด์ (2n) ที่นับได้จากกบนา *Rana tigerina* อึ่งขาง *Kaloula pulchra* และคางคก *Bufo melanostictus*

ชนิดของสัตว์	จำนวนโครโมโซมแบบดิพลอยด์											รวมจำนวนเซลล์ที่นับ (เซลล์)	ความถี่สูงสุดของจำนวนเซลล์ที่นับได้ (%)
	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30		
กบนา	0	0	0	0	0	1	70	0	0	0	0	71	98.59
อึ่งขาง	0	0	0	0	0	0	1	0	60	0	0	61	98.36
คางคก	1	0	54	0	0	0	0	0	0	0	0	55	98.18

ตาราง 5 จำนวนโครโมโซมแบบดิพลอยด์ (2n) ชนิดของโครโมโซม และจำนวนแขนโครโมโซมของกบนา อึ่งขาง และคางคก

ชนิดของสัตว์	2n	ชนิดของโครโมโซม (คู่)				จำนวนแขนโครโมโซม
		เมทาเซนทริก	ซันเมทาเซนทริก	ซันเทโลเซนทริก	อะโครเซนทริก	
กบนา	26	7	5	1	0	52
อึ่งขาง	28	9	3	2	0	56
คางคก	22	8	3	0	0	44

ตาราง 6 ค่าเฉลี่ยความยาวแขนสั้น (p) ความยาวแขนยาว (q) ความยาวทั้งแขนหรือความยาว
 สัมบูรณ์ (absolute length หรือ T) ความยาวสัมพัทธ์ (relative length หรือ RL) อัตราส่วน
 ระหว่างแขนยาวต่อแขนสั้น (q/p) และชนิดของโครโมโซมคู่เหมือน (CT) ในกบนา
Rana tigerina จากเซลล์ตับจำนวน 5 เซลล์

โครโมโซม คู่ที่	p (μm) เฉลี่ย ± SD	q (μm) เฉลี่ย ± SD	T (μm) เฉลี่ย ± SD	RL เฉลี่ย (%)	q / p(μm) เฉลี่ย	CT
1	3.554 ± 0.703	4.200 ± 0.671	7.554 ± 1.370	15.73	1.19	m
2	2.372 ± 0.395	3.516 ± 0.708	5.888 ± 1.093	11.94	1.47	m
3	2.112 ± 0.331	2.942 ± 0.560	5.054 ± 0.885	10.21	1.39	m
4	1.632 ± 0.461	1.888 ± 0.455	3.520 ± 0.912	7.14	1.17	m
5	1.171 ± 0.021	1.523 ± 0.250	2.694 ± 0.429	5.46	1.31	m
6	1.021 ± 0.166	1.223 ± 0.133	2.244 ± 0.270	4.55	1.21	m
7	0.916 ± 0.154	1.032 ± 0.132	1.948 ± 0.274	3.95	1.14	m
8	1.920 ± 0.257	3.670 ± 0.590	5.590 ± 0.841	11.34	1.90	sm
9	1.469 ± 0.241	3.097 ± 0.611	4.570 ± 0.848	9.27	2.10	sm
10	0.922 ± 0.173	2.156 ± 0.445	3.078 ± 0.590	6.24	2.35	sm
11	0.732 ± 0.037	1.610 ± 0.090	2.342 ± 0.087	4.75	2.21	sm
12	0.582 ± 0.049	1.340 ± 0.125	1.922 ± 0.171	3.90	2.30	sm
13	0.532 ± 0.058	2.172 ± 0.428	2.704 ± 0.453	5.48	4.07	st

หมายเหตุ

m = metacentric chromosome

sm = submetacentric chromosome

st = subtelocentric chromosome

ตาราง 7 ค่าเฉลี่ยความยาวแขนสั้น (p) ความยาวแขนยาว (q) ความยาวทั้งแขนหรือความยาว
 สัมบูรณ์ (absolute length หรือ T) ความยาวสัมพัทธ์ (relative length หรือ RL)
 อัตราส่วนระหว่างแขนยาวต่อแขนสั้น (q/p) และชนิดของโครโมโซมคู่เหมือน (CT)
 ในอ้อย่าง *Kaloula pulchra* จากเซลล์ตับจำนวน 5 เซลล์

โครโมโซม คู่ที่	p (μm) เฉลี่ย ± SD	q (μm) เฉลี่ย ± SD	T (μm) เฉลี่ย ± SD	RL (μm) เฉลี่ย (%)	q / p(μm) เฉลี่ย	CT
1	3.286 ± 0.237	3.854 ± 0.229	7.140 ± 0.419	14.69	1.17	m
2	2.948 ± 0.040	3.438 ± 0.252	6.384 ± 0.228	13.14	1.17	m
3	2.074 ± 0.065	2.722 ± 0.348	4.796 ± 0.396	9.87	1.31	m
4	1.961 ± 0.341	2.223 ± 0.239	4.184 ± 0.559	8.61	1.14	m
5	1.632 ± 0.182	1.948 ± 0.342	3.580 ± 0.507	7.37	1.19	m
6	1.264 ± 0.272	1.600 ± 0.327	2.864 ± 0.591	5.89	1.27	m
7	1.101 ± 0.106	1.385 ± 0.237	2.486 ± 0.329	5.12	1.25	m
8	1.008 ± 0.168	1.208 ± 0.169	2.206 ± 0.264	4.54	1.22	m
9	0.782 ± 0.156	1.026 ± 0.101	1.898 ± 0.243	3.91	1.19	m
10	1.360 ± 0.082	2.628 ± 0.134	3.968 ± 0.180	8.16	1.93	sm
11	0.774 ± 0.167	1.654 ± 0.156	2.428 ± 0.317	5.00	2.18	sm
12	0.628 ± 0.056	1.366 ± 0.170	2.006 ± 0.218	4.13	2.18	sm
13	0.540 ± 0.078	2.124 ± 0.353	2.664 ± 0.408	5.48	3.95	st
14	0.454 ± 0.078	1.644 ± 0.218	1.998 ± 0.235	4.11	3.70	st

หมายเหตุ

m = metacentric chromosome

sm = submetacentric chromosome

st = subtelocentric chromosome

ตาราง 8 ค่าเฉลี่ยความยาวแขนสั้น (p) ความยาวแขนยาว (q) ความยาวทั้งแขนหรือความยาว
 สัมบูรณ์ (absolute length หรือ T) ความยาวสัมพัทธ์ (relative length หรือ RL) อัตราส่วน
 ระหว่างแขนยาวต่อแขนสั้น (q/p) และชนิดของโครโมโซมคู่เหมือน (CT) ในคางคก *Bufo*
melanostictus จากเซลล์ตับจำนวน 5 เซลล์

โครโมโซม คู่ที่	p (μm) เฉลี่ย ± SD	q (μm) เฉลี่ย ± SD	T (μm) เฉลี่ย ± SD	RL (μm) เฉลี่ย (%)	q / p(μm) เฉลี่ย	CT
1	4.328 ± 0.781	5.456 ± 0.861	9.784 ± 1.591	16.93	1.27	m
2	3.924 ± 0.726	4.864 ± 0.578	8.788 ± 1.281	15.20	1.25	m
3	3.116 ± 0.417	4.200 ± 0.804	7.316 ± 1.199	12.66	1.34	m
4	2.702 ± 0.611	3.138 ± 0.501	5.840 ± 1.075	10.10	1.15	m
5	1.954 ± 0.528	2.396 ± 0.703	4.370 ± 1.240	7.56	1.22	m
6	1.285 ± 0.380	1.537 ± 0.224	2.844 ± 0.552	4.92	1.20	m
7	1.088 ± 0.106	1.382 ± 0.182	2.470 ± 0.262	4.27	1.27	m
8	0.789 ± 0.176	0.794 ± 0.164	1.680 ± 0.334	2.91	1.12	m
9	2.189 ± 0.512	4.073 ± 0.893	6.262 ± 1.403	10.83	1.87	sm
10	2.162 ± 0.507	3.996 ± 0.880	6.160 ± 1.380	10.66	1.86	sm
11	0.726 ± 0.270	1.540 ± 0.395	2.264 ± 0.654	3.92	2.19	sm

หมายเหตุ

m = metacentric chromosome

sm = submetacentric chromosome

ตาราง 9 ค่าความยาวสัมบูรณ์ (T) ความยาวสัมพัทธ์ (RL) และขนาดโครโมโซมใน กบนา อีซาง และคางคก

ชนิดของสัตว์	ความยาวสัมบูรณ์ (T) μm		ความยาวสัมพัทธ์ (RL) %		โครโมโซมขนาดใหญ่		โครโมโซมขนาดเล็ก	
	พิสัย (range)	เฉลี่ย $\pm$ SD	พิสัย (range)	เฉลี่ย	จำนวน (คู่)	คู่ที่	จำนวน (คู่)	คู่ที่
กบนา	1.922 – 7.554	3.778 ± 0.633	2.91 – 16.93	7.69	5	1, 2, 3, 8, 9	8	4, 5, 6, 7, 10, 11, 12, 13
อีซาง	1.898 – 7.140	3.742 ± 0.350	3.91 – 14.69	7.14	6	1, 2, 3, 4, 5, 10	8	6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14
คางคก	1.680 – 9.784	5.253 ± 0.997	2.91 – 16.93	9.09	6	1, 2, 3, 4, 9, 10	5	5, 6, 7, 8, 11

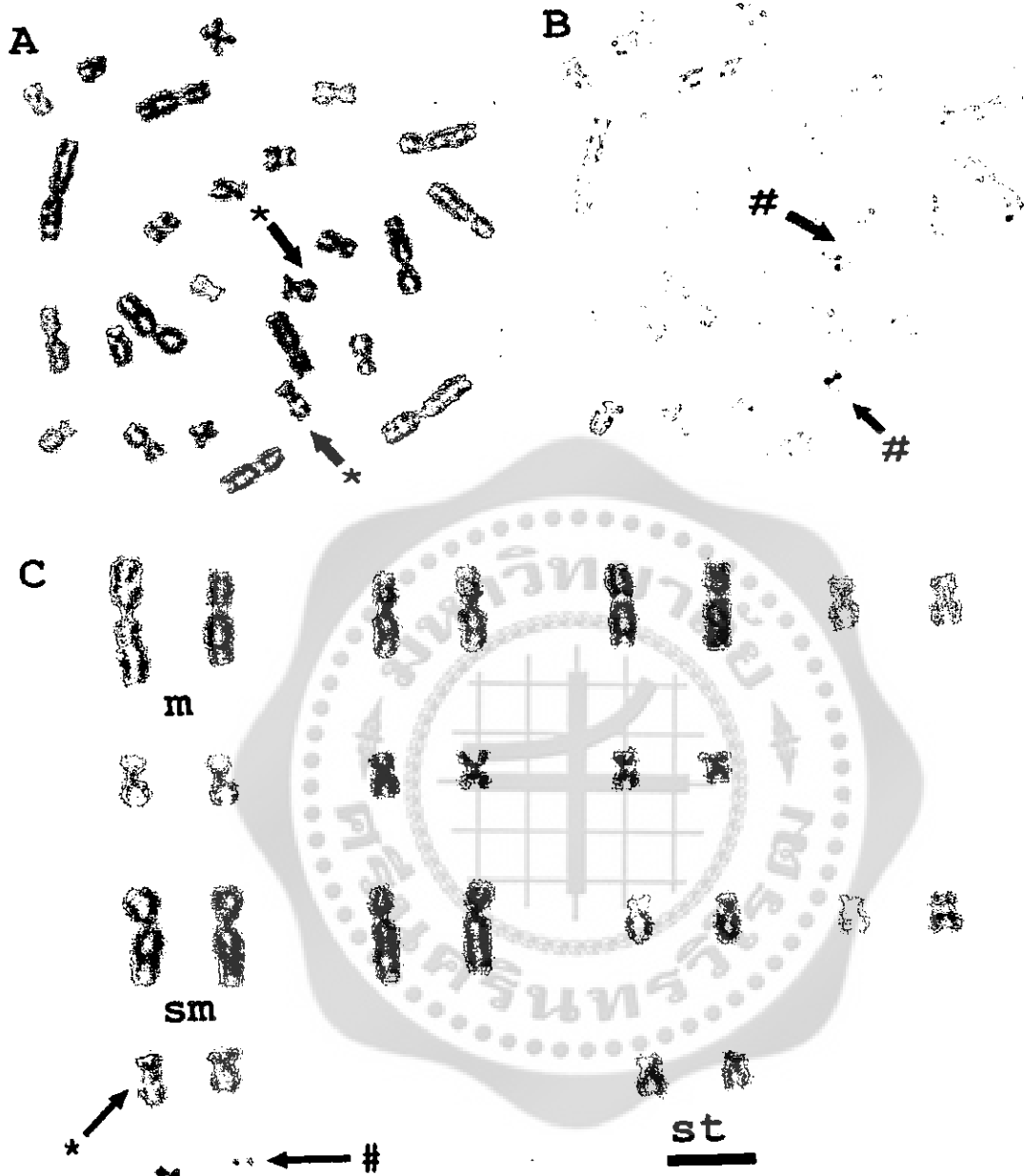
ตาราง 10 ความถี่ในการกระจายของบริเวณนิวคลีโอลัสออร์แกโนเซอร์ (NORs) ที่พบบนโครโมโซมของกบนา อีซาง และคางคก

จำนวน NORs (คู่)	กบนา (จำนวนเซลล์ที่นับ)	จำนวนเซลล์ ที่นับรวม	อีซาง (จำนวนเซลล์ที่นับ)	จำนวนเซลล์ ที่นับรวม	คางคก (จำนวนเซลล์ที่นับ)	จำนวนเซลล์ ที่นับรวม
	1 2 3 4 5 6 7 8		1 2 3 4 5 6 7 8		1 2 3 4 5 6 7 8	
1	1 1 1 1 1 1 1 1	8	0 0 0 0 0 0 0 0	0	1 1 1 1 1 1 1 1	8
2	0 0 0 0 0 0 0 0	0	1 0 0 0 0 0 0 0	1	0 0 0 0 0 0 0 0	0
3	0 0 0 0 0 0 0 0	0	0 1 1 1 1 1 1 1	7	0 0 0 0 0 0 0 0	0
4	0 0 0 0 0 0 0 0	0	0 0 0 0 0 0 0 0	0	0 0 0 0 0 0 0 0	0

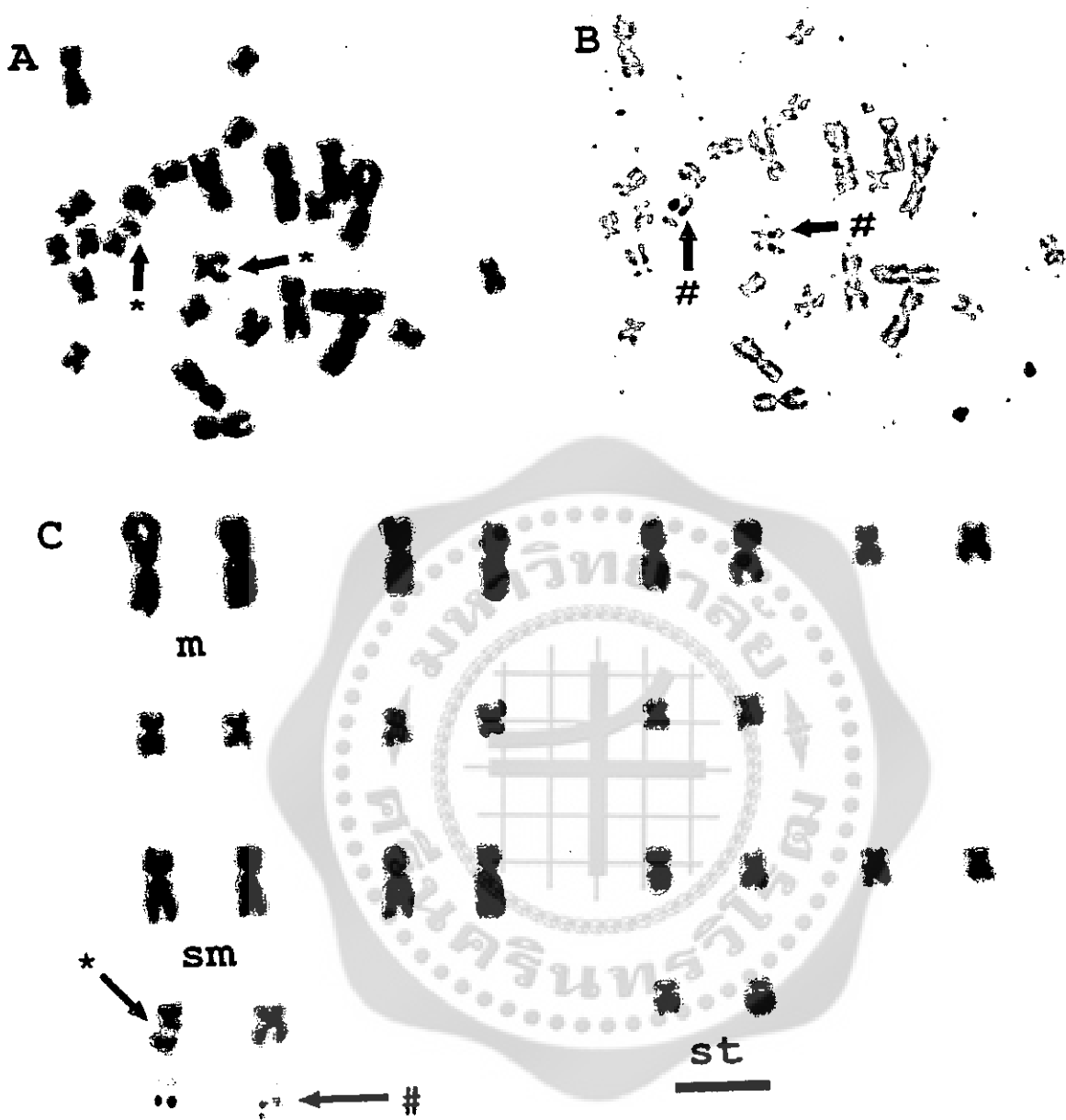
ตาราง 11 จำนวน และตำแหน่งที่ตั้งของ NORs ที่พบบนโครโมโซมคู่เหมือน (homologous chromosome pair) ในกบนา อีงยาง และคางคก จากจำนวนเซลล์ที่นับ 8 เซลล์

ชนิดของสัตว์	จำนวน NORs (คู่)	ตำแหน่งที่ตั้งของ NORs บนโครโมโซม
กบนา	1	5 smq
อีงยาง	3	5 mp, 8mp และ 1st q ter
คางคก	1	8 mq ter

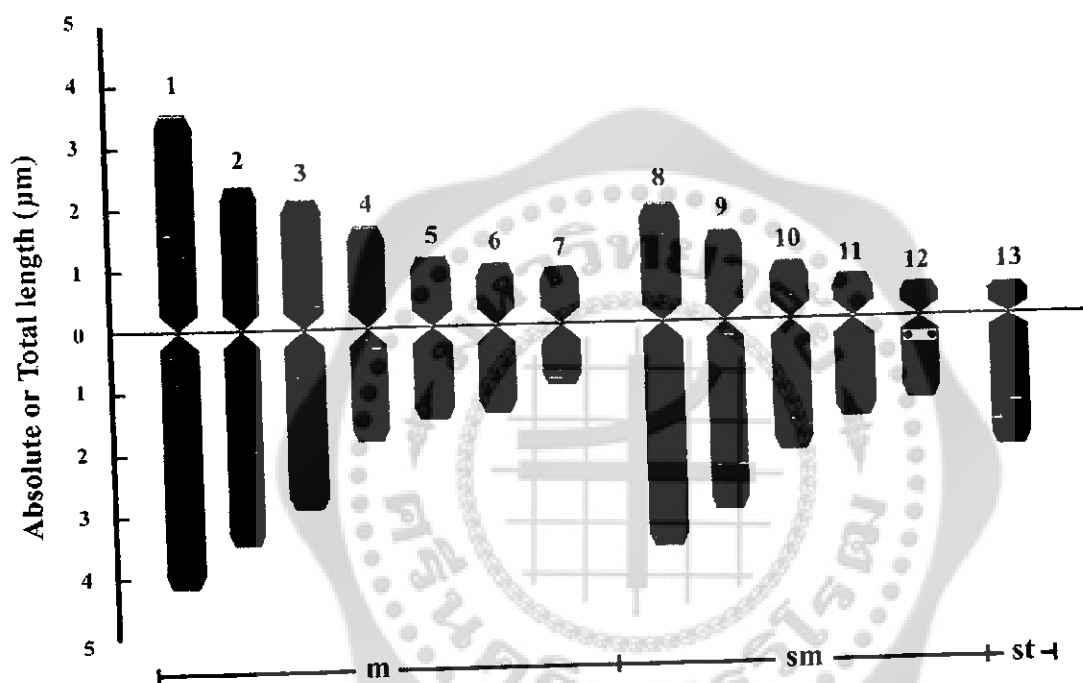
หมายเหตุ m = metacentric, st = subtelocentric, q = long arm, p = short arm, ter = terminal



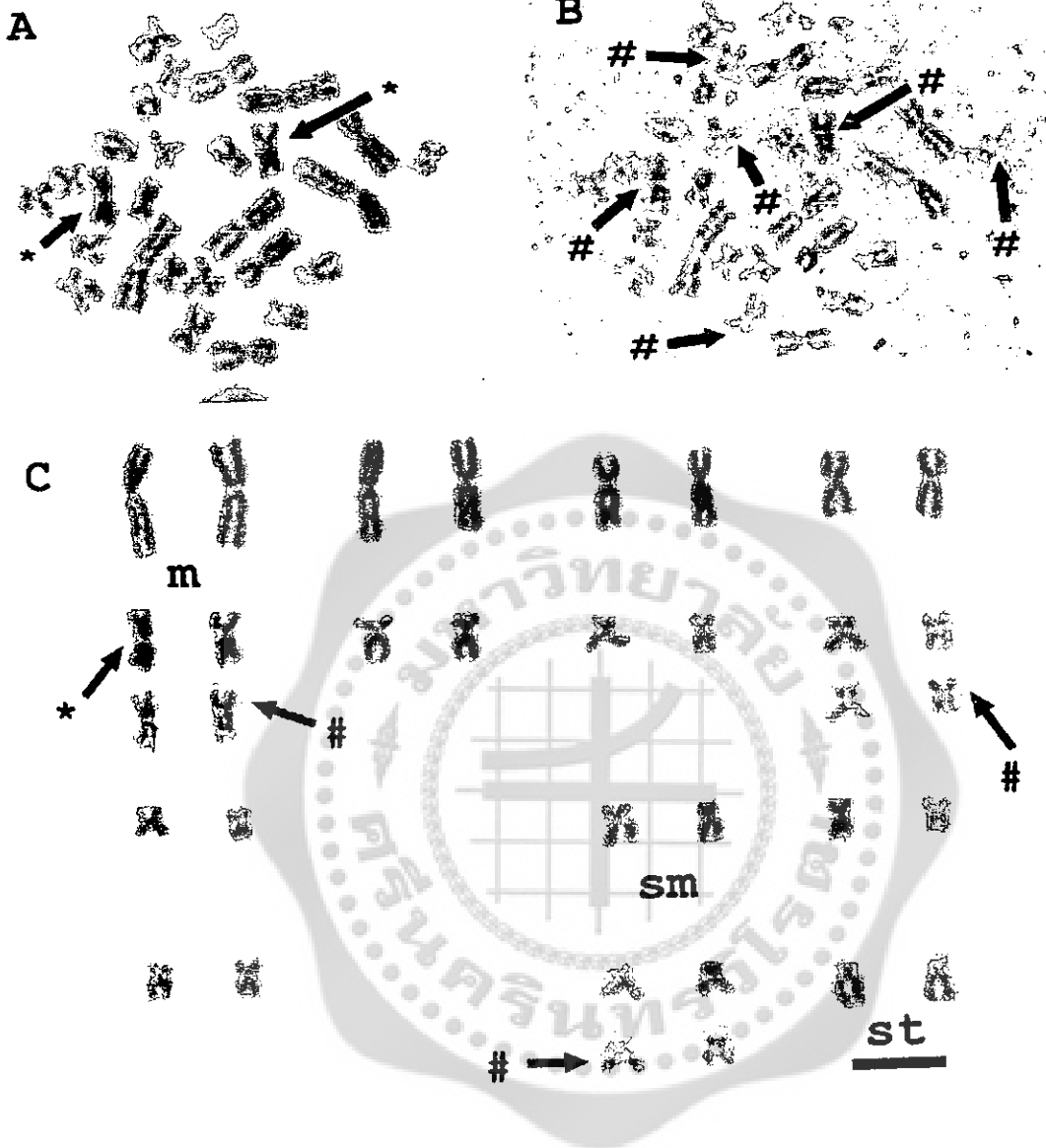
ภาพประกอบ 3 ภาพถ่ายการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสในระยะเมทาเฟสของกบนาแพสผู้ (A) คาร์ิโอไทป์ (C) และ NORs 1 คู่ (#) (B และ C) * คือรอยคอดที่สอง
(Scale bar = 5 μ m.)



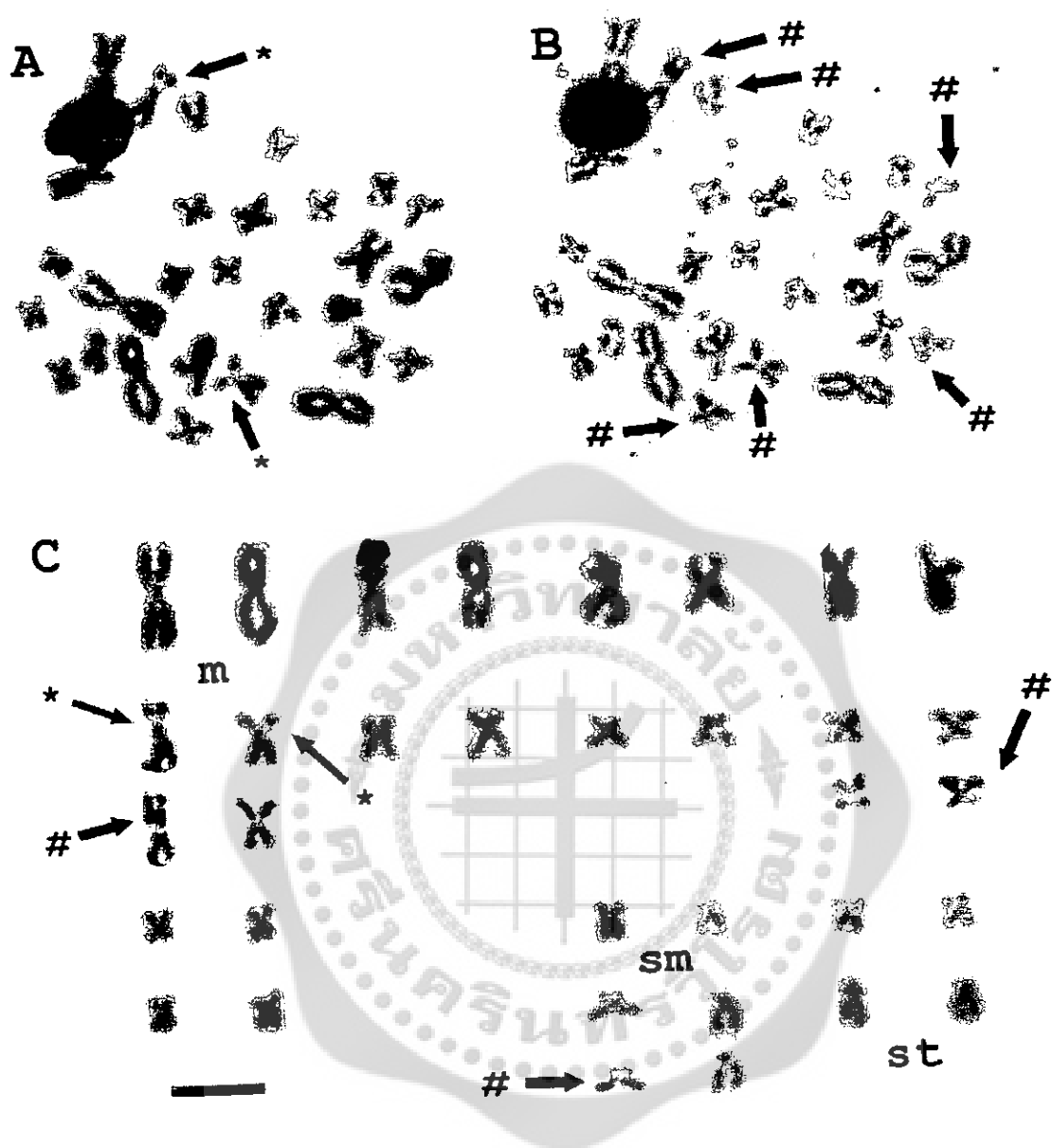
ภาพประกอบ 4 ภาพถ่ายการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสในระยะเมทาเฟสของกบนาเทศเมีย (A)
 คาริโอไทป์ (C) และ NORs 1 คู่ (#) (B และ C) * คือรอยคอดที่สอง
 (Scale bar = 5 μ m.)



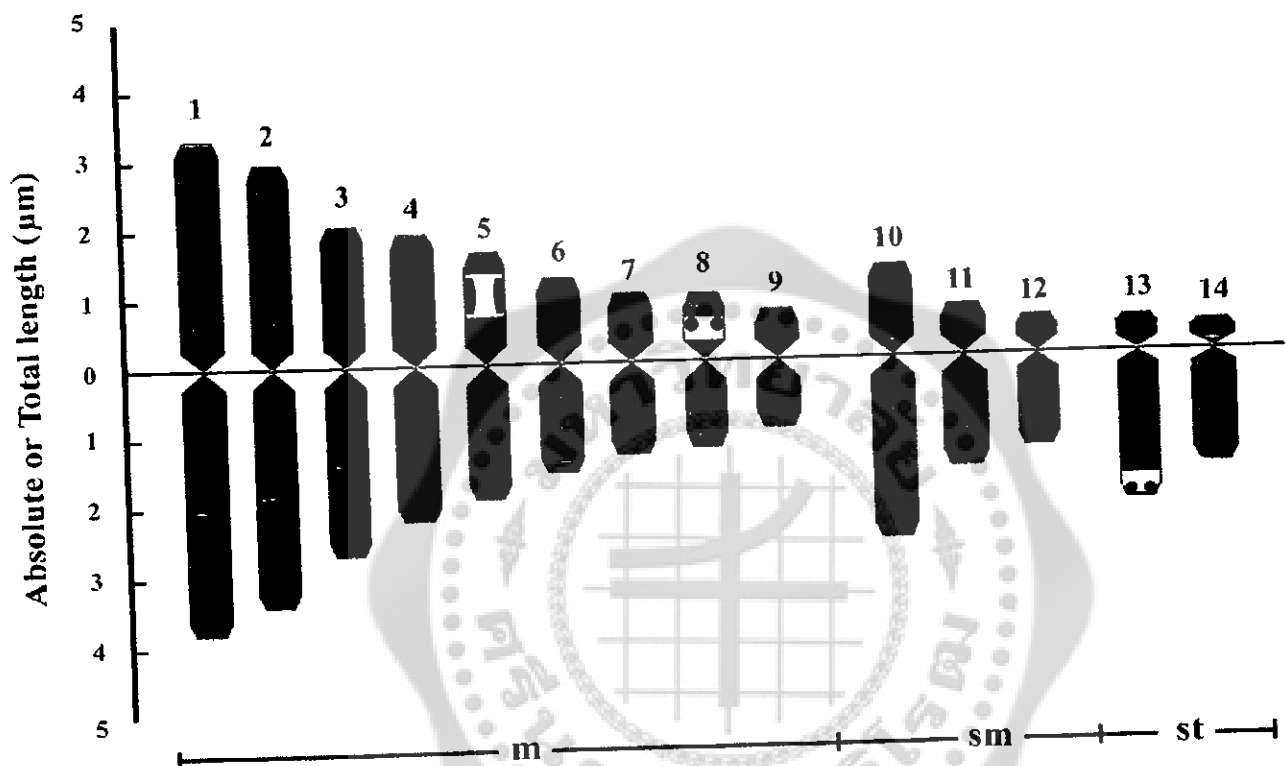
ภาพประกอบ 5 อิติโอแกรมของกบนา *Rana tigerina* เรียงลำดับตามค่าเฉลี่ยความยาวแขนแบบ
 สัมบูรณ์ อัตราส่วนระหว่างแขนยาวต่อแขนสั้นของโครโมโซมหรือโครโมโซม
 คู่เหมือนจำนวน 5 เซลล์ จุดสีดำเข้มสองจุดของโครโมโซมแบบจับเมทาเซนตริก
 คู่ที่ 5 คือ NORs ซึ่งอยู่ที่บริเวณรอยคอดที่สอง



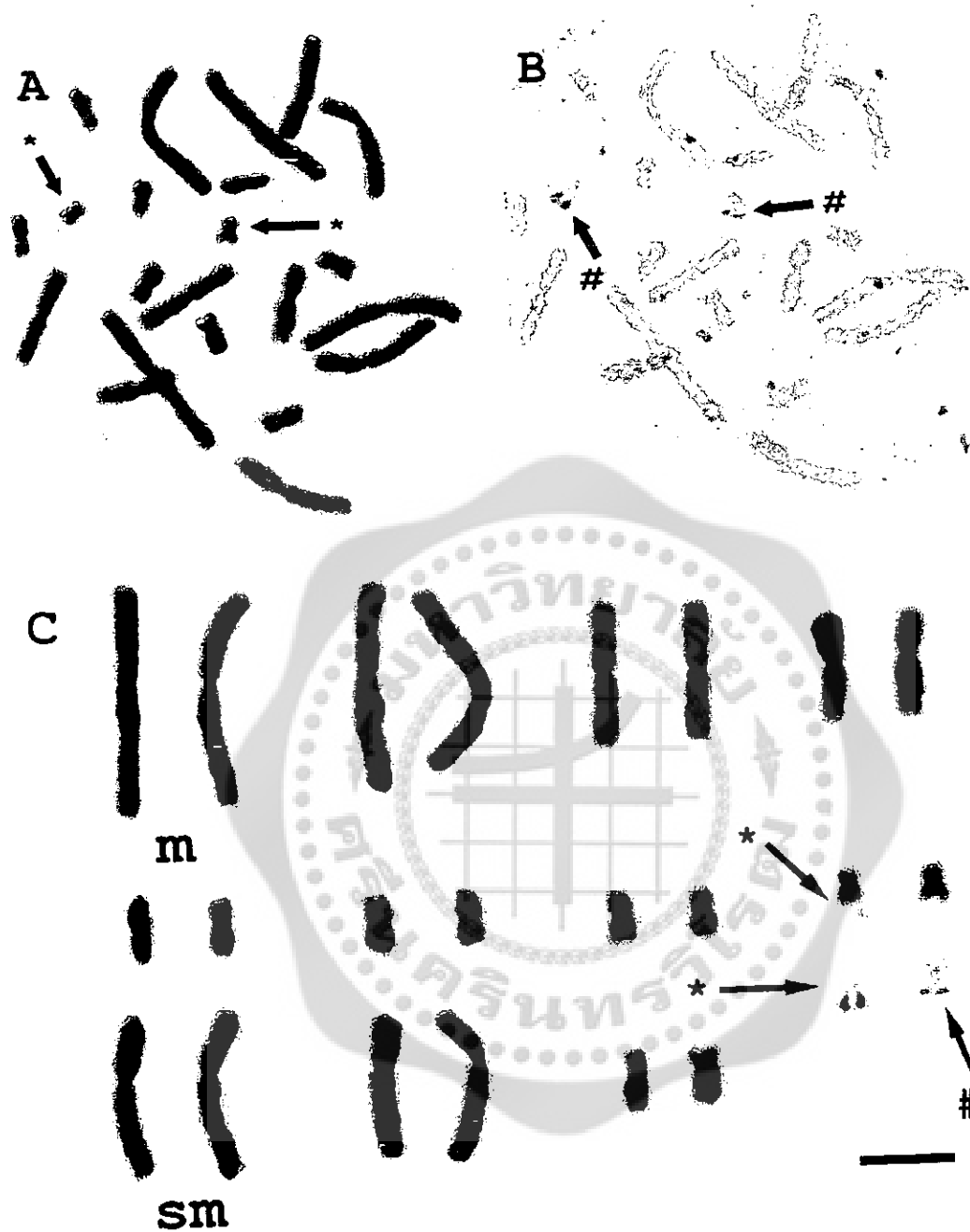
ภาพประกอบ 6 ภาพถ่ายการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสในระยะเมทาเฟสของอึ่งย่างเพศผู้ (A) คาร์ิโอไทป์ (C) และ NORs 3 คู่ (#) (B และ C) * คือรอยคอดที่สอง (Scale bar = 5 μ m.)



ภาพประกอบ 7 ภาพถ่ายการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสในระยะเมทาเฟสของอวัยวะเพศเมียม้า (A) คาร์ิโอไทป์ (C) และ NORs 3 คู่ (#) (B และ C) * คือรอยคอดที่สอง (Scale bar = 5 μ m.)



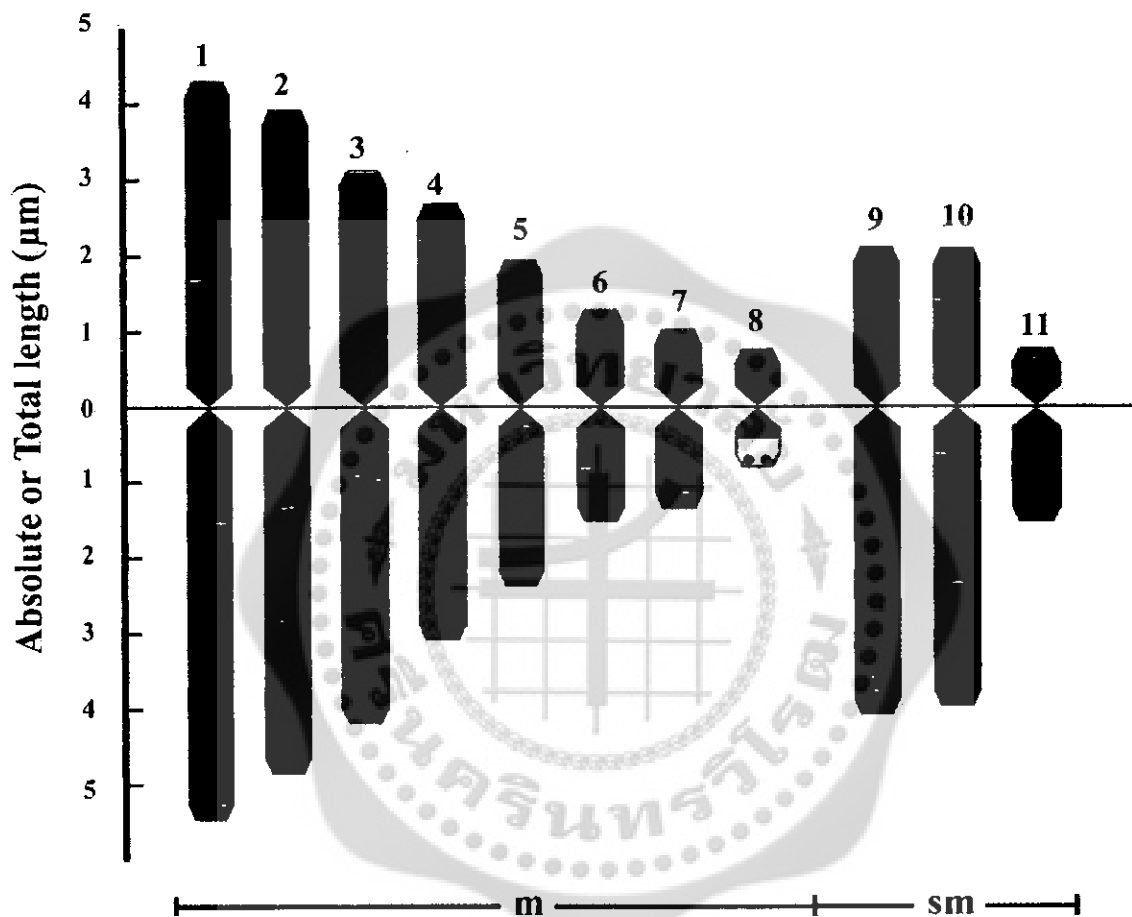
ภาพประกอบ 8 อิติโอแกรมของอวัยวะ *Kaloula pulchra* เรียงลำดับตามค่าเฉลี่ยของความยาวแขนแบบสัมบูรณ์ อัตราส่วนระหว่างแขนยาวต่อแขนสั้นของคู่โครโมโซมหรือโครโมโซมคู่เหมือนจำนวน 5 เซลล์ จุดสีดำเข้มสองจุดของโครโมโซมแบบเมทาเซนทริกคู่ที่ 5, 8 และแบบซับเทโลเซนทริกคู่ที่ 1 คือ NORs ซึ่งอยู่ที่บริเวณรอยคอดที่สอง



ภาพประกอบ 9 ภาพถ่ายการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสในระยะเมทาเฟสของคางคกเพศผู้ (A) คาร์ิโอไทป์ (C) และ NORs 1 คู่ (#) (B และ C) * คือรอยคอดที่สอง (Scale bar = 5 μ m.)



ภาพประกอบ 10 ภาพถ่ายการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสในระยะเมทาเฟสของคางคกเพศเมีย (A)
 คาริโอไทป์ (C) และ NORs 1 คู่ (#) (B และ C) * คือรอยคอดที่สอง
 (Scale bar = 5 μ m.)



ภาพประกอบ 11 อีดิโอแกรมของคางคก *Bufo melanostictus* เรียงลำดับตามค่าเฉลี่ยของความยาวแกนแบบสัมบูรณ์ อัตราส่วนระหว่างแกนยาวต่อแกนสั้นของคู่โครโมโซมหรือโครโมโซมคู่เหมือนจำนวน 5 เซลล์ จุดสีดำเข้มสองจุดของโครโมโซมแบบเมทาเซนทริกคู่ที่ 8 คือ NORs ซึ่งอยู่ที่บริเวณรอยคอดที่สอง

บทที่ 5

สรุปผล อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

สรุปผล

ผลการศึกษาการโอไทป์และบริเวณนิวคลีโอไทด์สตอร์แกนเซอร์หรือ NORs ของเซลล์ตับในกบนา อีซาง และคางคกที่พบในประเทศไทย พบว่ามีคาริโอไทป์และ NORs แตกต่างกันซึ่งสรุปได้ดังนี้

กบนา มีโครโมโซม $2n = 26$ คาริโอไทป์ประกอบด้วย $7m + 5 sm + 1st$ คู่ จำนวนแขนโครโมโซม (NF) = 52 ขนาดความยาวโครโมโซมแบบสัมบูรณ์ (T) เฉลี่ย 3.788 ไมโครเมตร ความยาวสัมพัทธ์ (RL) เฉลี่ย 7.69 เปอร์เซ็นต์ โครโมโซมขนาดใหญ่มี 5 คู่ ขนาดเล็กมี 8 คู่ NORs มี 1 คู่ ตั้งอยู่ที่ปลายแขนข้างยาวของโครโมโซมแบบซับเมทาเซนทริกคู่ที่ 5

อีซาง หรืออีซางบ้าน มีโครโมโซม $2n = 28$ คาริโอไทป์ประกอบด้วย $9m + 3sm + 2st$ คู่ จำนวนแขนโครโมโซม (NF) = 56 ขนาดความยาวโครโมโซมแบบสัมบูรณ์ (T) เฉลี่ย 3.472 ไมโครเมตร ความยาวสัมพัทธ์ (RL) เฉลี่ย 7.14 เปอร์เซ็นต์ โครโมโซมขนาดใหญ่มี 6 คู่ ขนาดเล็กมี 8 คู่ NORs มี 3 คู่ ตั้งอยู่ที่ปลายแขนข้างสั้นของโครโมโซมแบบเมทาเซนทริกคู่ที่ 5 กับคู่ที่ 8 กับอีก 1 คู่ ตั้งอยู่ที่ปลายสุดของแขนข้างยาวของโครโมโซมแบบซับเมทาเซนทริกคู่ที่ 1

คางคก หรือคางคกบ้าน มีโครโมโซม $2n = 22$ คาริโอไทป์ ประกอบด้วย $8m + 3sm$ คู่ จำนวนแขนโครโมโซม (NF) = 44 ขนาดความยาวโครโมโซมแบบสัมบูรณ์ (T) เฉลี่ย 5.253 ไมโครเมตร ความยาวสัมพัทธ์ (RL) เฉลี่ย 9.09 เปอร์เซ็นต์ โครโมโซมขนาดใหญ่มี 6 คู่ ขนาดเล็กมี 5 คู่ NORs มี 1 คู่ ตั้งอยู่ที่ปลายสุดของแขนข้างยาวของโครโมโซมแบบเมทาเซนทริกคู่ที่ 8

อภิปรายผล

การเตรียมโครโมโซมเพื่อใช้ในการวิเคราะห์คาริโอไทป์และการหาที่ตั้งของ NORs จากเซลล์ของเนื้อเยื่อตับในครั้งนี้ถือว่าเป็นการนำเซลล์ของตับกบนา อีซาง และคางคก มาใช้ในการเตรียมโครโมโซมครั้งแรกในประเทศไทย ซึ่งก็ถือว่าใช้ได้ผลดีได้โครโมโซมไม่แตกต่างจากการศึกษาของคนที่ผ่านมาโดยใช้เซลล์จากไขกระดูก และการเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวในอาหารเลี้ยงเซลล์โดยเฉพาะ ข้อที่ดีกว่าคือตับมีขนาดใหญ่ เก็บเกี่ยวเซลล์ได้ง่ายกว่าเซลล์ไขกระดูก โดยเฉพาะเมื่อสัตว์มีขนาดเล็ก และประหยัดค่าใช้จ่ายกว่าการเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเฉพาะซึ่งสิ้นเปลืองค่าใช้จ่าย โครโมโซมจากเซลล์ตับมีรูปร่างลักษณะดีได้เซลล์แผ่กระจายดีไม่เกาะจับกันเป็นก้อน เทคนิคการเตรียมโครโมโซมโดยวิธีการทำให้เซลล์แตกโครโมโซมกระจายตัวออกจากกันด้วยวิธีเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ถือว่าใช้ได้ผลดี ถึงแม้จะมีโครโมโซมของบางกลุ่มเซลล์

หลุดกระเด็นออกไปบ้างแต่ก็มีเป็นส่วนน้อย อย่างเช่นในกรณีของกบนา มีโครโมโซมกระเด็นออกไปจากกลุ่ม 1 โครโมโซม อีซาง และคางคกมีกระเด็นออกไปจากกลุ่ม 2 โครโมโซม ดังตาราง 4 ทำให้กลุ่มเซลล์ดังกล่าวมีโครโมโซม $2n$ ได้เท่ากับ 25, 26 และ 20 ตามลำดับ การนำเซลล์เข้าเครื่องปั่นเหวี่ยง ถ้าความเร็วรอบต่อนาทีสูงมากจนเกินไป หรือใช้เวลานานเกินไป จะทำให้โครโมโซมกระจัดกระจายมาก และหลุดกระเด็นไปรวมกับกลุ่มโครโมโซมอื่น ด้วยเหตุนี้ในบางครั้งบางกลุ่มเซลล์จึงอาจมีจำนวนโครโมโซมน้อยกว่าหรือมากกว่าความเป็นจริง ดังนั้นความเร็วรอบต่อนาทีในการปั่นเหวี่ยงและเวลาที่ใช้จึงต้องระมัดระวังเพื่อให้เกิดความเหมาะสม แต่ทั้งนี้ก็ขึ้นอยู่กับชนิด ขนาด และ อายุของกบนา อีซาง และคางคก ที่ใช้ในการศึกษา เพราะถ้าอายุมากเนื้อเยื่อเหนียว อายุน้อยเนื้อเยื่ออ่อนนุ่มกว่า แต่ความเร็วรอบต่อนาทีที่ใช้ปั่น 800-1000 รอบต่อนาทีเป็นความเร็วที่เหมาะสมดี การแก้ปัญหาโดยการนับจำนวนเซลล์ให้มากขึ้นแล้วใช้ความถี่สูงสุดของโครโมโซมเป็นเกณฑ์บอกจำนวนโครโมโซมแบบดิพลอยด์ การฉีดโคลชิซินความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์เข้าที่บริเวณช่องท้องเพื่อให้ได้จำนวนเซลล์ของการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสเพิ่มมากขึ้นใช้เวลาตั้งแต่ 9-23 ชั่วโมง เวลาที่เหมาะสมที่จะทำให้ได้จำนวนการแบ่งเซลล์เพิ่มมากขึ้นเฉลี่ยแล้วจะอยู่ประมาณ 15 ชั่วโมง ถ้าใช้เวลาน้อยเกินไปจะทำให้โครโมโซมยาวมากแยกออกจากกันได้ยาก ถ้าใช้เวลามากเกินไปโครโมโซมจะหดสั้นมากทำให้รูปร่างลักษณะของโครโมโซมได้ยากขึ้นโดยเฉพาะกับโครโมโซมที่มีขนาดเล็ก ดังนั้นการวัดจึงจำเป็นต้องเลือกกลุ่มเซลล์ที่มีโครโมโซมยาวพอประมาณมาวัดและใช้หลายๆกลุ่มเซลล์ แล้วหาค่าเฉลี่ยซึ่งจะทำให้ได้ขนาดโครโมโซมตรงตามธรรมชาติหรือความเป็นจริงมากที่สุด

การศึกษาเกี่ยวกับโครโมโซมและคาริโอไทป์ที่ผ่านมาของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในวงศ์รานิดี (Family Ranidae) หรือวงกบเขียดพบว่า 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 *Rana tigerina* ในครั้งนี้พบว่าโครโมโซมแบบดิพลอยด์ $2n = 26$ คาริโอไทป์ประกอบด้วย $7m + 5sm + 1t$ คู่ จำนวนแกนโครโมโซมเท่ากับ 52 จำนวนโครโมโซมที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้มีจำนวนเท่ากับการศึกษาของนิชิโอกะ และคณะ (Nishioka et al., 1987) ในกบ *Rana nigromaculata*, *R. brevipoda*, *R. planceyi chosonica*, *R. planceyi fukiensis*, *R. lessonae*, *R. pipines*, *R. japonica*, *R. tsushinensis*, *R. armuensis*, *R. temporaria*, *R. sylvatica* การศึกษาของเบอร์สไตน์ (Birstein, 1984) ใน *R. latestei*, *R. macrocnemius*, *R. nigromaculata* การศึกษาของ ถาวร สุภาพรม และคณะ (2534, 2535) ในเขียดอีโม *R. limnocharis* เขียดเหลือง *R. lateris* การศึกษาของ ถาวร สุภาพรม และ ประจักษ์ จันทร์ศรี (2542) ในเขียดจิกปากแหลม *R. macrodactyla* การศึกษาของ ถาวร สุภาพรม และคณะ (2543) ในกบอกหนาม *R.*

lisculispina การศึกษาของ วรวิฑู จุฬาลักษณ์านุกูล ในกบบูลฟร็อก *R. catesbeina* การศึกษาของ รัชช คอนสกูล และอัญริยา รังษิรุจิ (2548) ในเขียดจิก *R. erythraea* เขียดกาญจนบุรี *R. leptoglossa* และการศึกษาของ วรวิฑู จุฬาลักษณ์านุกูล และคณะ (2544) ในกบนา *R. rugulosa* ที่พบในประเทศไทยซึ่งมีโครโมโซม $2n = 26$ เท่ากัน แต่มีคาร์ิโอไทป์ต่างกัน ($8m + 5sm$ คู่) แต่ไม่มีโครโมโซมแบบ ซับเทโลเซนทริก แต่จำนวนแขนยังคงเท่ากัน ทั้งนี้อาจเป็นเพราะเป็นกบคนละชนิดกัน และมาตรฐานการใช้ในการกำหนดชนิดของโครโมโซมแตกต่างกัน โดยของ วรวิฑู จุฬาลักษณ์านุกูล และคณะ (2544) ใช้ค่า Numerical Value of Centromeric position (NVC) และการวิจัยในครั้งนี้ใช้ arm ratio ตามวิธีของลีเวน และคณะ (Levan et al., 1964) เนื่องจากกบนา 2 ชนิดนี้มีลักษณะ ภายนอกคล้ายคลึงกันมาก จนบางครั้งนึกว่าเป็นชนิดเดียวกัน ผลการศึกษาคาร์ิโอไทป์ในครั้งนี้ แสดงว่ากบนาทั้งสองชนิดนี้มีคาร์ิโอไทป์แตกต่างกัน นอกจากนี้ยังมีรอยคอดที่สอง (secondary constriction) ของคู่โครโมโซมที่แตกต่างกันด้วย การศึกษาในครั้งนี้ในกบนา *R. tigerina* มีรอยคอดที่สองอยู่ที่แขนข้างยาวของโครโมโซมแบบซับเมทาเซนทริกคู่ที่ 5 แต่ในกบนา *R. rugulosa* มีรอยคอดที่สองตั้งอยู่ที่แขนข้างยาวของโครโมโซมคู่ที่ 8 หรือโครโมโซมแบบเมทาเซนทริกคู่ที่ 2 นอกจากนี้ที่กล่าวมาแล้วยังเห็นได้ว่ากบนา *R. tigerina* มีจำนวนโครโมโซมและคาร์ิโอไทป์ต่างจากของ *R. kuhlii* ซึ่งมีโครโมโซม $2n = 22$ (Kuramoto, 1980) และกบภูเขา *R. blythii* ซึ่งมีโครโมโซม $2n = 24$ (รัชช คอนสกูล และ อัญริยา รังษิรุจิ, 2548)

ผลการศึกษาที่ตั้งของ NORs ในกบนา *R. tigerina* โดยการย้อมด้วย $AgNO_3$ ของการศึกษาในครั้งนี้พบว่า NORs มี 1 คู่ ตั้งอยู่ที่แขนข้างยาวของโครโมโซมแบบซับเมทาเซนทริกคู่ที่ 5 ซึ่ง NORs ของโครโมโซมทั้งสองมีขนาดเท่ากัน แสดงว่า constitutive heterochromatin ของ 18s+28s RNA gene ของทั้งสองโครโมโซมเท่ากัน และตำแหน่งดังกล่าวเป็นตำแหน่งของรอยคอดที่สองของโครโมโซม ซึ่งสามารถเห็นได้ชัดเจนด้วยการย้อมด้วยสีย้อมกิมซาธรรมชาติ NORs ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้มีจำนวนสอดคล้องกับของกบนา *R. rugulosa* ซึ่งมี 1 คู่เท่ากันแต่ตำแหน่งที่อยู่ต่างคู่โครโมโซมกัน โดยของ *R. rugulosa* ตั้งอยู่ที่แขนข้างยาวของโครโมโซมแบบเมทาเซนทริกคู่ที่ 2 ซึ่งเป็นการบ่งชี้ให้เห็นได้ชัดเจนยิ่งขึ้นว่ากบนาในประเทศไทยสองชนิดนี้มีคาร์ิโอไทป์และตำแหน่งที่ตั้งของ NORs แตกต่างกัน นอกจากนี้จำนวน NORs ยังสอดคล้องกับของ *R. esculenta*, *R. macrocnemius*, *R. latastei* (Birstein, 1984) ซึ่งมี NORs 1 คู่ แต่ต่างไปจากของ *R. catesbeina*, *R. sphenoccephalus* ที่มี NORs 3 คู่ *R. palestris* ซึ่งมี NORs 5 คู่ และ *R. erythraea* ที่มีโครโมโซม $2n = 24$ และมี NORs 5 คู่ (Schmid, 1978b) และ *R. pulustris* มี NORs 8 คู่ (Hsu et.al., 1975)

ตามที่กล่าวมาข้างต้นนี้จะเห็นได้ว่าจำนวน NORs ที่พบในกบเขียดสกุล *Rana* จะมีจำนวนแตกต่างกันไปตั้งแต่ 1 คู่จนสูงสุดถึง 8 คู่ ซึ่งนับว่ามีจำนวนสูงสุดที่พบในสัตว์มีกระดูกสันหลังในขณะนี้ (Schmid, 1978b) ตำแหน่งที่ตั้งของ NORs แตกต่างกันไปในกบเขียดแต่ละชนิด บางชนิดตั้งอยู่ที่แขนข้างสั้น บางชนิดตั้งอยู่ที่แขนข้างยาว บางชนิดมีตั้งอยู่ทั้งที่แขนข้างสั้นและข้างยาวแต่มี

ค่อนข้างน้อย และที่ตั้งของ NORs ส่วนมากจะเป็นที่เดียวกันกับรอยคอดที่สองของโครโมโซม หรือ และคณะ (Hsu et al., 1975) ให้สมมติฐานเอาไว้ว่า กบเขียดพวกที่มี NORs 1 คู่ เป็นพวกที่ค่อนข้างโบราณมากกว่าพวกอื่นๆ ที่มี NORs มากกว่า 1 คู่ ถ้าเป็นไปตามสมมติฐานดังกล่าวนี้แสดงว่า กบนา *R. tigerina* ในประเทศไทยน่าจะจัดอยู่ในกลุ่มโบราณนี้ด้วยและน่าจะสอดคล้องกับข้อคิดเห็นของ เฮเยอร์ (Heyer, 1969) และ ลิงค์ (Lynch, 1971, 1973) ที่ว่าพวกกบเขียดที่มีโครโมโซม $2n = 26$ น่าจะเป็นบรรพบุรุษของพวกที่มีโครโมโซม $2n = 22$ และ $2n = 24$ และพวกที่อาศัยอยู่บนบกน่าจะ เป็นพวกเกิดขึ้นก่อนแล้วค่อยๆ ลงไปอาศัยอยู่ในน้ำ มีใช้พวกที่อาศัยอยู่ในน้ำค่อยๆ ขึ้นมาอาศัยอยู่บนบกตามที่เข้าใจกัน

การศึกษาเกี่ยวกับโครโมโซมและคาริโอไทป์ของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในวงศ์อังกาบ (Family Microhylidae) ที่ผ่านมามีโครโมโซมตั้งแต่ $2n = 24$ ถึง $2n = 28$ ผลจากการศึกษาคาริโอไทป์จากเซลล์ตับของอึ่งขางหรืออึ่งอ่างบ้าน *Kaloula pulchra* ในครั้งนี้พบว่าโครโมโซม $2n = 28$ คาริโอไทป์ประกอบด้วย $9m + 3sm + 2st$ คู่ จำนวนแขนโครโมโซมเท่ากับ 56 จำนวนโครโมโซมที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้เท่ากับการศึกษาของถาวร และคณะ (2533) การศึกษาของชมิท (Schmid, 1978b) และมีจำนวนโครโมโซมเท่ากับอึ่งอ่างก้นจืด *Kaloula mediolineata* แต่มีคาริโอไทป์ต่างกัน ($2n = 28, 4m + 9sm + 1t$ คู่ ในอึ่งอ่างก้นจืด) และมีคาริโอไทป์ต่างจากของชมิท (Schmid, 1978b) ซึ่งโครโมโซมเป็นแบบเมทาเซนทริกกับแบบซันเมทาเซนทริก ทั้งนี้อาจเป็นเพราะมาตรฐานของการใช้บอกชนิดโครโมโซมแตกต่างกันก็เป็นไปได้ถึงจะเป็นอึ่งชนิดเดียวกันก็ตาม อีกประการก็คืออึ่งดังกล่าวมิได้บ่งชี้ว่านำเข้าไปจากประเทศใด เพียงแต่บอกว่านำเข้าไปจากทวีปเอเชียซึ่งมีขอบข่ายกว้างขวาง

อึ่งที่นำเอาไปจากประเทศที่มีสภาพภูมิประเทศและสภาพแวดล้อมต่างกันอาจทำให้มีคาริโอไทป์แตกต่างกันก็เป็นได้ ซึ่งพบในจำพวกปลาหลายชนิด (Denton, 1973) นอกจากนี้ยังมีจำนวนโครโมโซมต่างจากอึ่งขาคำ *Microhyla pulchra* ที่มีโครโมโซม $2n = 24$ (ถาวร สุภาพรม และคณะ, 2537) และต่างไปจากโครโมโซมของอึ่งแวน *Caluella guttulata* ($2n = 26$) (ถาวร สุภาพรม และคณะ, 2537) อึ่งกรายเอวจูด *Kalophrynus pleurostigma* ($2n = 26$) (ถาวร สุภาพรม และ ประจักษ์ จันทศรี, 2542) และอึ่งเพ้า *Glyphoglossus molossus* (ธวัช คอนสกุล และ อัจฉริยา รังษิรุจิ, 2548) ถึงแม้จะเป็นอึ่งวงศ์เดียวกันก็ตาม และพบ marker chromosome ที่เป็นรอยคอดที่ 2 ของโครโมโซมแบบเมทาเซนทริกคู่ที่ 5

ผลการศึกษาที่ตั้งของ NORs ในอึ่งขางหรืออึ่งอ่างบ้าน *K. pulchra* ในครั้งนี้พบว่า อึ่งขางมีโครโมโซม $2n = 28$ มี NORs อยู่ด้วยกัน 3 คู่ NORs คู่ที่ 1 มีขนาดใหญ่ตั้งอยู่บนแขนข้างสั้นของโครโมโซมแบบเมทาเซนทริกคู่ที่ 5 ซึ่งเป็นตำแหน่งเดียวกับรอยคอดที่สองที่สามารถเห็นได้ชัดเจนด้วยการย้อมด้วยสีย้อมกิมซาแบบธรรมดา การที่ NORs มีแถบสีเข้มขนาดใหญ่ น่าจะเป็น 3 เท่าของ NORs ที่พบโดยทั่วไปทั้งนี้อาจเป็นเพราะมีการจำลอง (duplication) หรือ triplication ของ NORs (Schmid, 1982) ขึ้นที่บริเวณนี้ NORs คู่ที่ 2 ตั้งอยู่ที่แขนข้างสั้นของโครโมโซมแบบเมทาเซนทริกคู่

ที่ 8 และคู่สุดท้าย NORs ตั้งอยู่ที่ปลายสุดของแขนข้างยาวของโครโมโซมแบบจับเทโลเซนทริก ถึงอย่างไรก็ตามจำนวน NORs ที่ได้จากการศึกษาค้างครั้งนี้มีจำนวน 3 คู่ เท่ากับการศึกษาในอึ่งอ่างชนิดเดียวกันนี้ของชมิท (Schmid, 1978b) แต่ต่างกันตรงตำแหน่งที่ตั้งของ NORs ซึ่งชมิทพบตั้งอยู่บนแขนข้างสั้นของโครโมโซมคู่ที่ 5, 11 และ 13 ทั้งหมด

การศึกษาเกี่ยวกับโครโมโซมและคาริโอไทป์ของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในวงศ์คางคก (Family Bufonidae) พบว่ามีโครโมโซมตั้งแต่ $2n = 20$ จนถึง $2n = 22$ ในคางคกสกุล *Bufo* (Schmid, 1978a)

ผลการศึกษาคาริโอไทป์ของคางคกหรือคางคกบ้าน *Bufo melanostictus* ในครั้งนี้พบว่าโครโมโซม $2n = 22$ คาริโอไทป์ประกอบด้วย $8m + 3sm$ คู่ จำนวนแขนโครโมโซมเท่ากับ 44 พบ marker chromosome ซึ่งเป็นรอยคอดที่สองบนแขนข้างยาวของโครโมโซมแบบเมทาเซนทริกคู่ที่ 8 ได้อย่างชัดเจนจากการย้อมสีแบบธรรมดาด้วยสีย้อมกิมซา ผลการศึกษาค้างครั้งนี้มีจำนวนโครโมโซมเท่ากับการศึกษาของอุลเลริช (Ullerich, 1966) ในคางคก *B. bufo*, *B. viridis*, *B. viridis* x *B. bufo* และ *B. calamita* การศึกษาของชมิท (Schmid, 1978a) ในคางคก *B. bufo*, *B. calamita*, *B. pavidus*, *B. viridis*, *B. anuricanus*, *B. boreas*, *B. compactilis*, *B. fowleri*, *B. punctatus*, *B. terrestris*, *B. valliceps*, *B. arenarum*, *B. marinus*, *B. mouritaricus* การศึกษาของ นงลักษณ์ นาคเกษม (2518) การศึกษาของ วรวิทย์ จุฬาลักษณ์านุกูล และคณะ (2544) ในคางคก 4 ชนิดของไทยได้แก่ คางคกบ้าน *B. melanostictus* ($2n = 22$, $9m + 2sm$ คู่) จงโคร่ง *B. asper* ($2n = 22$, $8m + 3sm$ คู่) คางคกหัวราบ *B. macrotis* ($2n = 22$, $10m + 1sm$ คู่) และคางคกแคระ *B. parvus* ($2n = 22$, $9m + 2sm$ คู่) แต่ไม่ได้ศึกษาที่ตั้งของ NORs ในคางคกเหล่านี้ จะเห็นได้ว่าคางคกบ้านที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้มีจำนวนโครโมโซมเท่ากัน จำนวนแขนโครโมโซมเท่ากัน แต่มีคาริโอไทป์แตกต่างกันเพียงคู่เดียว ทั้งนี้อาจเป็นเพราะมาตรฐานในการจำแนกชนิดโครโมโซมต่างกันตามที่กล่าวถึงมาแล้วในตอนต้น การศึกษาของวรวิทย์ จุฬาลักษณ์านุกูล และคณะ (2544) ไม่พบ marker chromosome แต่การศึกษาค้างนี้พบ marker chromosome ซึ่งเป็นรอยคอดที่สองของโครโมโซมแบบเมทาเซนทริกคู่ที่ 8 นอกจากนี้ยังมีคาริโอไทป์เหมือนกับของจงโคร่ง แต่ต่างจากของคางคกหัวราบ และคางคกแคระ ขณะที่จำนวนโครโมโซมดังกล่าวต่างจากของ *B. gamani*, *B. poweri* และ *B. regularis* ซึ่งมีโครโมโซม $2n = 20$ จากการศึกษาของโบการ์ท (Bogart, 1966) ในคางคก *B. regularis* ของประเทศอียิปต์ เคนยา แอฟริกาเหนือ ในจอร์เจีย โครีเซียพบว่ามีโครโมโซม $2n = 20$ และเขาได้อธิบายว่าคางคกสกุล *Bufo* ที่มีโครโมโซม $2n = 20$ ที่มีถิ่นกำเนิดอยู่ในทวีปแอฟริกาเป็นบรรพบุรุษของพวกที่มีโครโมโซม $2n = 22$ ดังนั้นพวกที่มีโครโมโซม $2n = 22$ จึงเป็นพวกที่มีโครโมโซมเปลี่ยนแปลงไปแล้ว และแพร่กระจายไปยังแหล่งต่างๆ ของโลก

ผลการศึกษาที่ตั้งของ NORs ในคางคกหรือคางคกบ้านในครั้งนี้นับพบ NORs 1 คู่ ตั้งอยู่ที่ส่วนปลายสุดของแขนข้างยาวของโครโมโซมแบบเมทาเซนทริกคู่ที่ 8 ซึ่งเป็นบริเวณส่วนปลายของรอย

คอดที่สอง ซึ่งเป็นลักษณะเด่นในการใช้จำแนกชนิดของคางคกชนิดนี้ได้เป็นอย่างดี ซึ่งมีจำนวน NORs สอดคล้องกับของคางคก *Bufo bufo verrucosissima* ซึ่งมีโครโมโซม $2n = 22$ และมี NORs ตั้งอยู่ที่ปลายแขนข้างยาวของโครโมโซมคู่ที่ 6

ผลการศึกษาโครโมโซมและ NORs ของกบนาในวงศ์รานิดี (Ranidae) อึ่งขางในวงศ์ไมโครไฮลิดี (Microhylidae) และคางคกในวงศ์บูโฟนิดี (Bufonidae) พบว่ามีโครโมโซม $2n = 26$ ($7m + 5sm + 1st$ คู่), $2n = 28$ ($9m + 3sm + 2st$ คู่), $2n = 22$ ($8m + 3sm$ คู่) มี NORs 1 คู่ในกบนา 3 คู่ในอึ่งขาง และ 1 คู่ในคางคก NORs เหล่านี้ตั้งอยู่บนโครโมโซมในคู่ของโครโมโซม และในตำแหน่งที่แตกต่างกัน ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้จึงเป็นไปตามสมมติฐานที่ตั้งไว้แต่แรกทุกประการ

ข้อเสนอแนะ

ควรจะได้นำเทคนิคและวิธีการต่างๆ ไปประยุกต์ใช้กับการศึกษาสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกชนิดอื่น ตลอดจนสัตว์มีกระดูกสันหลังชนิดอื่นด้วย และควรมีการศึกษาการข้ามแถบสีแบบต่างๆ ควบคู่กันไปกับการนำเทคนิคด้านชีวโมเลกุลมาใช้ในการศึกษาการจัดจำแนก และความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในประเทศไทย โดยเฉพาะพวกที่มีรูปร่างลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายคลึงกัน ยากต่อการจัดจำแนกโดยใช้ลักษณะภายนอกแต่เพียงอย่างเดียว

บรรณานุกรม

- จารุจินต์ นกิตะกัญ. 2531. สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก. พิมพ์ที่โรงพิมพ์คุรุสภาลาดพร้าว. กรุงเทพฯ.
- ถาวร สุภาพรม และประภาพร ถัลยาประสิทธิ์. 2533. การศึกษาโครโมโซมของอึ่งอ่างบ้านและคางคกบ้าน. บทคัดย่อการสัมมนาวิชาการพันธุศาสตร์ ครั้งที่ 7 หน้า 107 – 109.
- ถาวร สุภาพรม, นงเยาว์ ฉาโธสง และนิยะดา ห่อนาค. 2534. การศึกษาจำนวนโครโมโซมและคาริโอไทป์ของเขียดจิกและเขียดอีโม้. การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 17. ขอนแก่น. B – 060. หน้า 450 – 451.
- ถาวร สุภาพรม, วาริณี อรุณมงคลผล และแก้ว 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 พลessar และปทุมทิพย์ บุญสูง. 2537. รายงานครั้งแรกเกี่ยวกับจำนวนโครโมโซมและคาริโอไทป์ของอึ่งขาคำ (*Microhyla pulchra* Hollowell) และอึ่งก้นขีด (*Kaloula mediolineata* Smith). การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 20. กรุงเทพฯ. B – 36. หน้า 326 – 327.
- ถาวร สุภาพรม. 2541. การวิเคราะห์โครโมโซมที่ข้อมแถบซี (C - banding) ในอึ่งปากขวดและอึ่งบ้าน. การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 24. กรุงเทพฯ. B – 031. หน้า 488 – 489.
- ถาวร สุภาพรม และประจักษ์ จันทร์ศรี. 2542. การศึกษาจำนวนโครโมโซมและคาริโอไทป์ของเขียดจิกปากแหลมและอึ่งกรายเอวจุด. การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 25. กรุงเทพฯ. B – 028. หน้า 614-615.
- ถาวร สุภาพรม, ขนิษฐา ทุมมานนท์, ประจักษ์ จันทร์ศรี และวิสุทธิ ใบไม้. 2543. การศึกษาจำนวนโครโมโซมและคาริโอไทป์ของกบอกหนามและเขียดหลังปุม. การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 26. กรุงเทพฯ. 19 – VII 52. หน้า 395.
- ธวัช ดอนสกุล และอัจฉริยา รังษิรุจิ. 2548. คาริโอไทป์ของเขียดก้นขาวในกบภูเขา เขียดบัว เขียดกาญจนบุรี เขียดน้ำนอง อึ่งเพ้า. เรื่องเดิมการประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 43. สาขาวิทยาศาสตร์. กรุงเทพฯ. หน้า 544 – 551.
- ธัญญา จันอาจ. 2546. สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในเมืองไทย. บริษัท คำนวณสุทธาการพิมพ์ จำกัด. กรุงเทพฯ.

- นงลักษณ์ นาคเกษม. 2518. การศึกษาการเจริญเติบโตและคาร์ิโอไทป์ของกบ อีงอ่าง และคางคกไทย. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. อัดสำเนา.
- วิโรจน์ นุตพันธุ์. 2544. สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในประเทศไทย. สำนักพิมพ์ บ้านและสวน. กรุงเทพฯ.
- วรวิฑู จุฬาลักษณ์านุกูล, ศุสดี ปรียานนท์ และเพลินพิศ โชคชัยชำนาญกิจ. 2540. การศึกษาโครโมโซมเพศของกบบูลฟร็อก. การประชุมเสนอผลงานวิจัย เฉลิมฉลอง 80 ปี แห่งการสถาปนา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. หน้า 736 – 742.
- วรวิฑู จุฬาลักษณ์านุกูล, เพลินพิศ โชคชัยชำนาญกิจ, ละเอียด คงกุ่ม, พรณรงค์ สิริปิยสิงห์, ศุสดี ปรียานนท์ และมงคล เกษประเสริฐ. 2544. การศึกษาคาร์ิโอไทป์ของสิ่งมีชีวิต. รายงานการวิจัยโครงการ BRT. หน้า 360 – 378.
- สมาคมพันธุศาสตร์แห่งประเทศไทย. 2548. ปทานุกรมพันธุศาสตร์. บริษัท เท็กซ์ แอน เจอร์นัลพับลิเคชั่น จำกัด. กรุงเทพฯ.
- สมชาย เลียงพรพรรณ. 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. verrucosissima*. *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 spiroleura* (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 *Hyperolius 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 species *Eupsophus roseus* (Anura: Leptodactylidae) detected by karyotypes analysis. *Experientia* 34/6: 446.
- 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.

- Hsu, T.C., S.E. Spirito and M.L. Pardue. 1975. Distribution of 18 + 285 ribosomal genes in mammalian genomes. *Chromosoma* (Berl.). 53: 25 – 36.
- Howell, W.M. and A.D. Black. 1980. Control silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: 1 - step method. *Experientia* 36: 1014.
- Ida, H. and Y. Kyo. 1980. Karyotyping variation found among five species of the family Platycephalidae, *Jap. J. Ichthyol.* 27: 122 – 128.
- Iturra, P. and A. Veloso. 1989. Further evidence for early sex chromosome differentiation of anuran species. *Genetica* 78: 25 – 31.
- Kuramoto, M. 1980. Karyotypes 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. Publ. Univ. Kansas Mus. Nat. Hist.* 53.
- Lynch, J.D. 1973. The transition from archaic to advanced frog, p.133 – 182. In: Evolutionary biology of anurans. *T.L. Vial (ed.) Univ. Missouri Press Columbia.*
- Mahoney, M.J. 1991. Heteromorphic sex chromosomes in the Australian frog *Crinia bilineata* (Anura, Myobatrachidae). *Genome* 34: 334 – 337.
- Nishioka, M., Okamoto and M. Ryuzaki. 1987. A comparative study on the karyotypes of pond frogs distributed in Japan, Korea, Taiwan, Europe and North America. *Sci. Rep. Lab. Amphibian Biol. Hiroshima Univ.* 9: 135 – 163.
- Ohno, S. 1967. *Sex chromosomes and sex - linked genes.* Springer, New York.
- Ohta, H. and M. Matsui. 1995. Karyotype of ranid frog *Platymantis pelewensis*, from Belau, Micronesia, with comments on its systematic implications. *Pacific Science.* 49(3): 296 – 300.
- Rab, P., K. Yiannis, R.Z. Morie and S.E. Panos. 1996. Banded Karyotype of the cyprinid fishes. *Leuciscus borysthemicus.* *Ichthyol. Res.* 463 – 468.
- Rudi, A., M. Rosolind, S.G. Bikram and C.E. May. 1998. *Chromosome biology.* Kluwer Academic Publishers, Boston.
- Schmid, M. 1987a. Chromosome banding in amphibia I. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in *Bufo* and *Hyla*. *Chromosoma.* 66: 361 – 368.

- Schmid, M. 1978b. Chromosome banding in amphibian II. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in Ranidae, Microhylidae and Racophoridae. *Chromosoma* (Birl.). 68: 131 – 148.
- 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, W. Feichtinger, C.G. de Almeida and W.E. Duellman. 1988. Chromosome banding in amphibia XIII. Sex Chromosomes, heterochromatin and meiosis in marsupial frogs (Anura, Hylidae). *Chromosomea* (Birl.). 97: 33 – 42.
- 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. Hillis 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. and C. Steinlein. 1991. Chromosome banding in amphibian XVI. High – resolution replication banding patterns in *Xenopus laevis*. *Chromosoma* 101: 123 – 132.
- Schmid, M., S. Ohta, C. Steinlein and M. Guttenbach. 1993. Chromosome banding in amphibia XIX. Primitive ZW/ZZ sex chromosomes in *Buergeria buergeri* (Anura, Rhacophoridae). *Cytogen. Cell Genet.* 62: 238 – 246.
- Sharma, A. 1991. *Chromosomes*. Published by Moham Primlani for Oxford & IBH Publishing Co – Pvt Ltd., New Delhi.
- Sumner, A.T. 1990. *Chromosome banding*. Unwin Hyman, London.
- 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* (Berl.). 44: 335 – 342.
- Ullerich, F.H. 1966. Karyotype and DNS – Gehalt von *Bufo bufo*, *B. viridis*, *B. bufo* × *B. viridis* and *B. calamita* (Amphibia, Anura). *Chromosoma* (Berl.). 18: 316 – 342.

Wasserman, A.O. and J.P. Bogart. 1968. Chromosome of two species of spadefoot toads (genus *Scaphiopus*) and their hybrid. *Copeia* 2: 303 – 306.



ประวัติผู้วิจัย

นายรัช คอนสกุล

MR.THAWAT DONSAKUL

ตำแหน่ง รองศาสตราจารย์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ประวัติการศึกษา

- พ.ศ. 2505 สำเร็จการศึกษามัธยมศึกษาปีที่ 6 จาก โรงเรียนมัธยมพิบูลวิทยาลัย
อำเภอพิบูลมังสาหาร จังหวัดอุบลราชธานี
- พ.ศ. 2507 สำเร็จการศึกษาระดับประกาศนียบัตรวิชาการศึกษาชั้นต้น (ป.กศ.ต้น)
จากวิทยาลัยครูอุบลราชธานี จังหวัดอุบลราชธานี
- พ.ศ. 2509 สำเร็จการศึกษาระดับประกาศนียบัตรวิชาการศึกษาชั้นสูง (ป.กศ.สูง)
จากวิทยาลัยครูอุบลราชธานี จังหวัดอุบลราชธานี
- พ.ศ. 2511 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขามัธยมศึกษา (กศ.บ.)
วิชาเอกชีววิทยา จากวิทยาลัยวิชาการศึกษา ประสานมิตร
- พ.ศ. 2514 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาอุดมศึกษาและการฝึกหัดครู
(กศ.ม.) วิชาเอกชีววิทยา จากวิทยาลัยวิชาการศึกษา ประสานมิตร

ประสบการณ์ในการวิจัย

การศึกษาเกี่ยวกับโครโมโซมและคาร์โบไฮเดรตของปลา สัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ สัตว์เลื้อยคลาน เป็นต้น

ผลงานวิจัย

1. รัช คอนสกุล. 2543. การศึกษาโครโมโซมของปลาแขยงแถบขาว ปลาแขยงนวล และปลาแขยงธงที่พบในประเทศไทย. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 38. สาขาประมงและสาขาวิทยาศาสตร์. 1 – 4 กุมภาพันธ์. หน้า 217 – 226.
2. รัช คอนสกุล. 2544. การศึกษาโครโมโซมของปลากดเหลือง กดดำ กดแก้ว และแขยงใบข้าวที่พบในประเทศไทย. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 39. สาขาประมง สาขาอุตสาหกรรมเกษตร. 5 – 7 กุมภาพันธ์. หน้า 209 – 219.

3. ธวัช คอนสกุล. 2545. การศึกษาโครโมโซมของปลาแขวงช้างลาย แขวงหิน ดุกมูน ดุกมูน ครีบทองที่พบในประเทศไทย. เรื่องเติมการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 40. สาขาสัตว สาขาสัตวแพทย์ สาขาประมง. 4 – 7 กุมภาพันธ์. หน้า 681 – 691.
4. ธวัช คอนสกุล และวิเชียร มากตุ่น. 2542. การศึกษาโครโมโซมของปลาบึกและปลาเทพา ที่พบในประเทศไทย. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 37. สาขาประมง สาขาการจัดการทรัพยากรและสิ่งแวดล้อม. 3 – 5 กุมภาพันธ์. หน้า 221 – 226.
5. ธวัช คอนสกุล. 2541. การศึกษาโครโมโซมของปลาจิ้มฟันจระเข้ ปลากระทุงเหว ปลา ปล้องอ้อย และปลาเปิ่นที่พบในประเทศไทย. การประชุมทางวิชาการของ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 36. 3 – 5 กุมภาพันธ์. หน้า 1 – 11.
6. ธวัช คอนสกุล. 2540. การศึกษาโครโมโซมของปลาสร้อยขาว ปลาร่องไม้ดัด ปลาแขวง ช้างลาย ปลาชีวาใบไม้ที่พบในประเทศไทย. เรื่องเติมการประชุมทางวิชาการของ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 35. 3 – 5 กุมภาพันธ์. หน้า 155 – 164.
7. ธวัช คอนสกุล. 2539. การศึกษาโครโมโซมของปลาเค้าดำ ปลาเค้าขาว ปลาแดงเบือ และ ปลาแก้งพะรวังที่พบในประเทศไทย. เรื่องเติมการประชุมทางวิชาการของ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 34. 30 มกราคม – 1 กุมภาพันธ์. หน้า 367 – 377.
8. ธวัช คอนสกุล วิเชียร มากตุ่น และอนันต์ พุทธิพิทยาสถาพร. 2544. การโอโตไปของปลาร่อง ไม้ดัด ปลาแขวงลาย ปลาสร้อยนกเขา และปลารวมที่พบในประเทศไทย. สัมมนาวิชาการ พันธุศาสตร์ ครั้งที่ 12. 28 – 30 มีนาคม. หน้า 218 – 211.
9. ธวัช คอนสกุล และวิเชียร มากตุ่น. 2536. การศึกษาโครโมโซมของปลากาแดง ปลา ทรงเครื่อง และปลาช่อน. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 31. 3 – 6 กุมภาพันธ์. หน้า 534 – 551.
10. ธวัช คอนสกุล และวิเชียร มากตุ่น. การศึกษาโครโมโซมของปลาหลดจุด ปลาหลดภูเขา ปลาหลด และปลากระทิงดำที่พบในประเทศไทย. การประชุมทางวิชาการของ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 30. 29 มกราคม – 1 กุมภาพันธ์. หน้า 621 – 630.
11. ธวัช คอนสกุล และวิเชียร มากตุ่น. 2534. การศึกษาโครโมโซมของปลาช่อน ช่อนงูเห่า ชะโด กระสง และปลาแก้งที่พบในประเทศไทย. การประชุมทางวิชาการของ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 29. 4 – 7 กุมภาพันธ์. หน้า 561 – 574.
12. ธวัช คอนสกุล และวิเชียร มากตุ่น. 2533. การศึกษาโครโมโซมของปลากลาย ปลาตอง ลาย และปลาสดาดที่พบในประเทศไทย. การประชุมทางวิชาการของ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 28. 29 – 31 มกราคม. หน้า 459 – 466.

13. ธวัช คอนสกุล และวิเชียร มากดุ่น. 2532. การศึกษาโครโมโซมของปลาดุกด้าน และปลาดุกอุยที่พบในประเทศไทย. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 27. หน้า 421 – 428.
14. ธวัช คอนสกุล. 2535. การศึกษาโครโมโซมของปลาเนื้ออ่อน ปลาแดง และปลาชะโอนของไทย. การประชุมทางวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 18. B – 056: 398 – 399.

ประวัติการรับทุน

- พ.ศ. 2531 การศึกษาโครโมโซมของปลาดุกด้าน และปลาดุกอุยที่พบในประเทศไทย
ทุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
- พ.ศ. 2532 การศึกษาโครโมโซมของปลากระทิง และปลากระทิงไฟที่พบในประเทศไทย
ทุนจากงบประมาณแผ่นดินของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ บางเขน
- พ.ศ. 2533 การศึกษาโครโมโซมของปลาสร้อย ปลากระแห และปลาดองลายที่พบในประเทศไทย
ทุนจากงบประมาณแผ่นดินของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ บางเขน
- พ.ศ. 2534 การศึกษาโครโมโซมของปลาเนื้ออ่อน ปลาแดง และปลาชะโอนของไทย
ทุนจากงบประมาณแผ่นดินของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ บางเขน
- พ.ศ. 2534 การศึกษาโครโมโซมของปลาช่อน ช่อนงูเห่า ชะโด กระสง และปลาก้างที่พบในประเทศไทย
ทุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
- พ.ศ. 2535 การศึกษาโครโมโซมของปลาหลดจุด ปลาหลดภูเขา ปลาหลด และปลากระทิงดำที่พบในประเทศไทย
ทุนจากงบประมาณแผ่นดินของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ บางเขน
- พ.ศ. 2540 การศึกษาโครโมโซมของปลาน้ำจืด ปลาเทพา และปลาน้ำจืดที่พบในประเทศไทย
ทุนจากเงินรายได้ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร
- พ.ศ. 2545 คาร์โบไฮเดรตของปลาวงศ์ปลาไน 15 ชนิด ที่พบในประเทศไทย
ทุนจากงบประมาณแผ่นดินของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ