รายงานวิจัย

เรื่อง

การศึกษาเซลล์พันธุศาสตร์ของอึ่งบางชนิดในสกุล *Microhyla* spp. (Anura : Microhylidae)

Cytogenetic studies of some species of the genus *Microhyla* spp. (Anura : Microhylidae)

คณะผู้วิจัย

ผศ.ดร.อุ่นเรือน เพชราวัลย์

ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม

รศ.ดร.วีรยุทธ์ เลาหะจินดา

QH
GL
668
.E2
D8311

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 116881
วัน,เดือน,ปี 16 ธ.ค. 2554

รายงานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนประเภทส่งเสริมนักวิจัย

จากคณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีงบประมาณ พ.ศ. 2549

สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

b. 12329945
i.....

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทคัดย่อ

จากการศึกษาจำนวนโครโมโซมของอึ่งแม่หนาว จากจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ และอึ่งขาคำ จากจังหวัดหนองคาย โดยใช้เทคนิคการเตรียมโครโมโซมโดยตรงจากเซลล์ไขกระดูก แบบ colchicine-hypotonic-fixation-air drying และย้อมสีด้วย giemsa พบว่าอึ่งแม่หนาว และอึ่งขาคำ มีจำนวนโครโมโซม 2n = 24 นอกจากนี้ได้ทำการศึกษาจำนวนโครโมโซมของอึ่งอ่างบ้านซึ่งจัดอยู่ใน Family Microhylidae เช่นกัน พบว่า 2n = 28 ส่วนจำนวนโครโมโซมของเขียดจิกเขียว (Family Ranidae) 2n = 26

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Abstract

Chromosomes of *Microhyla berdmorei* (Blyth, 1856) from Prajuabkirikhun province and *Microhyla pulchra* (Hallowell, 1861) from Nongkhai province were investigated. The chromosomes were directly prepared from bone marrow cells by colchicine-hypotonic-fixation-air drying technique with giemsa staining. These two species possess the same diploid chromosome number of 24. The results of *Kaloula pulchra* Gray, 1831 (Family Microhylidae) and *Hylarana erythraea* (Family Ranidae) possess the diploid chromosome number of 28 and 26, respectively.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อ	ข
Abstract	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญภาพ	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	11
บทที่ 4 ผลการทดลอง	13
บทที่ 5 อภิปรายผลการทดลอง	19
เอกสารอ้างอิง	23

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

เรื่อง	หน้า
ตารางที่ 2.1 การจำแนกชนิดของโครโมโซมโดยวัดจากตำแหน่งของเซนโทรเมียร์	10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

เรื่อง	หน้า
ภาพที่ 4.1 อึ่งแม่หนาว (*Microhyla berdmorei*) เก็บตัวอย่างจากอำเภอกุยบุรี จังหวัดประจวบคีรีขันธ์	13
ภาพที่ 4.2 อึ่งแม่หนาว (*Microhyla berdmorei*) แสดงลักษณะด้านหลัง (ภาพบน) และด้านท้อง (ภาพล่าง)	14
ภาพที่ 4.3 ลักษณะ somatic metaphase ของอึ่งแม่หนาว จำนวนโครโมโซม 2n = 24	15
ภาพที่ 4.4 อึ่งขาคำ (*Microhyla pulchra*) เก็บตัวอย่างจากจังหวัดหนองคาย	16
ภาพที่ 4.5 อึ่งขาคำ (*Microhyla pulchra*) แสดงลักษณะด้านหลัง (ภาพซ้าย) และด้านท้อง (ภาพขวา)	17
ภาพที่ 4.6 ลักษณะ somatic metaphase ของอึ่งขาคำ จำนวนโครโมโซม 2n = 24	18
ภาพที่ 5.1 อึ่งอ่างบ้าน *Kaloula pulchra* Gray, 1831 แสดงด้านหลัง (ภาพซ้าย) และด้านท้อง (ภาพขวา)	19
ภาพที่ 5.2 ลักษณะ somatic metaphase ของอึ่งอ่างบ้าน *Kaloula pulchra* Gray, 1831 จำนวนโครโมโซม 2n = 28	20
ภาพที่ 5.3 เขียดจิกเขียว (*Hylarana erythraea*) เก็บตัวอย่างจาก อำเภอกุยบุรี จังหวัดประจวบคีรีขันธ์	21
ภาพที่ 5.4 ลักษณะ somatic metaphase ของเขียดจิกเขียว (*Hylarana erythraea*) จำนวนโครโมโซม 2n = 26	22

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1. ความสำคัญ ที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย และทบทวนเอกสารที่เกี่ยวข้อง

ความหลากหลายของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในประเทศไทย ยังมีการศึกษาไม่มากนัก จากรายงานของส่วนวิจัยและพัฒนาสิ่งแวดล้อมป่าไม้ สำนักวิชาการป่าไม้ กรมป่าไม้ ในปี พ.ศ. 2541 ประเทศไทยมีสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก 106 ชนิด (สวัสดิ์, 2541) ต่อมา Office of Environment Policy and Planning (2000) รายงานจำนวนสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในประเทศไทยมีทั้งสิ้น 123 ชนิด ปัจจุบันข้อมูลเกี่ยวกับงานวิจัยของสัตว์กลุ่มนี้มีไม่มากนัก โดยเฉพาะอย่างยิ่งทางด้านชีววิทยา ปริมาณประชากร การแพร่กระจาย พฤติกรรม รวมถึงสถานภาพของสัตว์กลุ่มนี้ (กำธร, 2543) นอกจากนี้ทางด้านเซลล์พันธุศาสตร์ และพันธุศาสตร์โมเลกุลของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในประเทศไทย มีการศึกษาน้อยมากเช่นกัน

สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกเป็นสัตว์ที่มีผิวหนังอ่อนนุ่มและบาง ดังนั้นจึงได้รับผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมและมลพิษต่างๆ เช่น คุณภาพของน้ำในแหล่งอาศัย สารเคมีต่างๆ ตลอดจนอุณหภูมิที่สูงขึ้น เป็นต้น ปัจจัยดังกล่าวอาจเป็นสาเหตุทำให้สัตว์กลุ่มนี้เสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ ดังตัวอย่างที่พบในประเทศสหรัฐอเมริกา พบว่ามลพิษต่างๆมีผลทำให้สะเทินน้ำสะเทินบกผิดปกติเป็นจำนวนมากขึ้นเรื่อยๆ (Johnson, 2002)

สำหรับงานวิจัยนี้จะทำการศึกษาเซลล์พันธุศาสตร์ของอึ่งบางชนิดในสกุล*Microhyla* spp. (Anura : Microhylidae) จากรายงานของ Smith (1922) เกี่ยวการแพร่กระจายของอึ่งสกุลนี้ พบว่า อึ่งลายแต้ม (*Microhyla butleri*) มีการแพร่กระจายอย่างกว้าขวางทั่วประเทศไทย และคาบสมุทรอินโดจีน

จารุจินต์ (2532) รายงานการแพร่กระจายของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกแถบภาคตะวันออกของประเทศไทยรวมทั้งสิ้น 107 ชนิด ในจำนวนนี้เป็นอึ่งสกุล *Microhyla* spp. 5 ชนิด คือ อึ่งลายแต้ม (*M. butleri*) อึ่งน้ำเต้า (*M. ornata*) อึ่งแม่หนาว (*M. berdmorei*) อึ่งข้างดำ (*M. heymonsi*) อึ่งขาคำ (*M. pulchra*)

สำนักงานโครงการจัดทำแผนแม่บทและการจัดการพื้นที่อุทยานแห่งชาติเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่า (2536) รายงานข้อมูลพื้นฐาน แผนแม่บทการพื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่า เขาสอยดาว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จังหวัดจันทบุรี พบ *Microhyla* spp. 5 ชนิด ดังนี้ อึ่งอันนัม (*M. annamensis*) อึ่งลายแต้ม (*M. butleri*) อึ่งน้ำเต้า (*M. ornata*) อึ่งแม่หนาว (*M. berdmorei*) และอึ่งข้างดำ (*M. heymonsi*)

Matsui *et al.* (1996) รายงานการศึกษาชนิดของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกบริเวณภาคตะวันออกของประเทศไทย สำหรับอึ่งในสกุล *Microhyla* spp. ที่พบ ได้แก่ อึ่งแม่หนาว (*M. berdmorei*) อึ่งน้ำเต้า (*M. ornata*) อึ่งข้างดำ (*M. heymonsi*) และอึ่งขาคำ (*M. pulchra*)

จันทร์ทิพย์ (2543) ศึกษาโครงสร้างของปากที่มีความสัมพันธ์กับพฤติกรรมการกินอาหารของลูกอ๊อดบางชนิด จากการสำรวจพบอึ่งสกุล *Microhyla* spp. ดังนี้ อึ่งน้ำเต้า (*M. ornata*) ปรากฏตลอดทั้งปี และแพร่กระจายทั่วประเทศไทย อึ่งขาคำ (*M. pulchra*) พบลูกอ๊อดในแอ่งน้ำขังชั่วคราวทั้งในพื้นที่ป่าและในเมือง อึ่งลายแต้ม (*M. butleri*) พบลูกอ๊อดในแอ่งน้ำนิ่งขนาดใหญ่ พบมากในเดือนกรกฎาคม ส่วนอึ่งแม่หนาว (*M. berdmorei*) สถานที่พบคือน้ำตกตาดหมอก อุทยานแห่งชาติดอยสุเทพ-ปุย และศูนย์วิจัยสัตว์ป่าดอยเชียงดาว อำเภอเชียงดาว จังหวัดเชียงใหม่ ในเดือนธันวาคม พบที่น้ำแม่ฟ้า อำเภอแจ้ห่ม จังหวัดลำปาง ในเดือนพฤศจิกายน อุทยานแห่งชาติเขานัน อำเภอนบพิตำ จังหวัดนครศรีธรรมราช ในเดือนธันวาคม และเมษายน

โกวิท (2545) รายงานการสำรวจชนิดของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกกลุ่มกบในพื้นที่อุทยานแห่งชาติเขาคิชฌกูฏ จังหวัดจันทบุรี พบอึ่งในสกุล *Microhyla* spp. 5 ชนิด คือ อึ่งแม่หนาว (*M. berdmorei*) อึ่งลายแต้ม (*M. butleri*) อึ่งข้างดำ (*M. heymonsi*) อึ่งน้ำเต้า (*M. ornata*) และอึ่งขาคำ (*M. pulchra*)

วุฒิ (2546) ศึกษาความหลากชนิดของกบตัวเต็มวัยและลูกอ๊อดในพื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าคลองแสง พบ อึ่งแม่หนาว (*M. berdmorei*) อึ่งข้างดำ (*M. heymonsi*) และ อึ่งบอร์เนียว (*M. borneensis*)

สำหรับงานวิจัยนี้ทำการศึกษาถึงเซลล์พันธุศาสตร์ของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกโดยเฉพาะอย่างยิ่งอึ่งในสกุล *Microhyla* spp. บางชนิด เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาชนิดของสัตว์กลุ่มนี้ในระดับโมเลกุลต่อไป เนื่องจากข้อมูลทางด้านนี้ของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในประเทศไทยมีไม่มากนัก

1.2. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาลักษณะรูปร่างและจำนวนโครโมโซมของอึ่งในสกุล *Microhyla* spp.

1.2.2 ศึกษาเทคนิคที่เหมาะสมในการวิเคราะห์คาริโอไทป์ของอึ่งในสกุล *Microhyla* spp.

1.2.3 เพื่อนำผลที่ได้ไปประยุกต์ใช้ในการตรวจและวิเคราะห์โครโมโซมของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกกลุ่มอื่นๆต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

1.3.1 ทำให้ทราบเทคนิคที่เหมาะสมในการศึกษาโครโมโซมของอึ่งในสกุล *Microhyla* spp.

1.3.2 สามารถจำแนกชนิดของอึ่งในสกุล *Microhyla* spp. ได้จากจำนวนโครโมโซมและลักษณะรูปร่างของโครโมโซม

1.3.3 ได้ข้อมูลเบื้องต้นที่จะนำไปสู่การศึกษาชนิดของอึ่งในระดับโมเลกุลต่อไป

1.4 หน่วยงานที่นำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

มหาวิทยาลัย กระทรวงศึกษาธิการ และกรมป่าไม้ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

1.5 ขอบเขตของโครงการวิจัย

1.5.1 ศึกษาเทคนิคที่เหมาะสมในการศึกษาคาริโอไทป์ของอึ่งบางชนิดในสกุล *Microhyla* spp.

1.5.2 ตรวจสอบจำนวนโครโมโซมและลักษณะรูปร่างของโครโมโซมของอึ่งบางชนิด ในสกุล *Microhyla* spp.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การศึกษาเซลล์พันธุศาสตร์ของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก ส่วนมากเตรียมตัวอย่างจากเนื้อเยื่อหลากชนิด และวิธีการเตรียมหลายวิธี เช่น เตรียมจากเม็ดเลือดขาว ซึ่ง Kasahara *et al.* (1998) ได้อธิบายเทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวก่อนที่จำนำมาศึกษาเซลล์พันธุศาสตร์ โดยศึกษาสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในวงศ์ Bufonidae, Hylidae และ Leptodactylidae อาหารที่เลี้ยงเซลล์ ได้แก่ T 199-Earl Salts, RPMI 1640, MEM และ อาหารสำหรับเลี้ยงสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกโดยเฉพาะ (Amphibian culture medium) โดยดูดเลือดจากหัวใจห้องล่างประมาณ 0.2-0.3 มิลลิลิตร ต่อ 1 ตัว ปริมาตรเลือดที่ได้ขึ้นอยู่กับขนาดของตัวสัตว์ด้วย กรณีที่ได้เลือดน้อยกว่า 0.5 มิลลิตร จะใช้อาหาร 2.5 มิลลิลิตร และไม่ต้องปั่นแยกเม็ดเลือดขาวออกจากเม็ดเลือดแดง จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 26 หรือ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 วัน นอกจากนี้ Kasahara *et al.* (1998) ยังอธิบายขั้นตอนการใช้ colchicine โดยแนะนำให้หยด colchicines ลงไปในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ดังกล่าวข้างต้นประมาณ 2 หยดต่ออาหาร 5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 90 นาที เมื่อครบกำหนดทำการปั่นเซลล์ด้วยความเร็ว 800-1,000 รอบ/นาที นาน 7 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง แล้วเติมสารละลาย hypotonic (pre-warm 0.075 M KCl hypotonic solution) 5 มิลลิลิตร ทำให้เซลล์แขวนลอยโดยใช้ปิเปตต์ดูดสารละลายพ่นตะกอนเซลล์ขึ้นลง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที เมื่อครบกำหนดทำการปั่นเซลล์ด้วยความเร็ว 800-1,000 รอบ/นาที นาน 7 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง ต่อมาทำ pre-fixation ที่อุณหภูมิห้อง โดยตอนแรกหยด fixative ที่เย็นจัด 6 หยด (methanol:acetic acid = 3:1) ทำให้เซลล์แขวนลอยโดยการเคาะขวดเพาะเลี้ยงเบาๆประมาณ 5 นาที จากนั้นหยด fixative เพิ่มลงไปอีก 0.5 มิลลิลิตร ใช้ปิเปตต์ดูดสารละลายพ่นขึ้นลงเพื่อให้ตะกอนเซลล์แขวนลอย ประมาณ 5 นาที นำไปปั่นแยก ดูดส่วนใสทิ้ง ทำวิธีการดังกล่าวซ้ำอีก 2 ครั้งหรือมากกว่า ต่อมาหยดเซลล์ที่อยู่ใน fixative ครั้งสุดท้าย ลงบนสไลด์ที่สะอาด 1-2 หยด ใช้วิธี air dried ในอุณหภูมิห้อง ทิ้งไว้ตลอดคืน จึงทำการย้อมสี Giemsa

นอกจากเม็ดเลือดขาวแล้ว Odierna *et al.* (2000) ยังใช้เนื้อเยื่อของอวัยวะภายในมาทำคาริโอไทป์ของ *Alytis muletensis* โดยฉีดสารละลาย colchicine (0.5 มิลลิกรัม/มิลลิตร) ความเข้มข้นที่ใช้ 0.01 มิลลิลิตร/น้ำหนักตัวสัตว์ 1 กรัม ปล่อยให้ colchicine อยู่ในตัวสัตว์นาน 2 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จึงจะวางยาสลบ นำเนื้อเยื่อส่วนของลำไส้ ม้าม ปอด และอัณฑะ ไปศึกษาต่อไป ส่วนสีที่ย้อมคือ 5% Giemsa pH 7.0 และพบว่าจำนวนโครโมโซมของ *Alytis muletensis* 2n=38

Vences *et al.* (2000) ศึกษาคาริโอไทป์ของ *Nannophrys ceylonensis* (2n=26) *N. marmorata* (2n=26) ส่วน *Indirana* sp. (2n=30) และ *I.* cf. *leptodactyla* (2n=24) โดยใช้เนื้อเยื่อจากลำไส้ ม้าม ปอด และอัณฑะ ความเข้มข้นของ colchicine และสีย้อมที่ใช้เช่นเดียวกับ Odierna *et al.* (2000) การนับจำนวนโครโมโซมนับจากเซลล์ระยะเมทาเฟสที่ชัดเจนอย่างน้อย 25 metaphase plates ส่วนการศึกษาคาริโอไทป์ใช้เซลล์ประมาณ 6 metaphase plates โดยทำการหาค่า Relative length, Centromeric index

Vences *et al.* (2002) ศึกษาคาริโอไทป์ของ Micorhylid ในสกุล *Scaphiophryne* 3 ชนิด ดังนี้ *Scaphiophryne gottlebei*, *S. madagascariensis* และ *S. spinosa* ใช้ตัวเต็มวัยในการศึกษา ความเข้มข้นของ colchicines ที่ฉีดเข้าช่องท้อง (0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ใช้ 0.01 มิลลิตร/น้ำหนักตัว 1 กรัม ปล่อยทิ้งไว้นาน 2 ชั่วโมง ผ่าเอาส่วนของลำไส้และอวัยวะสืบพันธุ์ใส่ลงใน 0.5% sodium citrate บ่มเป็นเวลา 30 นาที และ fix ด้วย ethanol:acetic acid=3:1

Zhu *et al.* (2002) ใช้เลือดจากหัวใจของ Andrias davidianus (Blanchard, 1871) (Cryptobranchidae, Caudata) ปริมาตรเลือดที่ใช้เท่ากับ 0.2 มิลลิลตรต่อสัตว์ 1 ตัว เลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ บ่มที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดให้หยด 0.1% colchicine ลงไป 2-3 หยด จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมง เมื่อย้อมสีแล้วศึกษาลักษณะของโครโมโซม โดยแบ่งกลุ่มโครโมโซมตามขนาดออกเป็น 2 กลุ่ม คือ ขนาดใหญ่ (macrochromosome) และขนาดเล็ก (microchromosome)

Andreone *et al.* (2003) ศึกษาคาริโอไทป์ของ *Mantidactylus* sp. ใช้ colchicines (0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ปริมาตร 0.01 มิลลิลิตร/น้ำหนักตัว 1 กรัม ปล่อยให้อยู่ในตัวสัตว์นาน 2-4 ชั่วโมง นำส่วนของลำไส้ ปอด ม้าม และอัณฑะ บ่มในสารละลาย 0.7% sodium citrate นอกจากนี้ยังใช้เซลล์ไขกระดูกในการศึกษาเช่นกัน

นอกจากนี้ Cuevas *et al.* (2003) ศึกษาจำนวนโครโมโซมของสกุล *Alsodes* (Anura:Leptodactylidae) 4 ชนิด คือ *Alsodes pehuenche*, *A. vanzolinii*, *A. verrucosus*, และ *A.* aff. *vittatus* ทั้ง 4 ชนิด 2n=26 ส่วน Azevedo et al. (2003) ศึกษาคาริโอไทป์ของ *Bufo ictericus* และ *B. paracnemis* โดยการย้อมสี Giemsa พบ 2n=22 ทั้งสองชนิด และโครโมโซมประกอบด้วย submetacentric และ metacentric นอกจากนี้ยังพบ secondary constriction ที่ short arm ของโครโมโซมคู่ที่ 7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Rosa *et al.* (2003) ศึกษาความผันแปรของคาริโอไทป์ของกบ 3 ชนิด คือ *Megaelosia massarti*, *M. boticariana* และ *M. lutzae* โดยใช้เนื้อเยื่อของตัวเต็มวัยและลูกอ๊อด ฉีด 1% colchicines เข้าช่องท้อง สำหรับตัวเต็มวัย ปล่อยทิ้งไว้นาน 4 ชั่วโมง ส่วนลูกอ๊อด ปล่อยทิ้งไว้ 4-5 ชั่วโมง แยกเนื้อเยื่อบุผิวของลำไส้ และอัณฑะ มาศึกษาจำนวนโครโมโซม ผลที่ได้คือ *M. boticariana* 2n=30 *M. lutzae* 2n=32 และ *M. massarti* 2n=28+1 เนื่องจากพบ B-chromosome ในกบชนิดนี้

Siqueira-Jr. (2004) ศึกษาคาริโอไทป์ของ *Eleutherodactylus binotatus* โดยวิธีย้อม Giemsa ใช้เนื้อเยื่อบุผิวลำไส้ อัณฑะ และเซลล์ไขกระดูก ช่วงเวลาของการปล่อยให้ colchicine อยู่ในช่องท้องนาน 3 ชั่วโมง และย้อมด้วย 10% Giemsa พบว่าทั้ง 3 ชนิดมีจำนวนโครโมโซมเท่ากัน 2n=22

แนวทางศึกษาเซลล์พันธุศาสตร์ของอึ่ง

ก. การเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อ

1. เซลล์เม็ดเลือดขาว (Kasahara *et al.*, 1998 ; Zhu *et al.*, 2002)

1.1 วางยาสลบอึ่งด้วยคลอโรฟอร์มหรืออีเทอร์ จากนั้นผ่าผิวหนังส่วนอกและท้อง ใช้เข็มฉีดยาซึ่งเคลือบด้วยสาร heparin เพื่อป้องกันการแข็งตัวของเลือด เจาะเข็มฉีดยาเข้าที่หัวใจห้องล่าง (ventricle) ของอึ่ง ดูดเลือดเข้ากระบอกฉีดยา สำหรับปริมาตรที่ได้ขึ้นอยู่กับขนาดของตัวสัตว์ แต่โดยทั่วไปเก็บเลือดประมาณ 0.2-0.3 มิลลิลิตร

1.2 นำตัวอย่างเลือดที่ได้ 0.2 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดเพาะเลี้ยงที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากับ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

1.3 หยดสารละลาย colchicine 0.1% ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส นาน 90 นาที colchicines เป็นสารที่ช่วยยับยั้งการสร้าง spindle fiber ของเซลล์ ทำให้เซลล์ที่แบ่งแบบไมโทซิส จะหยุดอยู่ที่ระยะเมทาเฟสเป็นส่วนใหญ่ และโครโมโซมในระยะเมทาเฟสมีลักษณะหดสั้นมองเห็นรูปร่างได้ชัดเจน

1.4 ทำการปั่นแยกเอาสารละลาย colchicines ออก ด้วยการปั่นที่ความเร็ว 800 -1,000 รอบ/นาที นานประมาณ 7 นาที ดูดส่วน supernatant ทิ้ง

1.5 เติมสารละลาย hypotonic (pre-warmed 0.075 M KCl) 5 มิลลิลิตร ลงในขวดที่มีตะกอนเซลล์ ทำให้เซลล์แขวนลอย จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 45 นาที (Kasahara *et al.*, 1998)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.6 ทำการปั่นแยกเอา 0.075 M KCl ออกทิ้ง โดยปั่นที่ความเร็ว 800 -1,000 รอบ/นาที นาน 7 นาที ดูด supernatant ทิ้ง แล้วเติม fixative (methanol:acetic acid = 3:1) ที่เย็นจัด (ice-cold fresh fixative) ลงในหลอดประมาณ 0.5 มิลลิลิตร ทำให้เซลล์แขวนลอยด้วยการเคาะขวดเพาะเลี้ยง แช่เซลล์นาน 5 นาที จากนั้นเติม fixative เพิ่มอีก 0.5 มิลลิลิตร และใช้ปิเปตต์ดูดฟองทำให้ตะกอนเซลล์แขวนลอย เซลล์แช่อยู่ใน fixative ต่ออีก 5 นาที จากนั้นนำไปปั่นเอาส่วน supernatant ทิ้ง แล้วเติม fixative ลงไปอีกตามขั้นตอนข้างต้น อาจทำประมาณ 2 ครั้ง หรือมากกว่า ทั้งนี้ทำจนกว่าตะกอนเซลล์ที่อยู่ก้นหลอดจะขาวสะอาด สุดท้ายเติม fixative ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร (Kasahara *et al.*, 1998)

1.7 นำเซลล์แขวนลอยที่อยู่ใน fixative หยดลงบนสไลด์ที่สะอาด 2-3 หยด จากนั้นปล่อยให้แห้งในอากาศ เพื่อนำไปย้อมสี Giemsa ต่อไป

2. เนื้อเยื่อจากอวัยวะภายใน (Vences *et al.*, 2002 ; Andreone, 2003)

2.1 ฉีดสารละลาย colchicine (0.1-0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ปริมาตร 0.01 มิลลิลิตร/น้ำหนักตัวสัตว์ 1 กรัม เข้าในส่วนช่องท้อง ปล่อยให้ colchicine อยู่ในตัวสัตว์นาน 2-4 ชั่วโมง

2.2 ทำการฆ่าอึ่งแล้วแยกเอาส่วนของลำไส้ ม้าม ปอด และอัณฑะ (กรณีที่เป็นเพศผู้)

2.3 แช่เนื้อเยื่อที่ได้จากข้อ 4.1.2.2 ลงในสารละลาย hypotonic ในที่นี้ใช้สารละลายโซเดียมซิเตรต (sodium citrate solution) 0.5%-0.7% แช่เนื้อเยื่อในสารละลาย hypotonic นาน 30 นาที ทั้งนี้เพื่อให้เซลล์พองตัว

2.4 แยกสารละลาย hypotonic ออก ด้วยการปั่นแยกที่ความเร็วรอบ 1,000-1,200 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้น fix เซลล์ในสารละลาย fixative (ethanol หรือ methanol : acetic acid อัตราส่วน 3:1) นานประมาณ 2-3 ชั่วโมง (อมรา, 2540)

2.5 หยดเซลล์ที่แขวนลอยอยู่ใน fixative ลงบนสไลด์ เพื่อให้เซลล์กระจายด้วยวิธี air dried ผึ่งสไลด์ให้แห้ง เพื่อนำไปย้อมสี Giemsa ต่อไป กรณีที่เซลล์จากข้อ 4.1.2.4 ยังไม่เป็นเซลล์เดี่ยวๆ เราอาจจะปั่นแยก fixative ทิ้ง แล้วเติม acetic acid 50% ทำการบดเซลล์ จากนั้นหยดเซลล์ที่บดแล้วลงบนสไลด์ที่สะอาด ทำวิธี air dried ผึ่งสไลด์ให้แห้ง เพื่อนำไปย้อมสี Giemsa (วิธีการทำให้โครโมโซมกระจายตัวได้ดีบนสไลด์ ทำได้โดยนำสไลด์ไปอุ่นที่อุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. เซลล์จากไขกระดูก

3.1 ฉีดสารละลาย colchicine (0.1-0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ปริมาตร 0.01 มิลลิลิตร/น้ำหนักตัวอึ่ง 1 กรัม โดยฉีดเข้าช่องท้อง และปล่อยให้ colchicines อยู่ในตัวสัตว์นาน 2-4 ชั่วโมง (Vences *et al.*, 2002 ; Andreone *et al.*, 2003)

3.2 วางยาสลบฆ่าอึ่ง จากนั้นใช้กรรไกรตัดกระดูกขาส่วน femur และ tibia (อมรา, 2540)

3.3 ใช้กระบอกฉีดยาดูดสารละลาย hypotonic (0.075 M KCl) 0.5 มิลลิลิตร ฉีดเข้าในโพรงกระดูกดันเซลล์จากโพรงกระดูกออกมาพร้อมกับสารละลาย hypotonic โดยมีหลอดแก้วรองรับไว้ ปล่อยให้เซลล์อยู่ในสารละลายดังกล่าวเป็นเวลา 30 นาที (อมรา, 2540)

3.4 ทำการปั่นแยกเซลล์ออกจากสารละลาย hypotonic ด้วยความเร็ว 800-1,000 รอบ/นาที นาน 7 นาที (Kasahara *et al.*, 1998) ดูดเอาส่วน supernatant ออก จากนั้นเติม fixative (methanol:acetic acid อัตราส่วน 3:1) ต้องเป็น fixative ที่เย็นจัด (ice-cold fresh fixative) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ปิเปตต์ขึ้นลงทำให้เซลล์แขวนลอย เมื่อครบเวลา 5 นาที เติม fixative ลงไปอีก 0.5 มิลลิลิตร ปิเปตต์ขึ้นลงทำให้เซลล์แขวนลอย เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำการปั่นแยกส่วน supernatant ทิ้ง ทำขั้นตอนนี้ 2 ครั้งหรือมากกว่า จนกระทั่งตะกอนเซลล์ในหลอดมีสีขาวสะอาด จากนั้นจึงเติม fixative ที่เย็นจัดเป็นครั้งสุดท้ายปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร (Kasahara *et al.*, 1998)

3.5 หยดเซลล์ที่แขวนลอยใน fixative (ข้อ 4.1.3.4) ลงบนสไลด์ที่สะอาด เป็นการกระจายเซลล์ด้วยวิธี air dried จากนั้นผึ่งให้แห้งในอากาศ รอการย้อมสี Giemsa ต่อไป

ข. การย้อมสี

1. การย้อมสีแบบธรรมดา (conventional staining)

นำสไลด์ที่ได้จากการเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อ ข้อ 4.1 หยดสารละลายสี Giemsa ความเข้มข้น 5%-10% และ pH 7.0 (Andreone *et al.*, 2003) ; Siqueira *et al.*, 2004) ลงบนสไลด์ดังกล่าว ทิ้งไว้เป็นเวลา 5-10 นาที จากนั้นล้างสีย้อมออกด้วยน้ำกลั่น และปล่อยให้แห้งสนิทในอากาศ พร้อมที่จะนำไปตรวจสอบลักษณะของโครโมโซมต่อไป

2. การย้อมแถบสีแบบจี (G-banding) (Seabright, 1971 ; อมรา, 2540)

2.1 นำสไลด์ที่ได้จากการเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อ ข้อ 4.1 ควรเป็นสไลด์ที่เตรียมเสร็จใหม่ๆ ถ้าเป็นสไลด์ที่เตรียมนานแล้ว ต้องนำไปอบที่อุณหภูมิ 60-65 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง-ตลอดคืน (overnight)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 แช่สไลด์ลงในสารละลาย trypsin 0.025% ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส กรณีสไลด์ที่เตรียมเสร็จใหม่ๆแช่ไว้นาน 10-15 วินาที และถ้าเป็นสไลด์ที่เตรียมไว้นานต้องแช่เป็นเวลา 30-45 วินาที

2.3 จุ่มสไลด์อย่างรวดเร็วลงใน Sorensen buffer เพื่อหยุดการทำงานของ trypsin

2.4 ผึ่งสไลด์ให้แห้งสนิท และย้อมด้วยสี Giemsa 5-10% นาน 5-10 นาที จากนั้นล้างสไลด์ด้วยน้ำกลั่นและผึ่งให้แห้งในอากาศ

ค. การวิเคราะห์โครโมโซม

1. นำสไลด์ตัวอย่างสัตว์ที่ย้อมแถบสีโครโมโซมแบบต่างๆตามขั้นตอน 4.1-4.2 มาตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ compound เพื่อศึกษาลักษณะรูปร่างของโครโมโซม การนับจำนวนโครโมโซมควรเลือกเซลล์ที่มีการกระจายของโครโมโซมดี ควรนับจากตัวอย่างจำนวน 25 metaphase plates และการทำคาริโอไทป์ควรใช้เซลล์ประมาณ 6 metaphase plates (Vences *et al.*, 2000) ถ่ายภาพด้วยกล้อง compound โดยใช้ objective lens กำลังขยาย 100 X

2. การศึกษาลักษณะของโครโมโซม โดยการวัดขนาดคู่โครโมโซม พิจารณาจากความยาวของโครโมโซม และเซนโทรเมียร์ และคำนวณหาค่า centromeric index (CI) arm ratio (AR) และ relative length (RL) โดยค่า CI และ AR เป็นตัวบอกรูปร่างโครโมโซมนั้นๆ ส่วนค่า RL เป็นค่าที่ช่วยบอกขนาดของโครโมโซม 1 แท่ง เมื่อเปรียบเทียบกับโครโมโซมอื่นๆทั้งจีโนม

Centromeric index (CI) = p/p+q x 100

Arm ratio (AR) = q/p

(p = short arm, q = long arm, p+q = total length of each chromosome)

$$\text{Relative length (RL)} = \frac{\text{ความยาวของโครโมโซมที่ศึกษา}}{\text{ผลรวมของความยาวของโครโมโซมทั้งหมดในจำนวน haploid}} \times 100$$

(อมรา, 2540 ; Vences *et al.*, 2000)

จากค่า Centromeric index (CI) ใช้บอกชนิดของโครโมโซมว่าเป็นชนิด metacentric, submetacentric, acrocentric หรือ telocentric ดังแสดงในตารางที่ 1.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 การจำแนกชนิดของโครโมโซมโดยวัดจากตำแหน่งของเซนโทรเมียร์ (อมรา, 2540)

Centromere position	Alternative terminology	Chromosome symbol	Centromere index range
Near median	Metacentric	m	46-49
Submedian	Submetacentric (more metacentric)	sm	36-45
Submedian	Submetacentric (less metacentric)	sm	26-35
Subterminal	Acrocentric	st	15-30
Terminal	Telocentric	t	< 15

Chromosome symbol = สัญญลักษณ์ที่ใช้เรียกชื่อย่อของชนิดโครโมโซม

Zhu *et al.* (2002) ทำการแบ่งโครโมโซมออกเป็น 2 กลุ่ม (categories) คือ ขนาดใหญ่ (large) และขนาดเล็ก (small) (large, i.e. the relative length of a chromosome equals to or exceed 3% of the total length of all chromosome put together and small or microchromosome, if the length is less than 3% of the entire set)

ง. การทำคาริโอไทป์

คาริโอไทป์ (karyotype) หมายถึง การนำเอาโครโมโซมแต่ละแท่งจากเซลล์ในระยะเมทาเฟส (จากเซลล์ 1 เซลล์) มาเรียงเป็นคู่ homologus โดยเรียงตามลำดับโครโมโซมจากขนาดใหญ่ที่สุดไปยังขนาดเล็กที่สุด การวางโครโมโซมจะวางโดยให้แขนข้างสั้น (p) ตั้งขึ้น และนิยมวางโครโมโซมเพศอยู่ที่มุมล่างขวาสุด การจัดรูปโครโมโซมให้เป็นหมวดหมู่ ด้วยการใช้ภาพที่ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ compound สิ่งสำคัญที่สุดของการทำคาริโอไทป์ คือต้องมีรูปภาพโครโมโซมที่ดีและชัดเจน เรียงโครโมโซมประมาณ 6 คู่ ใน 1 แถว (อมรา, 2540)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

- กล้องจุลทรรศน์แบบ compound
- เครื่องปั่นเหวี่ยง
- ตู้ปลาสำหรับเลี้ยงอึ่ง
- สวิงสำหรับจับลูกอ๊อด
- สไลด์ และกระจกปิดสไลด์
- ถาดวางสไลด์สำหรับย้อมสี
- ขวดแก้ว Duran สำหรับเตรียมสารเคมี
- หลอดพลาสติคสำหรับใส่ปั่นสาร (centrifuge tube)
- ขวดสำหรับใส่สไลด์ขณะย้อมสี
- สี Giemsa
- oil สำหรับ objective lens 100 x
- เมทานอล
- กรด acetic
- แอลกอฮอล์ 99.99 %

3.2 วิธีการ

3.2.1 การเตรียมตัวอย่างเซลล์จากไขกระดูก

1. ฉีดสารละลาย colchicine (0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ปริมาตร 0.01 มิลลิลิตร/น้ำหนักตัวอึ่ง 1 กรัม โดยฉีดเข้าช่องท้อง และปล่อยให้ colchicines อยู่ในตัวสัตว์นาน 2 ชั่วโมง 30 นาที
2. วางยาสลบฆ่าอึ่ง จากนั้นใช้กรรไกรตัดกระดูกขาส่วน femur และ tibia
3. ใช้กระบอกฉีดยาดูดสารละลาย hypotonic (0.075 M KCl) 0.5 มิลลิลิตร ฉีด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เข้าในโพรงกระดูกดันเซลล์จากโพรงกระดูกออกมาพร้อมกับสารละลาย hypotonic โดยมีหลอดแก้วรองรับไว้ ปล่อยให้เซลล์อยู่ในสารละลายดังกล่าวเป็นเวลา 30 นาที

4. ทำการปั่นแยกเซลล์ออกจากสารละลาย hypotonic ด้วยความเร็ว 3,500 รอบ/นาที นาน 5 นาที ดูดเอาส่วน supernatant ออก จากนั้นเติม fixative (methanol:acetic acid อัตราส่วน 3:1) ต้องเป็น fixative ที่เย็นจัด (ice-cold fresh fixative) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ปิเปตต์ขึ้นลงทำให้เซลล์แขวนลอย เมื่อครบเวลา 5 นาที เติม fixative ลงไปอีก 0.5 มิลลิลิตร ปิเปตต์ขึ้นลงทำให้เซลล์แขวนลอย เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำการปั่นแยกส่วน supernatant ทิ้ง ทำขั้นตอนนี้ 3 ครั้ง จนกระทั่งตะกอนเซลล์ในหลอดมีสีขาวสะอาด จากนั้นจึงเติม fixative ที่เย็นจัดเป็นครั้งสุดท้ายปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร

5. หยดเซลล์ที่แขวนลอยใน fixative (ข้อ 4) ลงบนสไลด์ที่สะอาด เป็นการกระจายเซลล์ด้วยวิธี air dried จากนั้นผึ่งให้แห้งในอากาศ รอการย้อมสี Giemsa ต่อไป

3.2.2 **การย้อมสี**

การย้อมสีแบบธรรมดา (conventional staining)

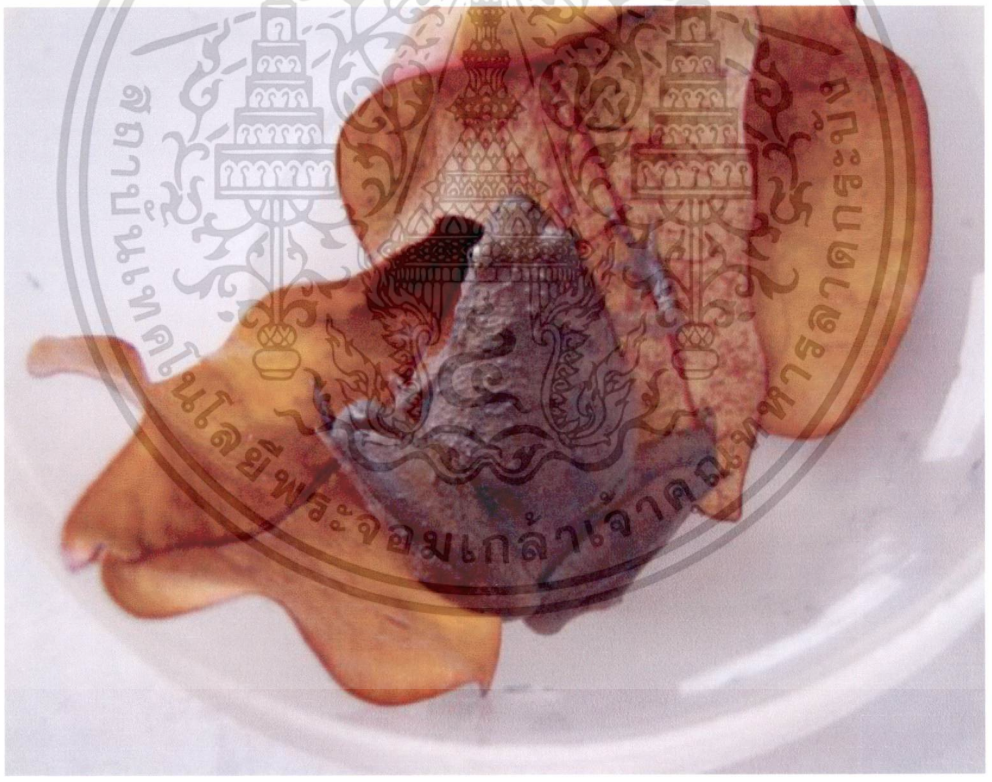
นำสไลด์ที่ได้จากการเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อ ข้อ 3.1.1 หยดสารละลายสี Giemsa ความเข้มข้น 10% และ pH 7.0 (Andreone *et al*., 2003) ; Siqueira *et al*., 2004) ลงบนสไลด์ดังกล่าว ทิ้งไว้เป็นเวลา 5-10 นาที จากนั้นล้างสีย้อมออกด้วยน้ำกลั่น และปล่อยให้แห้งสนิทในอากาศ พร้อมที่จะนำไปตรวจสอบลักษณะของโครโมโซมต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลอง

จากผลการทดลองพบว่าอึ่งแม่หนาวและอึ่งขาคำมีจำนวนโครโมโซม 2n = 24 แต่ถ้าทำการศึกษาลักษณะรูปร่างของโครโมโซม (chromosome shape) พบว่า อึ่งแม่หนาวมีโครโมโซมแบบ Metacentric คู่ที่ 1, 5, 6, 9, 12 Submetacentric คู่ที่ 2, 3, 4, 7, 8, 10, 11 ส่วนอึ่งขาคำมีโครโมโซมแบบ Metacentric คู่ที่ 1, 5, 6, 9, 11,12 Submetacentric คู่ที่ 2, 3, 4, 7, 8, 10

4.1 อึ่งแม่หนาว *Microhyla berdmorei* (Blyth, 1856) (ภาพที่ 4.1)

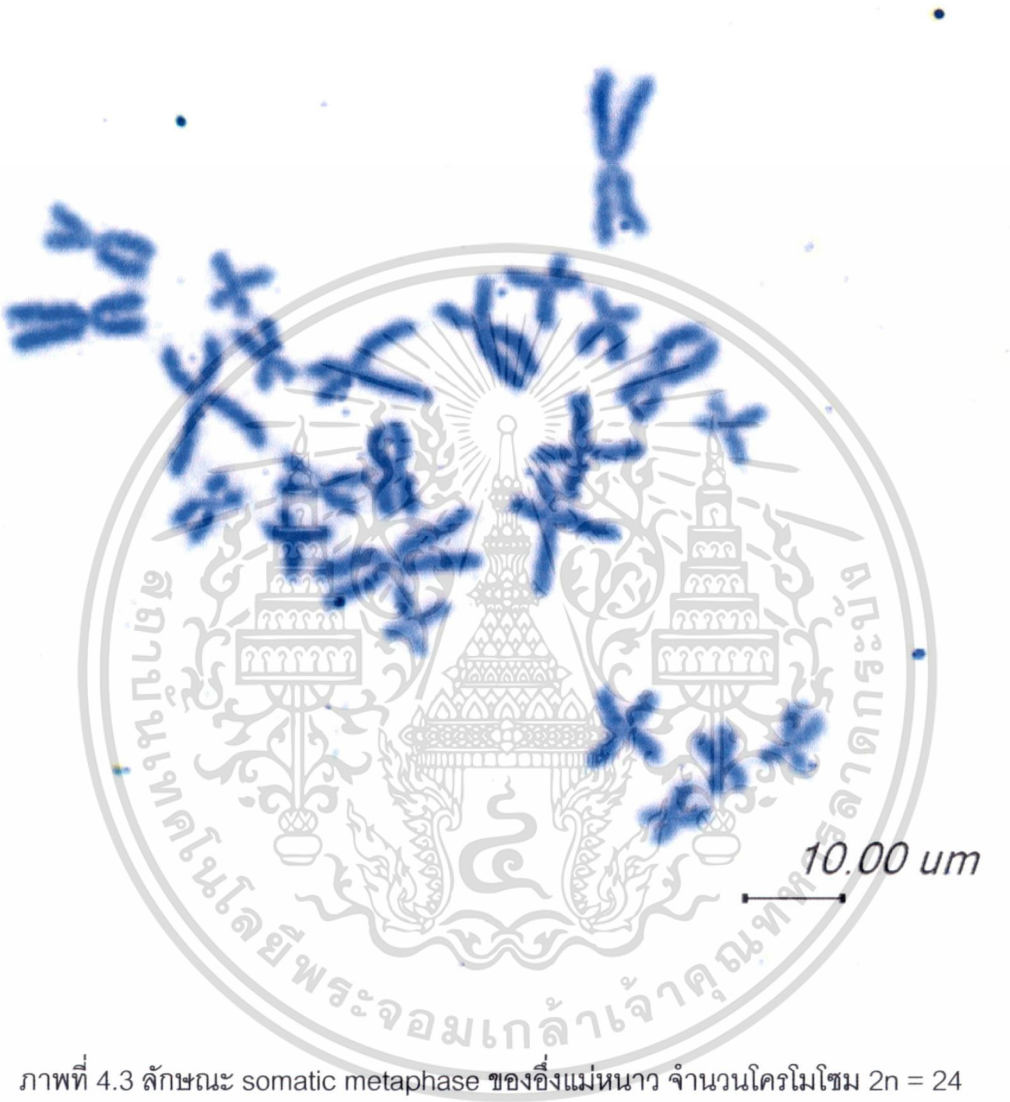


ภาพที่ 4.1 อึ่งแม่หนาว (*Microhyla berdmorei*) เก็บตัวอย่างจากอำเภอกุยบุรี จังหวัดประจวบคีรีขันธ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 4.2 อึ่งแม่หนาว (*Microhyla berdmorei*) แสดงลักษณะด้านหลัง (ภาพบน) และด้านท้อง (ภาพล่าง)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.3 ลักษณะ somatic metaphase ของอึ่งแม่หนาว จำนวนโครโมโซม 2n = 24

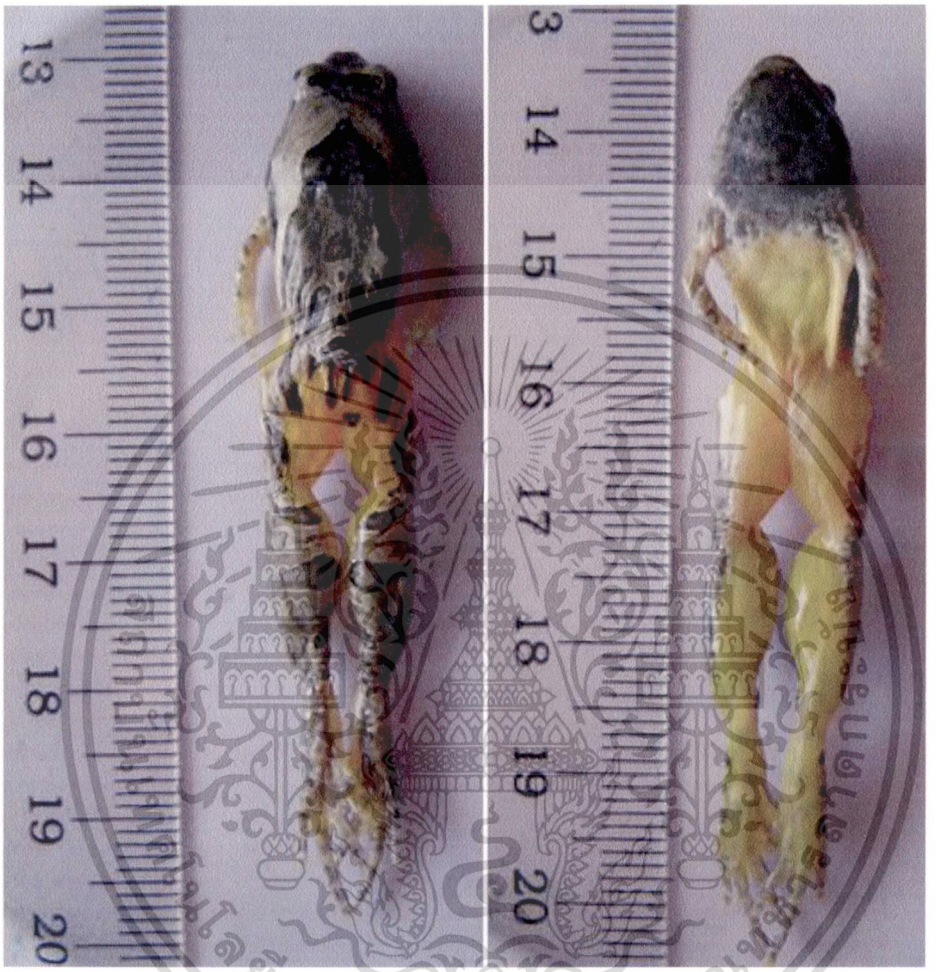
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 **อึ่งขาคำ** *Microhyla pulchra* (Hallowell, 1861)(**ภาพที่** 4.3)

ภาพที่ 4.4 อึ่งขาคำ (*Microhyla pulchra*) เก็บตัวอย่างจากจังหวัดหนองคาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

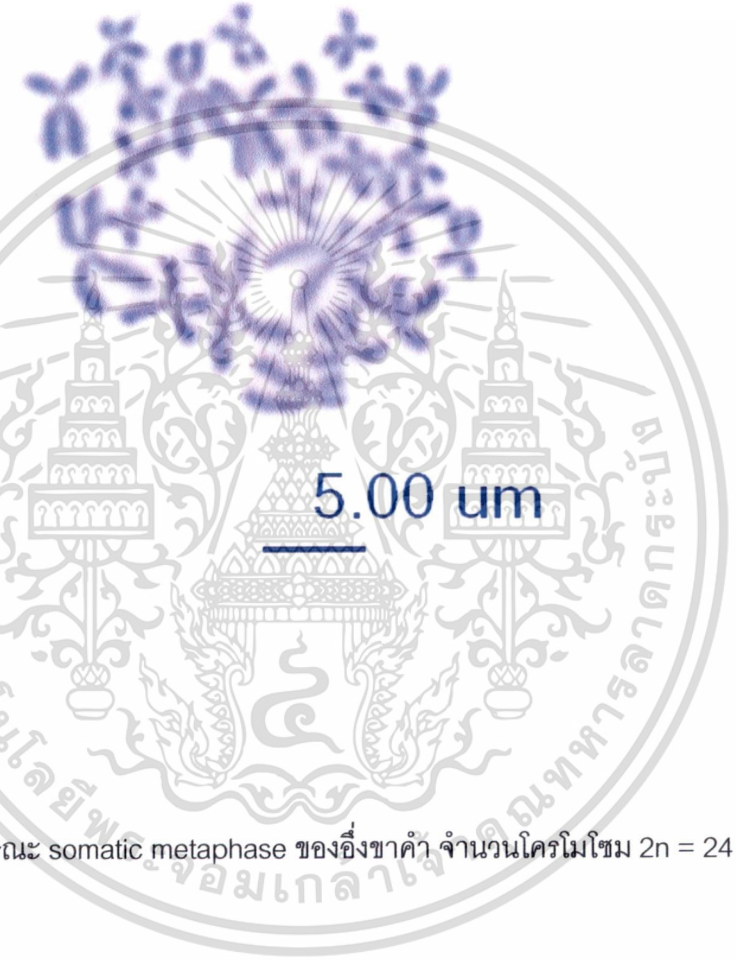
สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง



ภาพที่ 4.5 อึ่งขาคำ (*Microhyla pulchra*) แสดงลักษณะด้านหลัง (ภาพซ้าย) และด้านท้อง (ภาพขวา)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

116881



ภาพที่ 4.6 ลักษณะ somatic metaphase ของอึ่งขาคำ จำนวนโครโมโซม 2n = 24

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

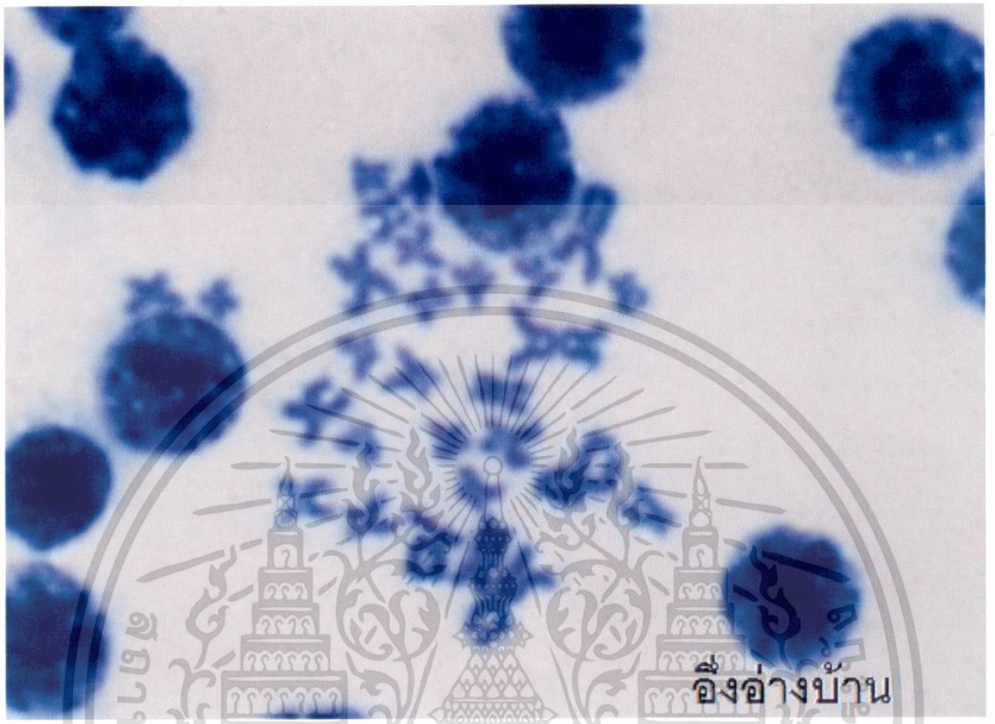
บทที่ 5
อภิปรายผลการทดลอง

จากผลการทดลองพบว่าอึ่งแม่หนาวและอึ่งขาคำมีจำนวนโครโมโซม 2n = 24 แต่ถ้าทำการศึกษาลักษณะรูปร่างของโครโมโซม (chromosome shape) พบว่า อึ่งแม่หนาวมีโครโมโซมแบบ Metacentric คู่ที่ 1, 5, 6, 9, 12 Submetacentric คู่ที่ 2, 3, 4, 7, 8, 10, 11 ส่วนอึ่งขาคำมีโครโมโซมแบบ Metacentric คู่ที่ 1, 5, 6, 9, 11,12 Submetacentric คู่ที่ 2, 3, 4, 7, 8, 10

จากการศึกษาจำนวนโครโมโซมของอึ่งอ่างบ้าน (*Kaloula pulchra*) (ภาพที่ 5.1) Family Microhylidae และเขียดจิกเขียว (*Hylarana erythraea*) (ภาพที่ 5.3) Family Ranidae พบว่าอึ่งอ่างบ้าน มีจำนวนโครโมโซม 2n = 28 (ภาพที่ 5.2) ส่วนเขียดจิกเขียว มีจำนวนโครโมโซม 2n = 26 (ภาพที่ 5.4)

ภาพที่ 5.1 อึ่งอ่างบ้าน *Kaloula pulchra* Gray, 1831 แสดงด้านหลัง (ภาพซ้าย) และด้านท้อง (ภาพขวา)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

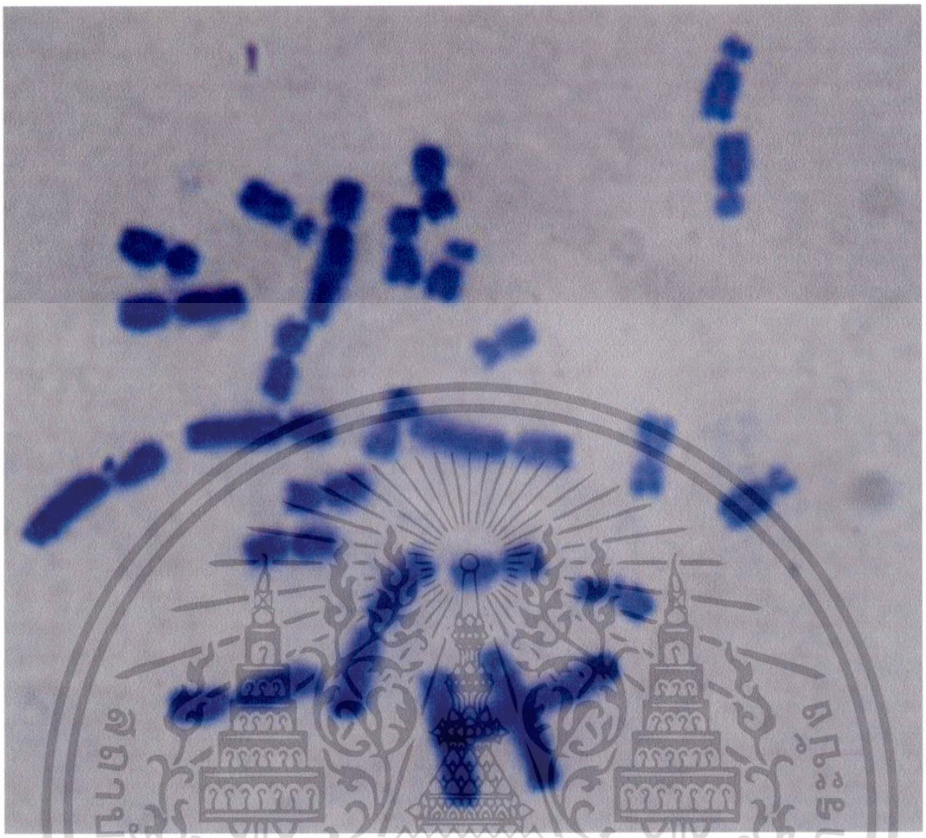


ภาพที่ 5.2 ลักษณะ somatic metaphase ของอึ่งอ่างบ้าน *Kaloula pulchra* Gray, 1831 จำนวนโครโมโซม 2n = 28

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 5.3 เขียดจิกเขียว (*Hylarana erythraea*) เก็บตัวอย่างจาก อำเภอกุยบุรี จังหวัดประจวบคีรีขันธ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 5.4 ลักษณะ somatic metaphase ของเขียดจิกเขียว (*Hylarana erythraea*) จำนวนโครโมโซม 2n = 26

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

โกวิท น้อยโคตร. 2545. ความหลากชนิดของกบตัวเต็มวัยและลูกอ๊อดในพื้นที่อุทยานแห่งชาติเขาคิชฌกูฏ จังหวัดจันทบุรี. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

จารุจินต์ นภีตะภัฏ. 2532. ความหลากหลายของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกและสัตว์เลื้อยคลานในประเทศไทย. น. 169-204. *ใน* สิริวัฒน์ วงษ์ศิริ และศุภชัย หล่อโลหการ (ผู้รวบรวม). ความหลากหลายทางชีวภาพของประเทศไทย. บริษัทประชาชนจำกัด, กรุงเทพฯ.

จันทร์ทิพย์ อินธาระ. 2543. การศึกษาโครงสร้างปากที่มีความสัมพันธ์กับพฤติกรรมการกินอาหารของลูกอ๊อดบางชนิด. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วุฒิ ทักษิณธรรม. 2546. ความชนิดของกบตัวเต็มวัยและลูกอ๊อดในพื้นที่เขตรักษาพันธ์สัตว์ป่าคลองแสง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สำนักงานโครงการจัดทำแผนแม่บทและการจัดการพื้นที่อุทยานแห่งชาติเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่า. 2536. ข้อมูลพื้นฐานแผนแม่บทการจัดการพื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาสอยดาว จังหวัดจันทบุรี. กรมป่าไม้, กรุงเทพฯ.

สวัสดิ์ วงศ์ถิรวัฒน์. 2541. รายชื่อสัตว์ป่ามีกระดูกสันหลังในประเทศไทย. กลุ่มนิเวศวิทยาและสิ่งแวดล้อม. ส่วนวิจัยและพัฒนาสิ่งแวดล้อมป่าไม้ สำนักวิชาการป่าไม้ กรมป่าไม้, กรุงเทพฯ.

อมรา คัมภิรานนท์. 2540. พันธุศาสตร์ของเซลล์. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

Andreone, F., Aprea, G., Vences, M. and Odierna, G. 2003. A new frog of the genus *Mantidactylus* from the rainforest of north-eastern Madagascar, and its karyological affinities. Amphibia-Reptilia 24:285-303.

Azevedo, M.F.C., Foresti, F., Ramos, P.R.R. and Jim, J. 2003. Comparative cytogenetic studies of Bufo ictericus, B. paracnemis (Amphibia, Anura) and an intermediate from in sympatry. Genet. Mol. Biol. 26:289-294.

Cuevas, C.C. and Formas, J.R. 2003. Cytogenetic analysis of four species of the genus *Alsodes* (Anura:Leptodactylidae) with comments about the karyological evolution of the genus. Hereitas 138:138-147.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Johnson, D.H. 2002. Northern Prairie Wildlife Research Center. Introduction to the Malformed Amphibian Issue. Available http://www.npwrc.usgs.gov/narcam/backgrnd.Html,October 20, 2002.

Kasahara, S., Silva, A.P.Z. and Gruber, S.L. 1998. Use of lymphocyte cultures for BrdU replication banding patterns in anura species (Amphibia). Genet.Mol.Biol. 21(4). Available http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1415-47571998000400011&script=sci_arttext

Matsui,M., Nabhitabhata, J., Chan-Ard, T. and Thirakhupt, K. 1996. Amphibians fauna of Thailand, pp 28-63. *In* M. Matsui (ed.). Evolutionary Studies of the Small Animals Living in Asia Tropic 1994-1995. Kyoto University, Japan.

Odierna, G., Andreone, F., Aprea, G., Arribas, O., Capriglione, T. and Vences, M. 2000. Cytological and molecular analysis in the rare discoglossid species, *Alytes muletensis* (Sanchiz & Adrover 1997) and its bearing on archeobatrachian phylogeny. Chromosome Research 8:435-442.

Office of Environmental Policy and Planning. 2000. National Report: biodiversity conservation in Thailand. Ministry of Science, Technology and Environment.

Rosa, C., Aguiar-Jr, O., Giaretta, A.A. and Recco-Pimentel, S.M. 2003. Karyotypic variation in the genus *Megaelosia* (Anura, Hylodinae) with the first description of a B-chromosome in a Leptodactylid frog. Copeia 1:166 -174.

Seabright, M. 1971. A rapid band technique for human chromosomes. Lancell ii : 970-972.

Siqueira-Jr, S., Ananias, F. and Recco-Pimentel, S.M. 2004. Cytogenetics of three Brazilian species of *Eleutherodactylus* (Anura, Leptodactylidae) with 22 chromosomes and re-analysis of multiple translocations in *E. binotatus*. Genet. Mol. Biol. 27:363-372.

Smith, M.A. 1922. Reptile and Batrachians from Siam and Indo-China, (No.1). Jour. Nat. Hist. Soc. Siam. 4:203-214.

Supaprom, T. 2003. Cytogenetics of Amphibians in Thailand. Ph.D. Dissertation, Mahidol University, Thailand.

Vences, M., Aprea, G., Capriglione, T., Andreone, F. and Odierna, G. 2002. Acient

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

tetraploidy and slow molecular evolution in *Scaphiophryne*: ecological correlates of speciation mode in Madagasy relict amphibian. Chromosome Research 10: 127-136.

Vences, M., Wanke, S., Odierna, G., Kosuch, J. and Veith, M. 2000. Molecular and karyological data on the South Asian ranid genera *Indirana*, *Nyctibatrachus* and *Nannophrys* (Anura: Ranidae). Hamadryad 25:75-82.

Zhu, B., Feng, Z., Qu, A., Gao, H., Zhang, Y., Sun, D., Song, W. and Saura, A. 2002. Brief report. The karyotype of the caudate amphibian Andrias davidianus. Hereditas 136:85-88.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้