



เซลล์พันธุศาสตร์ของปาดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย

พิทักษ์ สีดา

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
ปีการศึกษา 2561
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี



CYTOGENETICS OF TREE FROGS IN NORTHEASTERN REGION OF THAILAND

PHITHAK SEEDA

A THESIS SUMMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS
FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
MAJOR IN BIOTECHNOLOGY
FACULTY OF SCIENCE
UBON RATCHATHANI UNIVERSITY
ACADEMIC YEAR 2018
COPYRIGHT OF UBON RATCHATHANI UNIVERSITY



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์

เรื่อง เซลล์พันธุศาสตร์ของปาดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย

ผู้วิจัย นายพิทักษ์ สีดา

คณะกรรมการสอบ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ประวีร์ณ์ สุพรรณอ่วม	ประธานกรรมการ
ศาสตราจารย์ ดร.พงศ์ศักดิ์ รัตนชัยกุลโสภณ	กรรมการ
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ถาวร สุภาพรม	กรรมการ

อาจารย์ที่ปรึกษา

.....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ถาวร สุภาพรม)

.....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชรีดา ปุกหุด)
คณะบดีคณะวิทยาศาสตร์

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.อริยาภรณ์ พงษ์รัตน์)
รองอธิการบดีฝ่ายวิชาการ

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
ปีการศึกษา 2561

กิตติกรรมประกาศ

การดำเนินงานวิจัยวิทยานิพนธ์เรื่องเซลล์พันธุศาสตร์ของปาดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยได้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี โดยรายงานวิจัยฉบับนี้ได้รับเงินทุนสนับสนุนในการทำวิทยานิพนธ์ระดับบัณฑิตศึกษา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ผู้ทำวิจัยใคร่ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ประวีร์ณ สุพรรณอ่วม ประธานกรรมการ ศาสตราจารย์ ดร. พงศ์ศักดิ์ รัตนชัยกุล โสภณ กรรมการ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ถาวร สุภาพร กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษาเป็นอย่างสูง ที่ให้ความอนุเคราะห์ในด้านความรู้ทางเซลล์พันธุศาสตร์และคำแนะนำ และขอขอบคุณ ณ ถึงศูนย์วิเคราะห์โครโมโซม ภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้วัสดุ อุปกรณ์ สารเคมี และสถานที่ในการปฏิบัติงาน

ขอขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ประวีร์ณ สุพรรณอ่วม ที่ให้คำปรึกษาและเทคนิคต่าง ๆ ในการเขียนไอดีโอแกรม และขอบคุณคณาจารย์และผู้เชี่ยวชาญทุก ๆ ท่าน ภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ที่คอยให้คำแนะนำ และช่วยเหลือในทุก ๆ ด้าน ขอขอบคุณเพื่อน ๆ ทั้งที่ศึกษาในหลักสูตรเดียวกันที่คอยให้กำลังใจตลอดมา สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ญาติพี่น้องทุกคนที่คอยให้กำลังใจช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ ทั้งสนับสนุนเรื่องค่าใช้จ่ายตลอดการศึกษา คำแนะนำ ความรักและคอยเป็นกำลังใจอันดียิ่งจากทุก ๆ ท่าน จึงขอกราบขอบพระคุณ ณ โอกาสนี้

พิทักษ์ สีดา

ผู้วิจัย

บทคัดย่อ

เรื่อง : เซลล์พันธุศาสตร์ของปาดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย
 ผู้วิจัย : พัทธ์ชัย สีดดา
 ชื่อปริญญา : วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
 สาขาวิชา : เทคโนโลยีชีวภาพ
 อาจารย์ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ถาวร สุภาพรม
 คำสำคัญ : ปาด, โครโมโซม, คาริโอไทป์, ตำแหน่ง secondary constriction

การศึกษาเซลล์พันธุศาสตร์ของปาด 3 ชนิด คือ ปาดบ้าน (*Polypedates leucomystax*) ปาดแคระป่า (*Philautus parvulus*) และปาดเหนือ (*Polypedates mutus*) ที่เก็บตัวอย่างจากแหล่งที่อยู่อาศัยตามธรรมชาติ เพื่อศึกษาไมโทติกโครโมโซมจากเซลล์ไขกระดูกโดยใช้วิธี *in vivo* colchicine treatment จากนั้นย้อมแถบโครโมโซมแบบจี (G-banding) แบบซี (C-banding) และแบบนอร์ (NOR-banding) ผลการศึกษาพบว่า ปาดทั้ง 3 ชนิด มีจำนวนโครโมโซม ($2n$) เท่ากับ 26 และมีคาริโอไทป์ประกอบด้วย โครโมโซมขนาดใหญ่จำนวน 5 คู่ และโครโมโซมขนาดเล็กจำนวน 8 คู่ เหมือนกันทั้ง 3 ชนิด เมื่อวิเคราะห์ตำแหน่งของ secondary constriction พบว่าปาดบ้านมีตำแหน่งของ secondary constriction ที่บริเวณแขนยาวของโครโมโซมคู่ที่ 6 และปาดแคระป่าพบที่บริเวณแขนยาวของโครโมโซมคู่ที่ 6 และคู่ที่ 7 แต่ไม่พบตำแหน่ง secondary constriction ในปาดเหนือ การย้อมแถบแบบซี พบว่าปาดทั้ง 3 ชนิด ติด c-positive ที่ตำแหน่งของ centromere คล้าย ๆ กัน ส่วนการย้อมแถบแบบนอร์ ในปาดบ้านพบตำแหน่งนอร์ 1 ตำแหน่ง คือ บริเวณแขนสั้นโครโมโซมคู่ที่ 12 ปาดแคระป่าพบตำแหน่งนอร์ 2 ตำแหน่ง คือ บริเวณแขนยาวโครโมโซมคู่ที่ 6 และคู่ที่ 7 และในปาดเหนือพบตำแหน่งนอร์ 2 ตำแหน่ง คือ บริเวณแขนสั้นโครโมโซมคู่ที่ 1 และคู่ที่ 4 การศึกษาในครั้งนี้ไม่พบความแตกต่างของโครโมโซมเพศในปาดทั้ง 3 ชนิด ข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับรูปร่างโครโมโซมและคาริโอไทป์ของปาดทั้ง 3 ชนิดนี้ มีความอนุรักษ์ค่อนข้างสูง (quite conserved) ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาวิวัฒนาการของสัตว์กลุ่มนี้ต่อไปในอนาคต

ABSTRACT

TITLE : CYTOGENETICS OF TREE FROGS IN NORTHEASTERN REGION OF THAILAND
 AUTHOR : PHITHAK SEEDA
 DEGREE : MASTER DEGREE
 MAJOR : BIOTECHNOLOGY
 ADVISOR : ASST. PROF. THAVORN SUPARPROM, Ph.D.
 KEYWORDS : RHACOPHORID FROG, CHROMOSOME, KARYOTYPE, SECONDARY CONSTRICTION

This research was the cytogenetic studies of 3 rhacophorid frog species included four-lined tree frog (*Polypedates leucomystax*), dwarf bush frog (*Philautus parvulus*) and northern tree frog (*Polypedates mutus*). The mitotic chromosomes were prepared directly from bone marrow after *in vivo* colchicine treatment and analyzed following G-banding, C-banding and NOR-banding techniques. The diploid chromosome number of all species studied was 26 ($2n=26$). The standard karyotypes of all species studied consisted of 5 pairs of large chromosome and 8 pairs of small chromosome. The karyotype of *P. leucomystax* exhibited clearly a secondary constriction at the location in the long arm of the chromosome no. 6 whereas *P. parvulus* showed secondary constriction positions in the long arm of the chromosome no. 6 and 7. A secondary constriction wasn't found in *P. mutus*. The C-banded pattern of 3 rhacophorid frog species showed constitutive heterochromatin bands at the centromere of all chromosome complements. However, the result of nucleolar organizer region (NOR) position located in the short arm of chromosome pair no.12 in *P. leucomystax* whereas *P. parvulus* showed 2 NOR positions in the long arm of the chromosome no. 6 and 7 and *P. mutus* showed 2 NOR positions in the short arm of the chromosome no. 1 and 4. It was found a homomorphic sex chromosome of 3 rhacophorid frog species. This study about karyotype and chromosome morphology of 3 rhacophorid frog species at chromosome level were found to be quite conserved and these results will be useful for future studies of evolutionary relationship in the rhacophorid frogs.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ช
คำอธิบายสัญลักษณ์และอักษรย่อ	ณ
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ที่มาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานทำวิจัย	3
1.3 ขอบเขตของงานทำวิจัย	3
1.4 ประโยชน์ที่ได้รับที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
2.1 การกำเนิดและวิวัฒนาการของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก	4
2.2 วิวัฒนาการจากปลามาเป็นสัตว์สี่ขา	8
2.3 วิวัฒนาการของลิ้นและแคมฟิเลียมาเป็นสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก	11
2.4 การจัดระบบอนุกรมวิธานของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก	12
2.5 ลักษณะของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก	12
2.6 อนุกรมวิธานและการจัดจำแนก	12
2.7 ปาตที่พบในประเทศไทย	14
2.8 การศึกษาเซลล์พันธุศาสตร์ของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก	19
2.9 เครื่องหมายบนแท่งโครโมโซม	19
2.10 การย้อมแถบโครโมโซมและการศึกษาโครงสร้าง	20
2.11 การย้อมแถบโครโมโซมแบบจี	21
2.12 การย้อมแถบโครโมโซมแบบซี	22
2.13 การย้อมแถบโครโมโซมแบบนอร์	22
2.14 การศึกษาเซลล์พันธุศาสตร์ของปาต	23

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	
3.1 การสำรวจและเก็บตัวอย่าง	25
3.2 การเตรียมโครโมโซมเซลล์ไขกระดูก	27
3.3 การย้อมแถบโครโมโซม	
3.4 การวัดขนาด การจัดเรียงคาริโอไทป์ การวิเคราะห์โครโมโซม และการทำแบบจำลองโครโมโซม (ideogram)	29
บทที่ 4 ผลการวิจัย	
4.1 ผลการวิจัย	31
บทที่ 5 สรุปผลวิจัย อภิปรายผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ	
5.1 สรุปผลการวิจัย	41
5.2 อภิปรายผลการวิจัย	41
5.3 ข้อเสนอแนะ	44
เอกสารอ้างอิง	45
ภาคผนวก	50
ประวัติผู้วิจัย	56

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	ปาดที่พบในประเทศไทย	15
2.2	จำนวนโครโมโซมของปาดชนิดต่าง ๆ	24
3.1	จำนวนปาดที่พบจากการสำรวจในการศึกษา	26
3.2	การจำแนกรูปร่างโครโมโซมโดยอาศัยค่า CR	30
4.1	ผลการวิเคราะห์ค่าเปอร์เซ็นต์โครโมโซมสัมพันธ์ (%RL) ค่าอัตราส่วนของแขนโครโมโซมแต่ละแท่ง (CR) และขนาดของโครโมโซมของ ปาดบ้าน	32
4.2	ผลการวิเคราะห์ค่าเปอร์เซ็นต์โครโมโซมสัมพันธ์ (%RL) ค่าอัตราส่วนของแขนโครโมโซมแต่ละแท่ง (CR) และขนาดของโครโมโซมของ ปาดแคระปา	35
4.3	ผลการวิเคราะห์ค่าเปอร์เซ็นต์โครโมโซมสัมพันธ์ (%RL) ค่าอัตราส่วนของแขนโครโมโซมแต่ละแท่ง (CR) และขนาดของโครโมโซมของ ปาดเหนือ	38
5.1	ข้อมูลจำนวนโครโมโซมของปาดในการศึกษาครั้งนี้ เทียบกับข้อมูลจำนวนโครโมโซมของปาดชนิดต่าง ๆ ที่มีมาก่อนหน้า	43

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	ครีบคู่ซึ่งเป็นกระดูกอ่อนหรือกระดูกแข็ง	4
2.2	กระดูกคลุมเหงือก เหงือก เกล็ดแบบ ganoid และหางที่สมมาตร	5
2.3	กระเพาะลม (swim bladder) และ หัวใจห้อง ventricle ของปลา	5
2.4	ปลา coelacanth	6
2.5	ปลาปอดออสเตรเลีย	7
2.6	ลักษณะการมีช่องเปิดของกะโหลกศีรษะบริเวณกระดูกขมับ	8
2.7	การวิวัฒนาการของปลาที่อยู่บนบกจนกลายมาเป็นสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก และกลายเป็นสัตว์เลื้อยคลานในที่สุด	9
2.8	ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของปลา และสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก	10
2.9	รูปร่างของโครโมโซมแบบต่าง ๆ	21
3.1	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของปาดบ้าน (<i>Polypedates leucomystax</i>)	25
3.2	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาปาดเหนือ (<i>Polypedates mutus</i>)	26
3.3	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแคระป่า (<i>Philautus parvulus</i>)	26
4.1	คาริโอไทป์ของปาดบ้าน (<i>Polypedates leucomystax</i>) จากการย้อมแถบโครโมโซมแบบต่าง ๆ	32
4.2	ไอดีโอแกรมของปาดบ้าน และการแสดง ตำแหน่ง secondary constriction จากการย้อมแถบโครโมโซมแบบจี	33
4.3	ไอดีโอแกรมของปาดบ้านและการแสดงตำแหน่ง centromere จากการย้อม แถบโครโมโซมแบบจี	33
4.4	ไอดีโอแกรมของปาดบ้าน และการแสดงตำแหน่งนอร์ จากการย้อม แถบโครโมโซมแบบนอร์	34
4.5	คาริโอไทป์ของแคระป่า (<i>Philautus parvulus</i>) จากการย้อมแถบ โครโมโซมแบบต่าง ๆ	35
4.6	ไอดีโอแกรมของปาดแคระป่า และการแสดงตำแหน่ง secondary constriction จากการย้อมแถบโครโมโซมแบบจี	36
4.7	ไอดีโอแกรมของปาดแคระป่าและการแสดงตำแหน่ง centromere จากการย้อม แถบโครโมโซมแบบจี	36

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
4.8	ไอทีโอแกรมของปาดเคราะห์ป่า และการแสดงตำแหน่งนอร์ จากการย้อม แถบโครโมโซมแบบนอร์	37
4.9	คาริโอไทป์ของปาดเหนือ (<i>Polypedates mutus</i>) จากการย้อมแถบ โครโมโซมแบบต่าง ๆ	38
4.10	ไอทีโอแกรมแบบจำลองโครโมโซมของปาดเหนือจากการย้อมแถบ โครโมโซมแบบจี	39
4.11	ไอทีโอแกรมของปาดเหนือและการแสดงตำแหน่ง centromere จากการ ย้อมแถบโครโมโซมแบบซี	39
4.12	ไอทีโอแกรมของปาดเหนือ และการแสดงตำแหน่งนอร์ จากการย้อมแถบ โครโมโซมแบบนอร์	40

คำอธิบายสัญลักษณ์และอักษรย่อ

สัญลักษณ์และอักษรย่อ	ความหมาย
G-banding	การย้อมแถบโครโมโซมแบบจี
C-banding	การย้อมแถบโครโมโซมแบบซี
NOR-banding	การย้อมแถบโครโมโซมแบบนอร์
mg/ml	มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
M	molality (mol/liter)
°C	องศาเซลเซียส
%	เปอร์เซ็นต์
2XSSC	สารผสมระหว่าง sodium chloride กับ tri-sodium citrate
%RL	เปอร์เซ็นต์ความยาวโครโมโซมสัมพัทธ์ (percent of relative length)
AR or CR	อัตราส่วนของแขนโครโมโซมแต่ละแท่ง หรือ อัตราส่วนของเซนโทรเมียร์ (arm ratio or centromeric ratio)
L	โครโมโซมขนาดใหญ่ (large size)
s	โครโมโซมขนาดเล็ก (small size)
m	โครโมโซมรูปร่างเมตาเซนตริก (metacentric)
sm	โครโมโซมรูปร่างซับเมตาเซนตริก (submetacentric)
st or ac	โครโมโซมรูปร่างซับเทโลเซนตริก (subtelocentric) หรืออะโครเซนตริก (acrocentric)
tc	โครโมโซมรูปร่างเทโลเซนตริก (telocentric)
α	infinity

บทที่ 1 บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก (amphibians) เป็นสัตว์มีกระดูกสันหลังพวกแรกที่มีการวิวัฒนาการเพื่อที่จะมาอาศัยอยู่บนบก (land animal) จึงเป็นสัตว์ที่เป็นตัวเป็นต่อ (transition form) ระหว่างสัตว์ที่อาศัยอยู่บนบกและสัตว์ที่อาศัยอยู่ในน้ำ ส่งผลให้วงจรชีวิตของสัตว์กลุ่มนี้ช่วงชีวิตหนึ่งอาศัยอยู่ในน้ำและอีกช่วงชีวิตหนึ่งอาศัยอยู่บนบก ซึ่งคำว่า amphibians จึงมีความหมายว่าสัตว์ที่ดำรงชีวิตอยู่ได้สองแบบทั้งบนบกและในน้ำ (biphasic life cycle) สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกมีความหลากหลายทางชีวภาพสูง โดยสัตว์แต่ละชนิดมีการปรับตัวเพื่อที่จะดำรงชีวิตในแหล่งที่อยู่อาศัยตามธรรมชาติหลายแบบ ทำให้มีลักษณะรูปร่างและพฤติกรรมของสัตว์แตกต่างกันออกไป สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกจัดอยู่ใน Kingdom: Animalia, Phylum: Chordata, Subphylum: Vertebrata, Superclass: Tetrapoda, Class: Amphibia, ปัจจุบันมีสัตว์กลุ่มนี้มากกว่า 6,800 ชนิด จัดอยู่ใน 3 อันดับ (Order) ได้แก่ ซาลาแมนเดอร์ (Order Caudata) เขียดงู (Order Gymnophiona or Apoda) และกบ เขียดและคางคก (Order Anura) (วิระยุทธ์ เลหาจินดา, 2552; Schooch, 2009)

ประเทศไทยตั้งอยู่ในแถบเส้นศูนย์สูตร จึงส่งผลให้สภาพภูมิอากาศมีลักษณะร้อนชื้นและมีความหลากหลายทางชีวภาพของสัตว์กลุ่มนี้สูง สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกจึงมีความสำคัญต่อระบบนิเวศและความสมดุลของสภาพแวดล้อมในธรรมชาติ ดังนั้นสัตว์กลุ่มนี้จึงสามารถบ่งบอกหรือเตือนล่วงหน้าให้ทราบถึงสภาวะการณของสิ่งแวดล้อมที่กำลังสูญเสียสมดุลได้ ซึ่งเปรียบเสมือนมาตรวัดสุขภาพของโลก (world health indicator) เนื่องจากผิวหนังของสัตว์เหล่านี้สัมผัสกับสิ่งแวดล้อมโดยตรงปราศจากสิ่งห่อหุ้ม และมีการชีวิตอยู่ในสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกันถึงสองแบบ ปัจจุบันสภาพของสัตว์ในกลุ่มนี้อยู่ในสถานะที่ น่าวิตกมาก บางชนิดมีจำนวนลดลงจนอาจสูญพันธุ์ ทั้งนี้เพราะถิ่นที่อยู่อาศัยอยู่ในสภาวะวิกฤตจากการบุกรุกตัดไม้ทำลายป่า การใช้สารเคมี ยาปราบศัตรูพืชและยาฆ่าแมลงอย่างแพร่หลาย การล่าเพราะความกลัวหรือเกลียดชัง การล่าเพื่อการค้าอย่างไร้ขอบเขต ตลอดจนการขาดข้อมูลหรือความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับสัตว์กลุ่มนี้ เนื่องจากการละเลยและมองข้ามความสำคัญของกลุ่มนักวิจัย ดังนั้นจึงจำเป็นต้องอย่างยิ่งที่จะต้องมีการศึกษาวิจัยเพื่อสร้างองค์ความรู้ใหม่เกี่ยวกับสัตว์กลุ่มนี้ให้เพียงพอและครบถ้วน เพื่อนำมาประกอบและประยุกต์ใช้ในการอนุรักษ์ การจัดการ และการใช้ประโยชน์อย่างเหมาะสม ยั่งยืนและรู้คุณค่าในอนาคต

การตอบสนองต่อความเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมแบบต่าง ๆ ทำให้สิ่งมีชีวิตเกิดการเปลี่ยนแปลงและมีการวิวัฒนาการอยู่ตลอดเวลาภายใต้กระบวนการคัดเลือกโดยธรรมชาติ ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางพันธุกรรมในสิ่งมีชีวิต โดยมีอิทธิพลทั้งภายในและภายนอกเป็นตัวกระตุ้น คุณสมบัติเฉพาะของโครโมโซม สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาวิวัฒนาการและการจัดจำแนกกลุ่มหรือชนิดของสิ่งมีชีวิตได้ โครโมโซมเป็นโครงสร้างทางพันธุกรรมที่ประกอบด้วยสาย

ดีเอ็นเอ (DNA) จับอยู่กับโปรตีนฮิสโตน (histone protein) และพันกันไปมาอย่างซับซ้อนอยู่ภายในนิวเคลียสของเซลล์ รูปร่างของโครโมโซมจะเปลี่ยนแปลงไปตามวัฏจักรของการแบ่งเซลล์ โครโมโซมที่อยู่ในรูปแบบของสายใยโครมาติน (chromatin fiber) จะหดสั้นเข้าจนเห็นเป็นรูปร่างทรงกระบอกในระยะเมตาเฟส ทำให้มองเห็นได้ชัดเจน ดังนั้นการศึกษาโครโมโซมจึงมักที่จะใช้ระยะนี้ โครโมโซมแต่ละแท่งจะมีรอยคอดตำแหน่งที่ 1 (primary constriction) แต่ในโครโมโซมบางแท่งอาจพบโครโมโซมเครื่องหมาย (chromosome marker) เช่น รอยคอดตำแหน่งที่ 2 (secondary constriction) หรือ โครงสร้างที่เป็นติ่งส่วนเล็ก ๆ (satellite) ยื่นออกจากโครโมโซมที่ต่อจากตำแหน่ง secondary constriction ซึ่ง secondary constriction บางครั้งอาจเป็น ตำแหน่ง nucleolar organizer region (NOR) ที่ทำหน้าที่ในการสร้าง ribosomal RNA โดยทั่วไปตำแหน่ง NOR มักเป็นตำแหน่งเดียวกันกับตำแหน่ง secondary constriction ซึ่งอาจพบได้มากกว่า 1 คู่ การมีตำแหน่งเซนโทรเมียร์ทำให้แบ่งโครโมโซมออกเป็น 2 ส่วน คือ แขนยาว (long arm) และแขนสั้น (short arm) ส่งผลให้จำแนกรูปร่างของโครโมโซมเป็น 4 แบบคือ

(1) เมตาเซนตริก (metacentric) คือ โครโมโซมที่มีตำแหน่งเซนโทรเมียร์อยู่ตรงกลาง ทำให้แขนยาว และแขนสั้นมีขนาดเท่ากันหรือใกล้เคียงกัน

(2) ซับเมตาเซนตริก (submetacentric) คือ โครโมโซมที่มีตำแหน่งเซนโทรเมียร์อยู่ค่อนข้างไปด้านใดด้านหนึ่ง ทำให้แขนยาวมีความยาวมากกว่าแขนสั้น

(3) อะโครเซนตริก (acrocentric) คือ โครโมโซมที่มีตำแหน่งเซนโทรเมียร์อยู่ค่อนข้างไปด้านใดด้านหนึ่งมากจนทำให้แขนสั้นมีความยาวสั้นกว่าแขนยาวมาก

(4) เทโลเซนตริก (telocentric) คือ โครโมโซมที่มีตำแหน่งเซนโทรเมียร์อยู่ปลายสุดของแท่งโครโมโซม ทำให้มีแขนสั้นมีเฉพาะแขนยาวเท่านั้น

กบ เขียด ปาด อึ่งอ่าง คางคก ถูกจัดให้อยู่ ชั้น (Class) Amphibia ชั้นย่อย (Subclass) Lissamphibia อันดับ (Order) Anura ซึ่งมีทั้งหมด 27 วงศ์ (Family) สามารถจัดจำแนกเป็นปาดได้ 4 วงศ์ (Family) คือ Hylidae, Dendrobatidae, Hyperoliidae และ Rhacophoridae ในประเทศไทยพบเฉพาะปาดในวงศ์ Rhacophoridae เท่านั้น ซึ่งประเทศไทยพบปาดทั้งหมด 35 ชนิด (วีระยุทธ เลาเหะจินดา, 2552) รายงานวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้เป็นการศึกษาเกี่ยวกับปาด (tree frog) ซึ่งเป็นสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกกลุ่มหนึ่ง เพื่อศึกษา ค้นคว้าและนำเสนอข้อมูลเกี่ยวกับจำนวน ขนาดและรูปร่างของโครโมโซม โครโมโซมเครื่องหมาย (chromosome marker) และคาริโอไทป์ของสัตว์กลุ่มนี้ อันจะนำไปสู่การพัฒนาความรู้ทางด้านเซลล์พันธุศาสตร์ของปาดโดยละเอียดมากยิ่งขึ้น ข้อมูลพื้นฐานที่ได้มีความสำคัญและจำเป็นต่อการนำไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ในด้านการอนุรักษ์ การปรับปรุงพันธุ์ และใช้เป็นข้อมูลประกอบในการจัดจำแนกชนิด ตลอดจนช่วยในการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของสัตว์กลุ่มนี้ในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาจำนวนโครโมโซมของปาด ขนาดและรูปร่างของโครโมโซมในคาริโอไทป์ (standard karyotype) ของปาดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย

1.2.2 เพื่อศึกษาเครื่องหมายโครโมโซม (chromosome marker) ของปาดโดยใช้เทคนิคการย้อมแถบโครโมโซม คือ แบบจี (G-banding) แบบซี (C-banding) และแบบนอร์ (NOR-banding)

1.2.3 เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างคาริโอไทป์ของปาดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1.3.1 สำรวจและเก็บตัวอย่าง แบบพบเห็นตัว ด้วยตาเปล่าโดยบังเอิญ (visual encounter survey) ในช่วงเวลากลางคืน (18.00 น. เป็นต้นไป) พื้นที่ป่าต้นน้ำร่องก้อในเขตตำบลโพธิ์ใหญ่ อำเภอลำทะเมนชัย จังหวัดอุดรธานี และเก็บตัวอย่างจากพื้นที่ป่าต้นน้ำห้วยตะขบตำบลเสาชิงชัย อำเภอกันทรลักษ์ จังหวัดศรีสะเกษ ในช่วงเดือนมิถุนายนถึงเดือนกันยายน พ.ศ. 2559 และในช่วงเดือนมิถุนายนถึงเดือนกันยายน พ.ศ. 2560 โดยแต่ละพื้นที่กำหนดให้อยู่ในรัศมี 1 กิโลเมตร

1.3.2 ศึกษาเฉพาะปาดที่พบจากการสำรวจ โดยการศึกษาจำนวนโครโมโซม ขนาดและรูปร่างของโครโมโซมในคาริโอไทป์ (standard karyotype)

1.4 ประโยชน์ของงานวิจัยที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 เพื่อเพิ่มความองค์รู้เกี่ยวกับจำนวนโครโมโซม ขนาดและรูปร่างของโครโมโซมในคาริโอไทป์ (standard karyotype) ของปาดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

1.4.2 เพื่อเพิ่มความองค์รู้เกี่ยวกับเครื่องหมายโครโมโซม (chromosome marker) ของปาด โดยใช้เทคนิคการย้อมแถบโครโมโซม คือ แบบจี (G-banding) แบบซี (C-banding) และแบบนอร์ (NOR-banding)

1.4.3 ข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับโครโมโซมเครื่องหมาย (chromosome marker) ของปาดที่ได้จากวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้ จะเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ การจัดจำแนก และการอนุรักษ์พันธุ์ของสัตว์กลุ่มนี้ในอนาคต

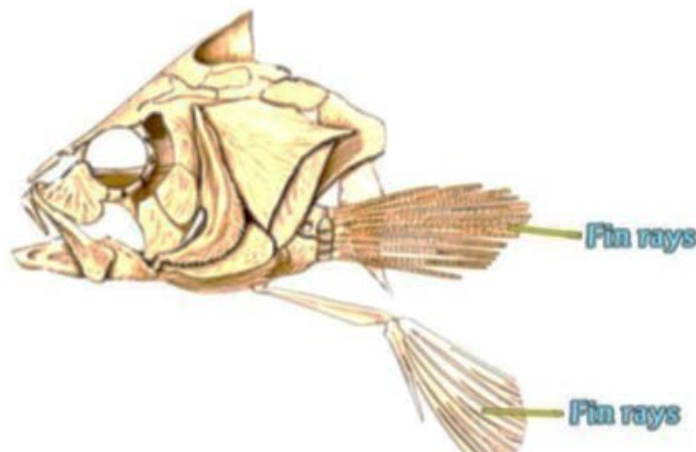
บทที่ 2

เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

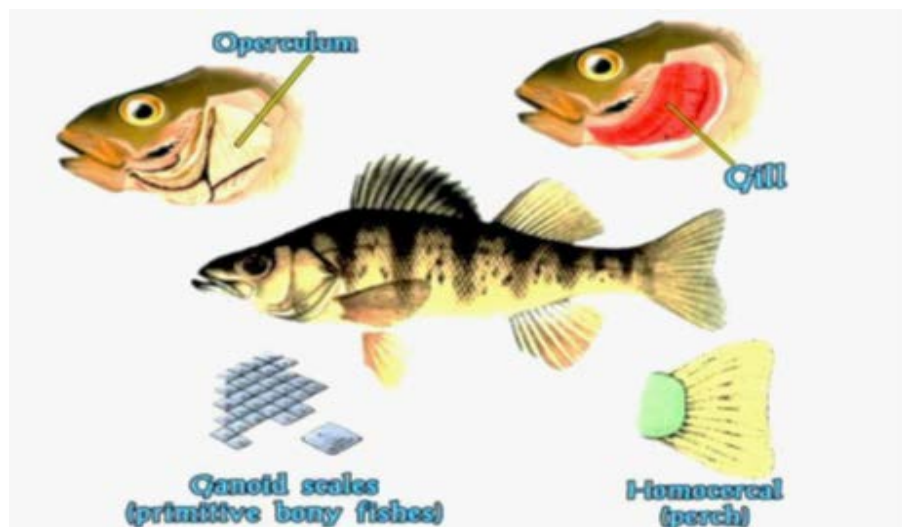
2.1 การกำเนิดและวิวัฒนาการของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก

สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกมี ต้นกำเนิดและวิวัฒนาการ จากปลาโบราณในตอนปลายของ ยุคดีโนเวียน (Devonian period) และยุคคาร์บอนิเฟอรัส (Carboniferous period) ช่วงระยะเวลา 395–299 ล้านปีที่ผ่านมา การกำเนิดและการวิวัฒนาการของ สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกและ สัตว์เลื้อยคลาน นั้นมีสัตว์หลายกลุ่ม ที่มีส่วนสัมพันธ์เกี่ยวข้อง กัน (วิระยุทธ์ เล่าหะจินดา , 2552) ซึ่งประกอบด้วย

2.1.1 Actinopterygii คือกลุ่มของปลากระดูกแข็งที่มีลักษณะเฉพาะดังนี้ ก้านครีบลักษณะเป็นเส้นรัศมี (fin ray) ดังแสดงในภาพที่ 2.1 มีครีบอกซึ่งเป็นกระดูกอ่อนหรือกระดูกแข็งมีลักษณะเป็นซี่นเล็ก ๆ หลายซี่เรียกว่าเรเดียล (radials) เช่น ครีบอก ครีบสะโพก และครีบก้น อาจมีครีบเดี่ยวอยู่ที่กลางหลัง มีกระดูกคลุมเหงือกเรียกว่าแผ่นปิดเหงือก (operculum) มีเหงือกที่พัฒนาดีใช้ในการหายใจ มีหางที่สมมาตรกัน มีเกล็ดแบบกานอยด์ (ganoid) มักพบในปลาโบราณ เช่น ปลาสเตอร์เจียน (sturgeon) สำหรับเกล็ดแบบไซคลอยด์ (cycloid) และเกล็ดแบบทีนอยด์ (tenoid) ดังแสดงในภาพที่ 2.2 พบในกลุ่มปลาปัจจุบัน เช่น กลุ่มปลาเทเรออสตีไอ (teleostei) ปากอยู่ปลายด้านหน้าและพบทั้งที่มีฟันหรือไม่มีฟัน มีกระเพาะลม (swim bladder) ดังแสดงในภาพที่ 2.3 มีหน้าที่ช่วยในการลอยตัว หัวใจมี 2 ห้อง เลือดที่ผ่านหัวใจเป็นเลือดที่มีออกซิเจนต่ำ อาศัยอยู่ทั้งในน้ำจืด น้ำเค็มและน้ำกร่อย



ภาพที่ 2.1 ครีบอกซึ่งเป็นกระดูกอ่อนหรือกระดูกแข็ง
ที่มา: nana.bio.com (2018)



ภาพที่ 2.2 กระดูกคลุมเหงือก เหงือก เกล็ดแบบ ganoid และหางที่สมมาตร
ที่มา: sysp.ac.th (2018)



ภาพที่ 2.3 กระเพาะลม (swim bladder) และ หัวใจห้อง ventricle ของปลา
ที่มา: sysp.ac.th (2018)

ตัวอย่างของปลากลุ่มนี้ เช่น ปลาตะพัด (malayan bonytonque) ปลาการ์ตูน (false clown anemone fish) ปลาผีเสื้อ (coral fish)

2.1.2 Sacropterygii คือปลาโบราณที่มีลักษณะแตกต่างจากปลาในชั้นอื่น ๆ คือ มี เกล็ดเป็นแบบ cosmoid มีลักษณะเฉพาะ คือ ครีบที่บริเวณหน้าอก วิวัฒนาการจากครีบธรรมดา ๆ มาเป็นเหมือนอวัยวะที่ใช้เคลื่อนไหวได้เหมือนการเดินในน้ำ โดยลักษณะของครีบจะเป็นพู่เนื้อหรือ เนื้อเยื่อ มีความแข็งแรงมาก โดยมีแกน กระดูก จึงเป็นเสมือนรอยต่อของการวิวัฒนาการของปลาซึ่งเป็น สัตว์น้ำอาศัยอยู่ในน้ำได้อย่างเดียว ขึ้นมาอยู่บนบกกลายเป็นสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกก่อนจะวิวัฒนาการเป็น สัตว์เลื้อยคลานและสัตว์ในชั้นอื่น ๆ ต่อไป

2.1.3 Actinistia คือปลาในสกุล *Latimeria* ที่เกิดขึ้นในสมัยพาลีโอโซอิก (Paleozoic) และปัจจุบันยังคงมีชีวิตอยู่ มีลักษณะเฉพาะดังนี้คือ มีครีบบอกและครีบสะโพกประกอบด้วยกระดูกที่มีขนาดใหญ่ขึ้นเรียกว่ากระดูกเบซอล (basals bone) และมีกล้ามเนื้อบริเวณครีบจึงเรียกว่า ปลาครีบเนื้อ หรือโลบฟินฟิช (lobe fin fish) ตัวอย่างของปลากลุ่มนี้คือปลา ซีลาแคนท์ (coelacanth) ดังภาพที่ 2.4 ซึ่งเป็นปลาโบราณที่ยังมีชีวิตในปัจจุบันอาศัยอยู่ในทะเลลึกเคยจับได้แถบแอฟริกาและอินโดนีเซีย



ภาพที่ 2.4 ปลา coelacanth

ที่มา: geol.umd.edu (2018)

2.1.4 Dipnoi คือกลุ่มปลาที่เกิดขึ้นในสมัยพาลีโอโซอิก (Paleozoic) เป็นปลาที่หายใจด้วยปอด อาศัยใต้ท้องน้ำของแหล่งน้ำจืด มีรูจมูกภายใน (internal nostrils) มีครีบหน้าสามารถเดินได้ เมื่ออากาศแห้งแล้งจะฝังตัวในโคลนสร้างเมือกล้อมรอบตัว จากการศึกษา ทางชีววิทยาโมเลกุลพบว่า Dipnoi เป็นสัตว์ที่มีวิวัฒนาการใกล้เคียงกับสัตว์สี่ขา (tetrapod) มากที่สุด ตัวอย่างของปลากลุ่มนี้ เช่น ปลาปอดแอฟริกา (african lungfish) ปลาปอดอเมริกาใต้ (south american lungfish) และ ปลาปอดออสเตรเลีย (australian lungfish; ภาพที่ 2.5) ปลากระดูกแข็งส่วนใหญ่ ที่พบในปัจจุบัน ดำรงชีวิตในน้ำ โดยอาศัยแก๊สออกซิเจนที่ละลายในน้ำ แต่มีปลากระดูกแข็ง 2 กลุ่ม คือปลาครีบเนื้อ และปลาปอดที่สามารถหายใจจากอากาศได้ในช่วงระยะเวลาสั้นๆ สัตว์กลุ่มนี้ถูกใช้เป็นหลักฐานในการสนับสนุนการเกิดวิวัฒนาการเพื่อมาดำรงชีวิตบนพื้นดิน โดย มีการพัฒนาถุงลมไปทำหน้าที่เป็นปอด และครีบบอกมีวิวัฒนาการเป็นขาหน้าในสัตว์บกนั่นเอง



ภาพที่ 2.5 ปลาปอดออสเตรเลีย

ที่มา: fishwallpapers.com (2018)

2.1.5 Tetrapoda คือกลุ่มของสัตว์สี่เท้าซึ่งเป็นบรรพบุรุษของ Lissamphibia และ Amniota รวมทั้งสายวิวัฒนาการอื่นที่แยกออกไปจากสัตว์สองกลุ่มนี้ โดยเข้าใจว่าสัตว์พวกนี้น่าจะมีต้นกำเนิดมาจากกลางยุคดีโวเนียน ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ

2.1.5.1. สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก (Amphibia) ที่ยังมีชีวิตอยู่ มีมากกว่า 5,556 ชนิด

2.1.5.2. สัตว์ที่มีถุงน้ำคร่ำ (Amniota) แบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม

1) Synapsida (รวมพวกสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม) ที่ยังมีชีวิตอยู่ มีประมาณ 4,800 ชนิด

2) Reptilia เป็นสัตว์เลื้อยคลาน ที่ยังมีชีวิตอยู่มีประมาณ 14,390 ชนิด

2.1.6 Lissamphibia คือกลุ่มของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในปัจจุบันทั้ง 3 อันดับ (Order) คือ อันดับเขียดงู (Order Gymnophiona: Apoda) อันดับซาลาแมนเดอร์ (Order Caudata: Urodela) และอันดับกบ (Order Anura)

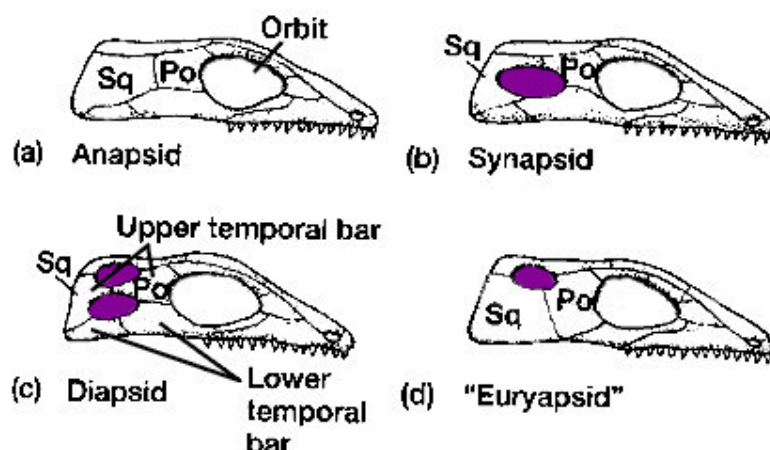
2.1.7 Amniota คือสัตว์ทั้งหมดในกลุ่มของสัตว์เลื้อยคลาน นกและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โดย การจำแนกจากลักษณะของกะโหลกศีรษะสามารถแบ่งออกได้เป็น 4 แบบ ตามลักษณะการมีช่องเปิดของกะโหลกศีรษะบริเวณกระดูกขมับที่เรียกว่า temporal fenestration (fenestra or window) ดังนี้

2.1.7.1 Anapsid skull เป็นกะโหลกที่ไม่มีช่องเปิด พบในสัตว์เลื้อยคลานในยุคแรก และในสัตว์กลุ่มเต่า ดัง แสดงในภาพที่ 2.6a

2.1.7.2 Synapsid skull เป็นกะโหลกที่มีช่องเปิด ข้างละ 1 ช่อง พบในกลุ่มสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมคล้ายสัตว์เลื้อยคลาน (mammal-like reptile) ดังแสดงในภาพที่ 2.6b

2.1.7.3 Diapsid skull เป็นกะโหลกที่มีช่องเปิดข้างละ 2 ช่อง คือ ช่องบนและช่องล่าง พบในกลุ่ม สัตว์อย่าง จระเข้ และ อาร์โคซอร์ (archosaur) ดังแสดงในภาพที่ 2.6c

2.1.7.4 Euryapsid skull เป็นกะโหลกที่มีช่องเปิดข้างละ 1 ช่อง และแตกต่างจากกะโหลกแบบ synapsid ในตำแหน่งของช่องเปิดที่เชื่อมต่อกับกระดูกของกะโหลก แต่ในความจริงแล้วกะโหลกแบบ Euryapsid เป็นเพียงการเปลี่ยนรูปของกะโหลกแบบหนึ่งของ diapsid เท่านั้น พบในกลุ่มสัตว์เลื้อยคลานทางทะเล อย่างเพลซิโอซอร์และอิกทิโอซอร์นั่นเอง ดังแสดงในภาพที่ 2.6d

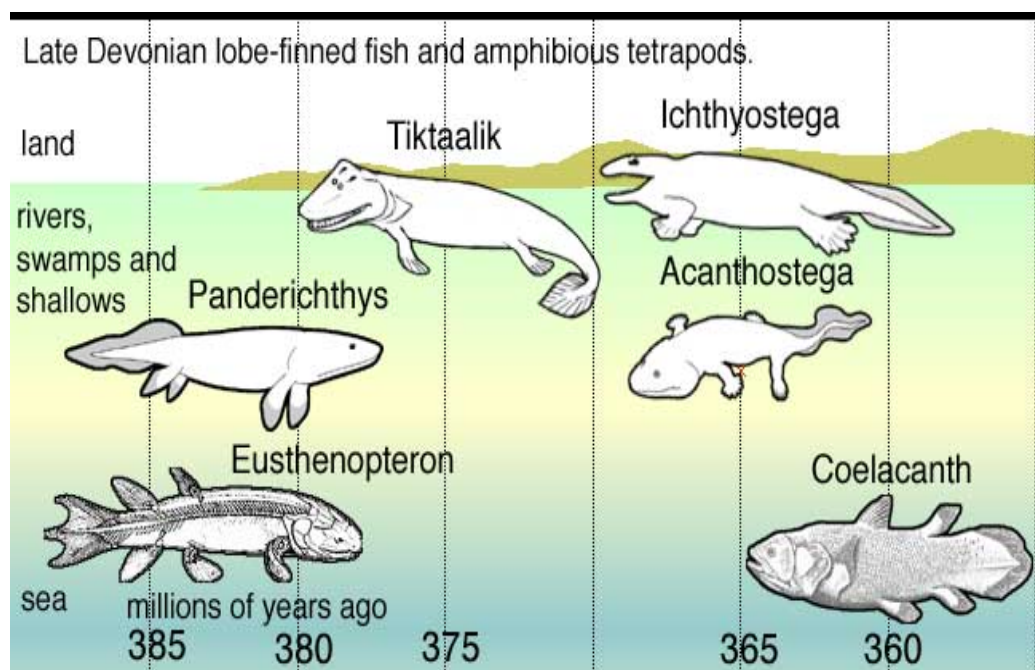


ภาพที่ 2.6 ลักษณะการมีช่องเปิดของกะโหลกศีรษะบริเวณกระดูกขมับ
ที่มา: realmagick.com (2018)

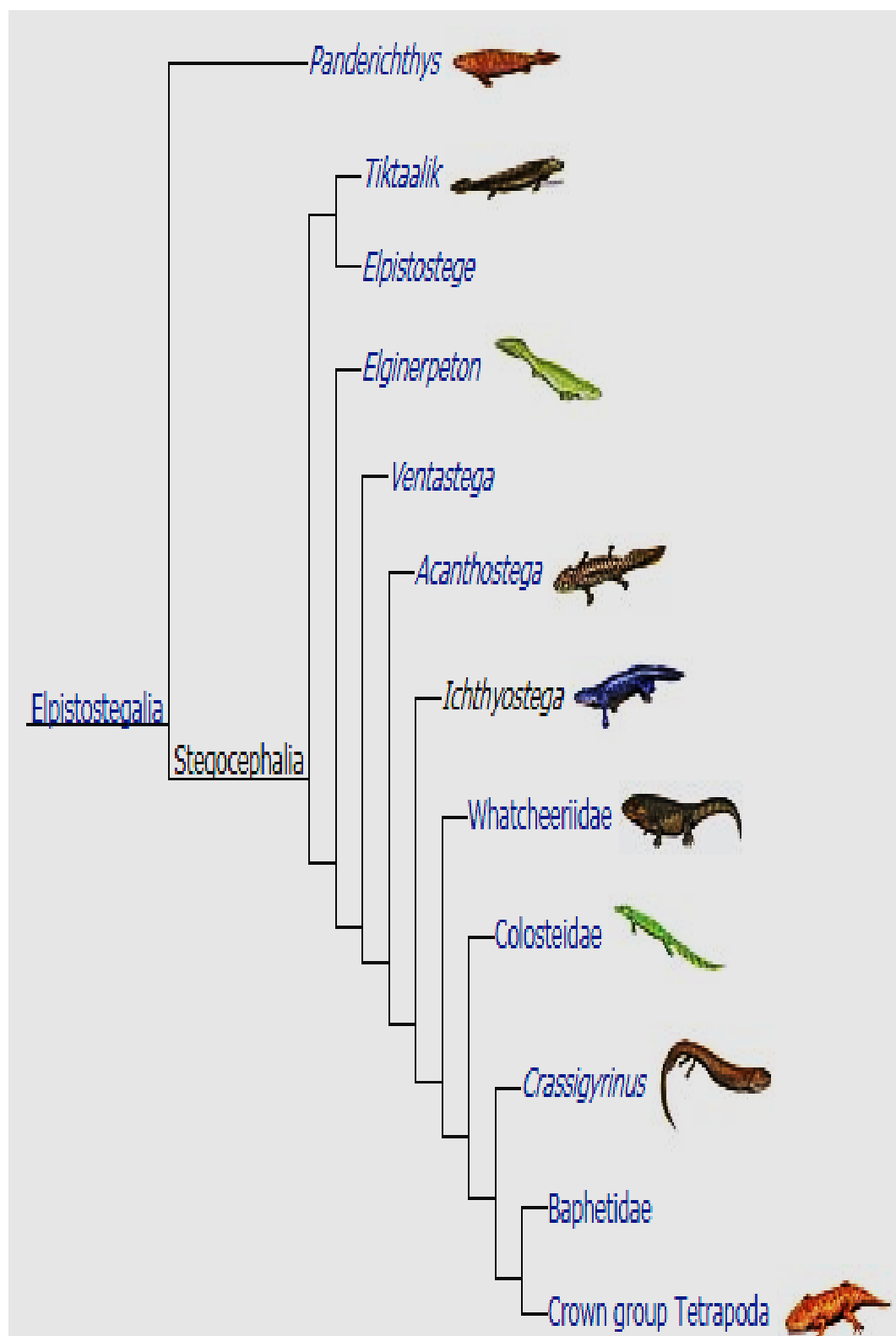
2.2 วิวัฒนาการจากปลามาเป็นสัตว์สี่ขา

การกำเนิดของสัตว์ของสัตว์สี่ขา (tetrapod) เป็นประเด็นที่มีการโต้แย้งกันมาเป็นเวลายาวนาน โดยเฉพาะความสัมพันธ์ระหว่างสัตว์สกุล *Ichthyostega* (ภาพที่ 2.7) กับสัตว์กลุ่มอื่นที่มีลักษณะรูปร่างคล้ายคลึงกับปลา เช่น ปลาปอด ปลาซีลาแคนซ์, osteolepiform, porolepiform เป็นต้น อย่างไรก็ตามปัจจุบันมีแนวคิดว่าการกำเนิดของสัตว์สี่ขามีวิวัฒนาการสายเดียว (monophyletic origin) จึงส่งผลให้การศึกษามุ่งเน้นเพื่อที่จะศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มสัตว์ที่ดำรงชีวิตอยู่ในปัจจุบันได้แก่ สัตว์สี่ขา ปลาปอด ปลาซีลาแคนซ์ กับกลุ่มสัตว์ที่ดำรงชีวิตอยู่ใน ช่างยุคพาลีโอโซอิก คือสัตว์ในกลุ่ม *Sarcopterygii* รวมทั้งการศึกษากการเปลี่ยนแปลงรูปร่างจากคล้ายคลึงกับปลาไปเป็นบรรพบุรุษของสัตว์สี่ขา ซึ่งโดยมีแนวความคิดว่าปลาในกลุ่มชาร์คอปเทอริเจียนที่ดำรงชีวิตอยู่ในสมัยพาลีโอโซอิก 3 กลุ่ม คือ osteolepiform, porolepiform และ *Stegocephalidae* มีความสัมพันธ์ที่ใกล้ชิดกับสัตว์สี่ขามากกว่าใกล้ชิดกับปลาปอดและปลาซีลาแคนซ์ (Schöech, 2009; วีระยุทธิ์ เลาหะจินดา, 2552)

การเปลี่ยนแปลงวิธีการดำรงชีวิตจากในน้ำขึ้นมายอยู่บนบกต้องมีการการเปลี่ยนแปลงที่ ลักษณะทางกายวิภาคศาสตร์และลักษณะทางสรีระวิทยาหลายประการ การเปลี่ยนแปลงที่สำคัญคือโครงสร้างของอวัยวะค้ำจุนลำตัวเพื่อการเคลื่อนที่ เพราะต้องมีการรับน้ำหนักของลำตัวได้ดีและต้องมีกล้ามเนื้อที่แข็งแรงเพื่อใช้ในการผลักดันลำตัวให้เคลื่อนไปข้างหน้า กะโหลกของแพนเดอร์ริคิคล้ายคลึงกับปลาทั่วไปคือ ขมับไม่ได้ถูกตรึงให้ติดแน่นอยู่กับกระดูกหัวไหล่ แต่สัตว์สี่ขากลุ่มแรกคือ *Ichthyostega* กับ *Acanthostega* ดังแสดงในภาพที่ 2.7 และภาพที่ 2.8 มีกะโหลกที่เคลื่อนไหวได้แบบอิสระจากกระดูกหัวไหล่ ขณะเดียวกันกระดูกเชิงกรานได้มีการเชื่อมต่อกับกระดูกสันหลังด้วยการลดรูปกระดูกซี่โครง บริเวณกระดูกขมับ และมีวิวัฒนาการของรยางค์ขาเพื่อให้เคลื่อนที่บนบกได้ อย่างไรก็ตามจากลักษณะโครงสร้างของขาสันนิษฐานว่ารยางค์ขาของ *Ichthyostega* กับ *Acanthostega* ได้มีการพัฒนาเพื่อใช้ในการเคลื่อนที่ในน้ำมากกว่าการเคลื่อนที่บนบก



ภาพที่ 2.7 การวิวัฒนาการของปลาอยู่บนบกจนกลายเป็นสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก และกลายเป็นสัตว์เลี้ยงลูกในที่สุด
ที่มา: th.wikipedia.org/wiki (2018)



ภาพที่ 2.8 ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของปลาและสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก
ที่มา: en.wikipedia.org/wiki/Ichthyostega (2018)

2.3 วิวัฒนาการของลิสแซมฟิเบียมาเป็นสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก

การศึกษาด้านการวิภาคศาสตร์และในระดับโมเลกุลบ่งชี้ว่าลิสแซมฟิเบียเป็นวิวัฒนาการสายเดี่ยวแยกออกจากสัตว์สี่ขา กลุ่ม สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก ที่ดำรงชีวิตอยู่ในปัจจุบัน เนื่องจากลักษณะจำเพาะและการศึกษาโครงสร้างหลายประการของลิสแซมฟิเบียที่ดำรงชีวิตอยู่ในปัจจุบัน โดยใช้แนวทางสรุปว่าลิสแซมฟิเบียเป็นวิวัฒนาการแบบสายเดี่ยว (วีระยุทธ เลาหะจินดา, 2552) ได้แก่

2.3.1 ฟันของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกกลุ่มปัจจุบันมีก้านยาว (pedicellate) ตัวฟันจำแนกเป็น 2 ส่วนคือส่วนฐานเป็นก้านยาวซึ่งติดอยู่กับกระดูกของขากรรไกรและส่วนปลายฟันโผล่พ้นเหงือกขึ้นมา ยอดฟันมี 2 ยอด (bicuspid) คือยอดฟันด้านใน (lingual) และยอดฟันด้านนอก (labial)

2.3.2 กระดูกที่ใช้ในการถ่ายทอดคลื่นเสียงในช่องหูชั้นกลางของลิสแซมฟิเบียมี 2 ชั้นคือกระดูกคอลิวเมลลา (columella/stapes) ที่พบในสัตว์สี่ขา กลุ่มอื่นด้วย และกระดูกโอเพอร์คิวลัม (operculum)

2.3.3 กระดูกคอลิวเมลลา (columella bone) เรียงตัวในแนวระนาบกับช่องที่เปิดเข้าหูชั้นในหรือเฉียงขึ้นไปทางด้านบนเล็กน้อย ซึ่งเป็นลักษณะที่พบในลิสแซมฟิเบียกับสัตว์กลุ่มอื่นที่ดำรงชีวิตในสมัยพาลีโอโซอิก ส่วนกระดูกคอลิวเมลลาของสทิกโกซิปาเลียน เรียงตัวเฉียงลงทางด้านล่าง

2.3.4 แพทบอดีส์ (fat bodies) ของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกกลุ่มปัจจุบันเจริญขึ้นมาระยะเอ็มบริโอจากสันเจอร์มินัล (germinal ridge) ซึ่งเป็นเนื้อเยื่อบริเวณเดียวกับอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ และมีความสัมพันธ์กับอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในสัตว์วัยเจริญพันธุ์

2.3.5 ผิวหนังลำตัวประกอบด้วยต่อมเมือกและต่อมพิช (mucous gland or granular gland) เป็นลักษณะเฉพาะของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกกลุ่มปัจจุบัน และต่อมมีลักษณะโครงสร้างพิเศษคล้าย กัน

2.3.6 เซลล์รับรู้ความรู้สึกในชั้นจอตาคือ เซลล์รีออคเซีย เป็นลักษณะจำเพาะของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในกลุ่มกบและซาลาแมนเดอร์ ส่วนเขียดงูไม่มี

2.3.7 ลิสแซมฟิเบียมีแผ่นกล้ามเนื้อบาง (levator bulbi) อยู่ในเบ้าตาเพื่อทำหน้าที่ยกตาให้สูงขึ้นหรือดึงตาให้เข้าและออกจากเบ้าตา ลักษณะนี้พบเฉพาะในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก

2.8.8 สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกกลุ่มปัจจุบันมีกลไกการแลกเปลี่ยนแก๊สค่อนข้างมีความจำเพาะเพราะใช้โครงสร้างถึง 3 ประการคือ เหงือก ปอด และผิวหนัง

2.3.9 สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกกลุ่มปัจจุบันมีกระดูกซี่โครงสั้นและไม่ล้อมรอบลำตัวและช่องอก

2.3.10 สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกกลุ่มปัจจุบันมีปุ่มออกซิพิทัล (occipital condyle) 2 ปุ่ม

2.3.11 ลิสแซมฟิเบียได้ลดรูปกระดูกกะโหลกและมีช่องเปิดบนกะโหลกคล้ายคลึงกันกับสัตว์สี่ขา ในสมัยพาลีโอโซอิก เช่น ลดรูปกระดูกซูปราเทมพอรัล (supra temporal bone) ลดรูปกระดูกอินเตอร์เทมพอรัล (inter temporal bone)

2.4 การจัดระบบอนุกรมวิธานของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก

การจัดระบบในการจัดจำแนกสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกอาศัยหลักการ (King, 1990) 2 ประการ คือ

2.4.1 ระบบในการจัดจำแนกสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก (Amphibian systematics) คือการให้คำอธิบายเกี่ยวกับสัตว์ชนิดใหม่ (taxa new) ต่อนักวิทยาศาสตร์และการศึกษาเกี่ยวกับการจัดระบบวิวัฒนาการพื้นฐานของสัตว์ต่างๆให้เกิดความเข้าใจในการจัดระบบอนุกรมวิธานของสัตว์

2.4.2 ความเข้าใจเกี่ยวกับโครโมโซม (chromosome approach) เป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่ใช้ในการจัดระบบอนุกรมวิธานของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก เพื่อวิเคราะห์ความแตกต่างของสัตว์ในระดับวงศ์ (family) และวงศ์ย่อย (subfamily)

2.5 ลักษณะของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก

ปัจจุบันสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกสามารถจำแนกได้ 3 อันดับชั้น (Order) ได้แก่ กบ เขียดและคางคก (Order Anura), ซาลาแมนเดอร์ (Order Caudata) และเขียดงู (Order Gymnophiona or Apoda) มีลักษณะทั่วไปของสัตว์เหล่านี้ คือ มีโครงสร้างร่างกายเป็นกระดูกแข็ง บางชนิดมีกระดูกซี่โครง มีรูปร่างแตกต่างกันตามแต่ละชนิดคือ ลำตัวยาว มีหัว คอ และหางชัดเจนหรือลำตัวแบนมีหลังและลำตัว ไม่มีคอ มีสี่เท้า เท้าคู่หลังมักจะมีพังผืดซึ่งระหว่างนิ้ว มีผิวหนังเรียบชื้น มีต่อมมาก อาจมีต่อมพิษหรือไม่ก็ได้ มีเซลล์เม็ดสี (chromatophore) ไม่มีเกล็ด ปากมักมีขนาดใหญ่และฟันขนาดเล็กกระจายอยู่ มีรูจมูก (nostril) 1 คู่เปิดเข้าด้านหน้าของอู่ปากหายใจด้วยปอด เหงือก และผิวหนัง หัวใจมี 3 ห้องเป็นเอเทรียม (atrium) 2 ห้อง และเวนทริเคิล (ventricle) 1 ห้อง เพศแยก มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างในระหว่างเติบโต หรือเมตามอร์โฟซิส (metamorphosis) โดยไข่มีเยื่อหุ้มวุ้น

2.6 อนุกรมวิธานและการจัดจำแนก

กบเขียดถูกจัดให้อยู่อาณาจักรสัตว์ (Kingdom) Animalia ไฟลัม (Phylum) Chordata ชั้นไฟลัม (Subphylum) Vertebrata ชั้น (Class) Amphibia ชั้นย่อย (Subclass) Lissamphibia อันดับ (Order) Anura อันดับย่อย (Suborder) Neobatrachia ซึ่งมีทั้งหมด 27 วงศ์ (family) มีรายละเอียดดังนี้

- Family Ascaphidae
- Family Leiopelmatidae
- Family Bombinatoridae
- Family Discoglossidae
- Family Megophryidae
- Family Pelobatidae
- Family Pelodytidae
- Family Rhinophrynidae

Family Pipidae
 Family Allopnyridae
 Family Brachycephalidae
 Family Bufonidae
 Family Heleophrynidae
 Family Leptodactylidae
 Family Myobatrachidae
 Family Sooglossidae
 Family Rhinodermatidae
 Family Hylidae
 Family Pseudidae
 Family Centrolenidae
 Family Microhylidae
 Family Dendrobatidae
 Family Hemisotidae
 Family Arthroleptidae
 Family Ranidae
 Family Hyperoliidae
 Family Rhachophoridae

สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกกลุ่มอูรูแรน (anuran) ที่ถูกจำแนกเป็นปาดหรือเขียดตะปาด (tree frog) มีลักษณะลำตัวค่อนข้างแบน ลำตัวมีสีเหลืองแกมน้ำตาล บางชนิดมีลายเป็นแถบตามความยาวของลำตัว และสามารถเปลี่ยนสีได้ตามสภาพแวดล้อม ส่วนหัวมีลักษณะสามเหลี่ยม ริมขอบปากบานโค้งขึ้นเล็กน้อย ทำให้มองเห็นเป็นร่องบริเวณแก้ม ส่วนตามีขนาดใหญ่ ตาอยู่ห่างกันมาก ผิวหนังทั่วลำตัวค่อนข้างบาง ส่วนขา มี 4 ขา ขาหน้าเล็กกว่าขาหลัง แต่ละขามีนิ้วยาว ด้านล่างของนิ้วมีตุ่มจับสำหรับยึดเกาะ ระหว่างนิ้วมีพังผืดช่วยให้ว่ายน้ำได้ดี มีกระดูกสันหลังหน้ากระดูกก้นกบ 8 ปล้อง กระดูกสันหลังมีเซนทรัม (centrum) เป็นแบบอย่างของโปรซีลัส (procelous) หรือเป็นแบบแอมฟิ ซีลัส (amphicelous) กระดูกหัวไหล่เป็นแบบ เฟอรัม สเตอรัล (Fermi sternal) กระดูกแอสตรากาลัส (astragalus bone) และกระดูกแคลคาเนียม (calcaneum bone) เชื่อมรวมกันเฉพาะส่วนต้นและส่วนปลาย มีชิ้นกระดูกอ่อนแทรกระหว่างกระดูกนิ้วสองชิ้นสุดท้าย กระดูกนิ้วชิ้นสุดท้ายเรียวยาวหรือเป็นรูปตัวอักษร T ในภาษาอังกฤษ ส่วนปลายของนิ้วขยายออกเป็นตุ่มคล้ายคลึงกับปาดใน วงศ์ปาดโลกใหม่ (Hylidae) แต่อย่างไรก็ตาม ก็มีบางชนิดในวงศ์นี้ที่ใช้ชีวิตอยู่ บนพื้นดิน และไม่ได้มีตุ่มที่ปลายนิ้ว ลูกอ๊อดมีโครงสร้างของมีจะงอยปาก และมีตุ่มฟัน ช่องเปิดของห้องเหงือกมีช่องเดียวอยู่ทางด้านข้างลำตัวและทางซ้ายของลำตัวมีความยาว

ลำตัวประมาณ 2-12 เซนติเมตร ส่วนใหญ่อาศัยอยู่บนต้นไม้ หลายชนิดสามารถร่อนไปมาระหว่างต้นไม้หรือจากที่สูงลงสู่ที่ต่ำได้ โดยการพยุงตัวให้ลอยอยู่ในอากาศได้จากแผ่นหนังระหว่างนิ้วตีนขนาดใหญ่มากร่วมกับการทำลำตัวให้แบนราบเพื่อให้พื้นที่ด้านอากาศมากขึ้น ซึ่งปาดสามารถจำแนกได้เป็น 4 วงศ์ (Family) คือ Hyliidae, Dendrobatidae, Hyperoliidae และ Rhacophoridae (วีระยุทธ เลาหะจินดา, 2552) ปาดในวงศ์ Rhacophoridae สามารถแบ่งย่อยได้เป็น 3 วงศ์ย่อย (Subfamily) 21 สกุล (Genus) มีทั้งหมด 476 ชนิด (species) ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

(1) Subfamily Buergerinae มีลักษณะโครงสร้างร่างกายประกอบด้วย ก้านกระดูกทางด้านหน้าของกระดูกฮัยอยด์ (hyoid) มีเฉพาะชิ้นตรงกลาง และกระดูกสฟิเนธมอยด์ (sphenethmoid) เป็นชิ้นเดียว ส่วนใหญ่อาศัยอยู่ตามพื้นดินและตามลำห้วยบนภูเขา แพร่กระจายจากเกาะฟอร์โมซาไปถึง หมู่เกาะริวกิวในประเทศญี่ปุ่น ซึ่งมีเพียง 1 สกุล (Genus) คือ *Buergeria*

(2) Subfamily Mantellinae มีลักษณะโครงสร้างร่างกายประกอบด้วย ก้านกระดูกทางด้านหน้าของกระดูกฮัยอยด์ (hyoid) มี 2 ชิ้น และกระดูกสฟิเนธมอยด์ (sphenethmoid) เป็นชิ้นเดียว อาศัยอยู่ตามพื้นดินและบนต้นไม้ในพื้นที่ค่อนข้างแห้งแล้งจนถึงพื้นที่ป่าชุ่มน้ำ ส่วนใหญ่มีสีสดใสที่ผิวหนังของลำตัวกลมกลืนไปกับสีของสภาพแวดล้อมและส่วนมากมีสีน้ำตาลหรือสีเขียว แต่บางสกุลมีสีสดใสและมีผิวหนังผลิตสารพิษ มีทั้งหมด 9 สกุล คือ *Blommersia*, *Boehmantis*, *Wakea*, *Gephyromantis*, *Guibemantis*, *Spinomantis*, *Mantella*, *Mantidactylus* และ *Tsingymantis*

(3) Subfamily Rhacophorinae มีลักษณะโครงสร้างร่างกายประกอบด้วย กระดูกฮัยอยด์ (hyoid) ที่ไม่มีก้านกระดูกทางด้านหน้า และกระดูกสฟิเนธมอยด์ (sphenethmoid) เป็นชิ้นคู่ ส่วนใหญ่อาศัยอยู่บนต้นไม้ในพื้นที่ค่อนข้างแห้งจนถึงพื้นที่ป่าชุ่มน้ำ มีทั้งหมด 11 สกุล คือ *Feihyla*, *Rhacophorus*, *Polypedates*, *Gracixalus*, *Philautus*, *Raorchestes*, *Kurixalus*, *Chiromantis*, *Theloderma*, *Nyctixalus* และ *Boophis*

2.7 ปาดที่พบในประเทศไทย

ในประเทศไทยพบปาด Subfamily Rhacophorinae มี 9 สกุล (Genus) 35 ชนิด (species) มีรายละเอียดดังนี้ *Rhacophorus* มี 14 species, *Polypedates* มี 4 ชนิด, *Gracixalus* มี 1 ชนิด, *Philautus* มี 2 ชนิด, *Raorchestes* มี 1 ชนิด, *Kurixalus* มี 3 ชนิด, *Chiromantis* มี 4 ชนิด, *Theloderma* มี 5 ชนิด และ *Nyctixalus* มี 1 ชนิด ดังแสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ปาดที่พบในประเทศไทย

ลำดับที่	ชื่อไทย	ชื่อสามัญ	ชื่อวิทยาศาสตร์	สถานที่พบ
1	ปาดเหนือ	Northern Tree Frog	<i>Polypedates mutus</i> (Smith, 1940)	ภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
2	ปาดขาลาย	Robinson's Tree Frog	<i>Rhacophorus robinsonii</i> (Boulenger, 1903)	ปัตตานี (บุกิตเบซาร์)
3	ปาดเขียวคิโ	Phongsaly Tree Frog	<i>Rhacophorus kio</i> (Ohler and Delorme, 2006)	เชียงใหม่ (ขส.เชียงดาว) อุทัยธานี (ขส.ห้วยขาแข้ง)
4	ปาดเขียวตีนดำ	Wallace's Tree Frog	<i>Rhacophorus nigropalmatus</i> (Boulenger, 1895)	ระนอง (กะเปอร์) ปัตตานี (โคกโพธิ์) ยะลา (บันนังสตา) นราธิวาส (แว้ง)
5	ปาดเขียวตีนแดง	Jade Tree frog	<i>Rhacophorus prominans</i> (Smith, 1924)	นราธิวาส (แว้ง) ยะลา (บันนังสตา)
6	ปาดเขียวตีนลาย	Norhayati's Gliding frog	<i>Rhacophorus norhayatii</i> (Onn and Grismer, 2010)	กระบี่ (ขส.เขาพระ-ปางคราม) นราธิวาส (แว้ง)
7	ปาดเขียวหัวสั้น	Dulit Flying Frog	<i>Rhacophorus dulitensis</i> (Boulenger, 1892)	สุราษฎร์ธานี (ขส.คลองแสง)
8	ปาดแคระขาเรียวยาว	Slender-legged Bush Frog	<i>Gracixalus gracilipes</i> (Bourret, 1937)	เชียงใหม่ (ดอนอินทนนท์)
9	ปาดแคระท้องลาย	Vermiculated Bush Frog	<i>Philautus vermiculatus</i> (Boulenger, 1900)	นราธิวาส (แว้ง)
10	ปาดแคระท้องเหลือง	Brown Bush Frog	<i>Philautus petersi</i> (Boulenger, 1900)	นราธิวาส (แว้ง)
11	ปาดแคระป่า	Dwarf Bush Frog	<i>Raorchestes parvulus</i> (Boulenger, 1893)	แม่ฮ่องสอน (ปางตอง) เชียงใหม่ (ดอยเชียงดาว ดอยอินทนนท์ ดอยผ้าห่มปก ดอยสุเทพ-ปุย) พะเยา (ดอยผาช้าง) เลย (ภูกระดึง ภูหลวง) จันทบุรี (เขาสอยดาว เขาสระบาป) ตาก (ทุ่งใหญ่) อุทัยธานี (ห้วยขาแข้ง) เพชรบุรี (แก่งกระจาน) นครศรีธรรมราช (เขาหลวง)
12	ปาดแคระหลังขีด	Burmese Bush Frog	<i>Kurixalus carinensis</i> (Boulenger, 1893)	เชียงใหม่ (ดอยเชียงดาว ดอยอินทนนท์)
13	ปาดจาร์จันต์	Jarujin's Treefrog	<i>Rhacophorus jarujini</i> (Matsui and Panha, 2006)	กาฬสินธุ์ (ขส.ภูสีฐาน) อำนาจเจริญ (เมือง) อุบลราชธานี (อช.ภูจอง-นายอย นาจะหลวย) ร้อยเอ็ด (ขส. ภูพาน้ำทิพย์)

ตารางที่ 2.1 ปาดที่พบในประเทศไทย (ต่อ)

ลำดับที่	ชื่อไทย	ชื่อสามัญ	ชื่อวิทยาศาสตร์	สถานที่พบ
14	ปาดจิ้วพม่า	Burmese Bush Frog	<i>Chiromantis vittatus</i> (Boulenger, 1887)	อุทัยธานี (บ้านไร่) กาญจนบุรี (สังขละบุรี) พระนครศรีอยุธยา
15	ปาดจิ้วลายแต้ม	Nongkhor Bush Frog	<i>Chiromantis nongkhorensis</i> (Cochran, 1927)	นครราชสีมา (สะแกราช) สระแก้ว (ปางสีดา) ฉะเชิงเทรา (เขาอ่างสลิ่งไฉน) จันทบุรี (เขาสระบาป) ชลบุรี (ศรีราชา)
16	ปาดจิ้วศรีราชา	Eastern Bush Frog	<i>Chiromantis hansenae</i> (Cochran, 1827)	เชียงใหม่ (แก่งปันเต้า หนองผึ่ง) เลย (ภูกระดัง ภูหลวง), ชลบุรี (ศรีราชา)นครราชสีมา (สะแกราช)
17	ปาดจิ้วหลังขีด	Doria's Bush Frog	<i>Chiromantis doriae</i> (Boulenger, 1893)	เชียงใหม่ (ดอยเชียงดาว ดอยอินทนนท์ ดอยสุเทพ-ปุย) เลย (ภูกระดัง ภูหลวง) ชัยภูมิ (ภูเขียว) อุทัยธานี (บ้านไร่) กาญจนบุรี (สังขละบุรี ห้วยใหญ่)
18	ปาดจุดฟ้า	Blue-spotted Tree Frog	<i>Rhacophorus cyanopunctatus</i> (Manthey and Steiof, 1998)	สุราษฎร์ธานี (เขาสก) สตูล นครศรีธรรมราช (เขาหลวง) สงขลา (ไถนงาช้าง) นราธิวาส (แว้ง)
19	ปาดดอยอินทนนท์	Fea's Tree Frog	<i>Rhacophorus feae</i> (Boulenger, 1893)	แม่ฮ่องสอน (น้ำตกผาเสื่อ) เชียงใหม่ (ดอยอินทนนท์) เลย (ภูหลวง)
20	ปาดตะปุ่มจันทบุรี	Chantaburi Warted Tree frog	<i>Theloderma stellatum</i> (Taylor, 1962)	แพร่ (แม่ยม) นครราชสีมา (สะแกราช) ฉะเชิงเทรา (เขาอ่างสลิ่งไฉน) จันทบุรี (เขาคิชฌกูฏ เขาสระบาป) ตราด
21	ปาดตะปุ่มผิวเรียบ	Smooth-Skinned Warted Tree Frog	<i>Theloderma licin</i> (McLeod and Ahmad, 2007)	น้ำตกกรุงชิง อ.เขาหลวง จ. นครศรีธรรมราช
22	ปาดตะปุ่มมลายู	Malayan Warted Tree frog	<i>Theloderma horridum</i> (Boulenger, 1903)	นครศรีธรรมราช (เขาหลวง) ปัตตานี (โคกโพธิ์) นราธิวาส (แว้ง)
23	ปาดตะปุ่มใหญ่	Large Warted Tree Frog	<i>Theloderma gordoni</i> (Taylor, 1962)	เชียงใหม่ (ดอยสุเทพ-ปุย) เลย (ภูหลวง)
24	ปาดตีนแดง	Harlequin Tree Frog	<i>Rhacophorus pardalis</i> (Gunther, 1858)	นราธิวาส (แว้ง)
25	ปาดตีนแดงอีสาน	Red-webbed Treefrog	<i>Rhacophorus rhodopus</i> (Liu & Hu, 1960)	ภาคเหนือ

ตารางที่ 2.1 ปาดที่พบในประเทศไทย (ต่อ)

ลำดับที่	ชื่อไทย	ชื่อสามัญ	ชื่อวิทยาศาสตร์	สถานที่พบ
26	ปาดตะปุ่ม เล็ก	Pied Warted Tree Frog	<i>Theloderma asperum</i> (Boulenger, 1886)	แม่ฮ่องสอน (ปางอุ๋ง) เชียงใหม่ (ดอยเชียงดาว ดอยอินทนนท์), เลย (ภูหลวง) ตาก (ทุ่งใหญ่) อุทัยธานี (ห้วยขาแข้ง) ราชบุรี (แม่น้ำเพชร) กาญจนบุรี (ศรี นครินทร์) สระแก้ว (ปางสีดา) จันทบุรี (เขาคิชฌกูฏ เขาสระบาป)
27	ปาดตีน เหลือง	Twin-spotted Tree Frog	<i>Rhacophorus</i> <i>bipunctatus</i> (Ahl, 1927)	เชียงใหม่ (ดอยเชียงดาว ดอยอินทนนท์ ดอยสุเทพ-ปุย ดอยผ้าห่มปก แก่งป็นเต้า) เลย (ภูหลวง) สกลนคร (ภูพาน) กาฬสินธุ์ (ภูสีฐาน) นครราชสีมา (สระแกรราช) กำแพงเพชร (คลอง ลาน) เพชรบุรี (แก่งกระเจาน) กาญจนบุรี (ทุ่งใหญ่) นครศรีธรรมราช (เขาหลวง)
28	ปาดนิ้วแยก มลายู	Collett's Tree Frog	<i>Polypedates colletti</i> (Boulenger, 1890)	ยะลา (บันนังสตา) นราธิวาส (สุโงโลก)
29	ปาดบ้าน	Four-lined Tree Frog	<i>Polypedates</i> <i>leucomystax</i> (Gravenhorst, 1829)	ทั่วประเทศ
30	ปาดป่าจุด ขาว	Cinnamon Tree Frog	<i>Nyctixalus pictus</i> (Peters, 1871)	สุราษฎร์ธานี (เขาสก คลองแสง) พังงา (เขาหลัก-ลำรู่) ยะลา (บางลา, เบตง) ระนอง (เมือง) ราชบุรี (เขากระโจม) นครศรีธรรมราช (เขาหลวง) สงขลา (โตนงาช้าง)
31	ปาดภู กระดิ่ง	Taylor's Tree Frog	<i>Kurixalus bisacculus</i> (Taylor, 1962)	เพชรบูรณ์ (น้ำหนาว) เลย (ภูกระดิ่ง ภูหลวง) หนองคาย (ภูว้าว) นครราชสีมา (สระแกรราช, เขาใหญ่) ฉะเชิงเทรา (เขาอ่างลิ้น โน) จันทบุรี (เขาสระบาป)
32	ปาดยักษ์	Giant Tree Frog	<i>Rhacophorus maximus</i> (Gunther, 1858)	กาญจนบุรี (ทองผาภูมิ) ราชบุรี (ตะโกปิตทอง ขส.แม่น้ำภาชี) เพชรบุรี (แก่งกระเจาน)
33	ปาดลาย เลอะใต้	Frilled Tree Frog	<i>Rhacophorus</i> <i>appendiculatus</i> (Gunther, 1858)	นครศรีธรรมราช (เขาหลวง) นราธิวาส (แว้ง)

ตารางที่ 2.1 ปาดที่พบในประเทศไทย (ต่อ)

ลำดับที่	ชื่อไทย	ชื่อสามัญ	ชื่อวิทยาศาสตร์	สถานที่พบ
33	ปาดลาย เลอะใต้	Frilled Tree Frog	<i>Rhacophorus appendiculatus</i> (Gunther, 1858)	นครศรีธรรมราช (เขาหลวง) นราธิวาส (แว้ง)
34	ปาดหูดำ	Dark-eared Tree Frog	<i>Polypedates macrotis</i> (Boulenger, 1891)	นครศรีธรรมราช (เขาหลวง) ยะลา (บันนังสตา) นราธิวาส (แว้ง)
35	ปาดลาย เลอะเหนือ	Boulenger' frilled tree frog	<i>Kurixalus verrucosus</i> (Boulenger, 1893)	ภาคเหนือและภาค ตะวันออกเฉียงเหนือ

ที่มา: IUCN (2011); Nabhitahata and Chan-ard (2005)

ปาดที่พบในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยมีจำนวน 11 ชนิด (species) ดังนี้ ปาดเหนือ (*Polypedates mutus*, Smith; 1940), ปาดกระป๋อง (*Raorchestes parvulus*, Boulenger; 1893), ปาดจารุจินต์ (*Rhacophorus jarujini*, Matsui and Panha; 2006), ปาดจิ๋วศรีราชา (*Chiromantis hansenae*, Cochran; 1827), ปาดดอยอินทนนท์ (*Rhacophorus feae*, Boulenger; 1893), ปาดตะปุมเล็ก (*Theloderma asperum*, Boulenger; 1886), ปาดตะปุมใหญ่ (*Theloderma gordonii*, Taylor; 1962), ปาดตีนเหลือง (*Rhacophorus bipunctatus*, Ahl; 1927), ปาดบ้าน (*Polypedates leucomystax*, Gravenhorst; 1829), ปาดภูกระดึง (*Kurixalus bisacculus*, Taylor; 1962) และปาดลายเลอะเหนือ *Kurixalus verrucosus* (Boulenger, 1893)

2.8 การศึกษาเซลล์พันธุศาสตร์ของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก

การศึกษาเซลล์พันธุศาสตร์ (cytogenetics) เป็นการศึกษาโครโมโซม (chromosome) ซึ่งเป็นโครงสร้างที่สำคัญในการถ่ายทอดพันธุกรรมของเซลล์ การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโครโมโซมย่อมมีผลโดยตรงต่อการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรม ทำให้เกิดการแสดงออกในสิ่งมีชีวิตในรูปแบบที่จำเพาะตัว และแตกต่างกัน ซึ่งมีผลต่อการเจริญพัฒนาและวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต ดังนั้นการศึกษาเกี่ยวกับพันธุศาสตร์ของเซลล์จะทำให้ทราบถึงความแตกต่าง ของความผันแปรทางพันธุกรรมในระดับโครโมโซมของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด ตลอดจนทราบถึงความสัมพันธ์ของสายวิวัฒนาการ อีกทั้งยังสามารถประยุกต์ใช้ในการศึกษาด้านอื่น ๆ เช่น การปรับปรุงพันธุ์การจัดจำแนกชนิด การบริหารจัดการและอนุรักษ์ความหลากหลายทางพันธุกรรม เพื่อก่อให้เกิดความมั่นคงของพื้นฐานความหลากหลายทางชีวภาพ และนำไปสู่การใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืนจากต้นทุนความหลากหลายทางชีวภาพในที่สุด

การศึกษาโครโมโซมเพื่อตรวจหาจำนวน และรูปร่างของโครโมโซมมีหลากหลายวิธีแต่ละวิธีจะเลือกเซลล์ระยะเมทาเฟส (metaphase) ที่ดีที่สุดเพราะเป็นระยะที่มีโครโมโซมหดสั้นมากที่สุดเห็นลักษณะโครโมโซมได้ชัดเจน การเก็บเกี่ยวเซลล์ในระยะเมทาเฟสโดยการใช้สารโคลชิซิน (colchicine) ซึ่งเป็นสารสกัดจากพืชสกุล *Colchicum* มาใช้เพื่อยับยั้งการสร้างสายใยสปินเดิล (spindle fiber) ทำให้เซลล์ที่มีการแบ่งตัวไม่สามารถเข้าสู่ระยะแอนาเฟส (anaphase) วิธีการเตรียมโครโมโซมแบ่งได้เป็น 2 วิธีคือ วิธีโดยตรง (direct chromosome preparation) เป็นวิธีที่เลือกเอาเซลล์ในร่างกายที่กำลังมีการแบ่งตัวมาศึกษาโครโมโซม เป็นเซลล์ที่สมบูรณ์และยังมีการแบ่งตัวอยู่ตลอดเวลา เช่น เซลล์เม็ดเลือดจากไขกระดูก (bone marrow) อีกวิธีคือ วิธีโดยอ้อม (indirect chromosome preparation) จะเลือกเซลล์ในร่างกายชนิดที่สามารถนำมาเพาะเลี้ยงในอาหาร เลี้ยงเซลล์ภายนอกร่างกาย (*in vitro*) เพื่อให้เซลล์มีการแบ่งตัวใหม่ (Green and Sessions, 1991; Walter, 1972)

2.9 เครื่องหมายบนแท่งโครโมโซม

การศึกษาไฟโลเจเนติก (phylogenetic) และการจัดระบบบนรูปร่างโครโมโซมยังมีข้อจำกัดอยู่ซึ่งเกิดคำถามเฉพาะเกี่ยวกับความเข้าใจ ในบรรทัดฐาน และรูปแบบที่เกิดขึ้นบนโครโมโซมหรือความแปรปรวนบนแท่งโครโมโซม ดังนั้นความต้องการที่จะอธิบายเกี่ยวกับความซับซ้อนของโครโมโซม จึงต้องใช้รายละเอียดดังนี้ (King, 1990)

- 2.9.1 จำนวนโครโมโซม
- 2.9.2 รูปร่างของโครโมโซม คือเพื่อที่จะศึกษา centromere position และ arm ratio
- 2.9.3 โครโมโซมเครื่องหมาย (chromosome marker)
- 2.9.4 โครงสร้างที่ปรากฏโครโมโซมเครื่องหมาย
- 2.9.5 การวิเคราะห์ย้อมแบบจี (G-banding) และย้อมแบบอาร์ (R-banding)
- 2.9.6 การศึกษา lamp brush chromosome และ chromosome mapping
- 2.9.7 รูปแบบการเรียงตัวและความแตกต่างของ heterochromatin
- 2.9.8 ตำแหน่งที่มีเบส AT หรือ GC rich บน chromatin
- 2.9.9 การศึกษา DNA sequence โดยใช้ in-situ hybridization
- 2.9.10 การศึกษา DNA fragments

จากการจัดระบบรูปร่างโครโมโซม บรรทัดฐานและรูปแบบที่เกิดขึ้นบนโครโมโซมหรือความแปรปรวนบนแท่งโครโมโซมจากหลักการข้างต้นนี้ โดยอาศัยลักษณะต่างที่แสดงออกบนจีโนม โดยการใช้เทคนิคพื้นฐาน เพื่อที่จะอธิบายคำถามต่าง ๆ เกี่ยวกับความสัมพันธ์ในเชิงวิวัฒนาการของความแตกต่างในระดับ taxa โดยใช้ลักษณะโครงสร้างต่าง ๆ ที่ปรากฏบนโครโมโซม และวิวัฒนาการพื้นฐานที่แสดงออกเฉพาะของสัตว์แต่ละกลุ่ม

2.10 การย้อมแถบโครโมโซมและการศึกษาโครงสร้าง

ในภาวะปกติเมื่อมองผ่านกล้องจุลทรรศน์จะเห็นโครโมโซมมีลักษณะคล้ายเส้นด้ายบาง ๆ เรียกว่า โครมาติน (chromatin) ขดตัวอยู่ในนิวเคลียส เมื่อเซลล์เริ่มแบ่งตัว เส้นโครมาตินจะหดตัวสั้นเข้ามีลักษณะเป็นแท่ง จึงเรียกว่าโครโมโซม แต่ละโครโมโซมประกอบด้วยแขนสองข้างที่เรียกว่าโครมาทิด (chromatid) ซึ่งแขนทั้งสองข้างจะมีจุดเชื่อมกัน เรียกว่า เซนโทรเมียร์ (centromere) โครโมโซมเป็นโครงสร้างที่อยู่ภายในนิวเคลียสของเซลล์ ในขณะที่เซลล์ไม่แบ่งตัว โครโมโซมจะยืดยาวออกคล้ายเส้นใยเล็ก ๆ สานกันอยู่ภายในนิวเคลียส เมื่อมีการแบ่งเซลล์จะมีการแบ่งโครโมโซม โดยโครโมโซมจะจำลองตัวเองขึ้นมา เป็นเส้นคู่ที่เหมือนกัน ทุกประการ แล้วค่อย ๆ ขดตัวสั้นเข้า จนโครโมโซมจะเห็นได้ชัดเจนที่สุดและการศึกษาโครโมโซมจึงต้องศึกษาในระยะ เมตาเฟส ถ้ามีเทคนิคในการเตรียม โครโมโซม ที่ดี ก็จะสามารถมองเห็นรูปร่างลักษณะของโครโมโซม ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และอาจนับจำนวนโครโมโซมได้ (Suarez et al., 2013; Dehling, 2011; Gvozdk et al., 2010)

โครโมโซม เป็นโครงสร้างที่อยู่ ภายในนิวเคลียสของเซลล์ ในขณะที่ เซลล์ไม่แบ่งตัวหรืออยู่ในระยะอินเตอร์เฟส (interphase) เราจะไม่เห็นโครโมโซมเนื่องจากโครโมโซมอยู่ในลักษณะเป็นเส้นใยเล็ก ๆ สานกัน ไปมาอยู่ภายในนิวเคลียส เส้นใยนี้เรียกว่า โครมาติน (chromatin) แต่เมื่อเซลล์จะแบ่งตัวโครมาตินแต่ละเส้นจะแบ่งจาก 1 เป็น 2 เส้น แล้วขดตัวสั้นเข้า และหนาขึ้นจนมองเห็นเป็นแท่งในระยะโปรเฟส และเมตาเฟส เรียกชื่อใหม่ว่า โครโมโซม ทำให้เรามองเห็นรูปร่างลักษณะและจำนวนโครโมโซมได้ โครโมโซมที่เห็นได้ชัดในระยะเมตาเฟส ประกอบด้วย โครมาทิด 2 อัน ยึดติดกันตรงเซนโทรเมียร์ ส่วนของโครโมโซมที่ยื่นออกไปจากเซนโทรเมียร์ เรียกว่า แขน ข้างที่สั้นเรียกว่าแขนสั้น ข้างที่ยาวเรียกว่าแขนยาว ดังนั้นการศึกษาโครโมโซมจึงมักที่จะใช้ระยะนี้ โครโมโซมแต่ละแท่งจะมีรอยคอดตำแหน่งที่ 1 (primary constriction) แต่ในโครโมโซมบางแท่งอาจพบโครโมโซมเครื่องหมาย (chromosome marker) เช่น รอยคอดตำแหน่งที่ 2 (secondary constriction) หรือ โครงสร้างที่เป็นติ่งส่วนเล็กๆ (satellite) ยื่นออกจากโครโมโซมที่ต่อจากตำแหน่ง secondary constriction ตำแหน่ง nucleolar organizer region (NOR) ทำหน้าที่ในการสร้าง ribosomal RNA และ nucleolus โดยทั่วไปมักเป็นตำแหน่งเดียวกันกับตำแหน่ง secondary constriction ซึ่งอาจพบได้มากกว่า 1 คู่ แต่ละโครโมโซมประกอบด้วย 2 โครมาทิด ที่เหมือนกัน ซึ่งเกิดจากการที่โครโมโซมจำลองตัวเองในระยะอินเตอร์เฟส (Interphase) เพื่อจะแยกออกจากกันในระยะแอนาเฟส (anaphase) ของการแบ่งเซลล์ โครมาทิดทั้งสอง จะติดกันอยู่ตรงส่วนที่เรียกว่า เซนโทรเมียร์ (centromere) โครโมโซม ของเซลล์ร่างกายจะอยู่กันเป็นคู่ ๆ แต่ละคู่เรียกว่า โฮโมโลกัสโครโมโซม (homologous chromosome)

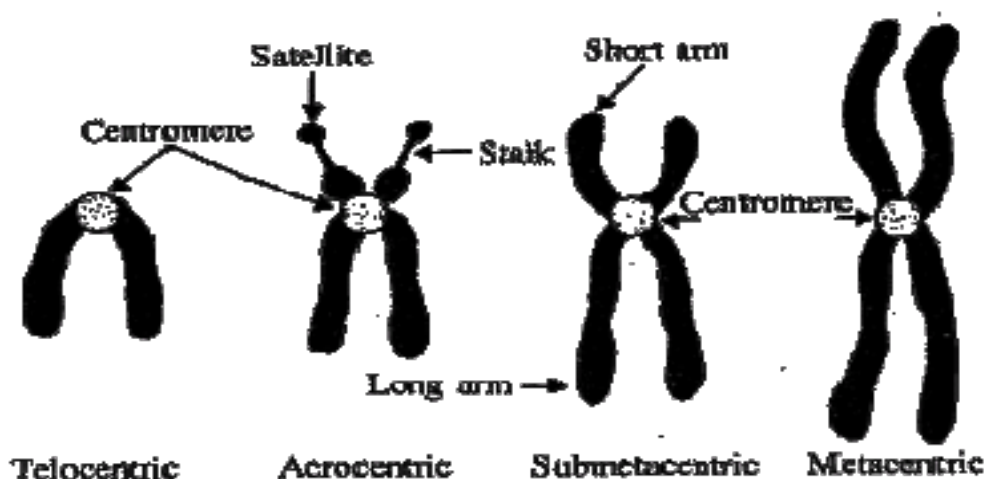
การนำโครโมโซมขนาดต่าง ๆ มาจัดเรียงจากคาร์ิโอไทป์ขนาดใหญ่ไปหาขนาดเล็กและจัดเรียงรูปร่างโครโมโซมจากรูปร่างเมตาเซนตริกไปจนถึงเทโลเซนตริกเรียกว่า คาร์ิโอไทป์ (karyotype) โดยจำแนกตามลักษณะ ขนาด และตำแหน่งของเซนโทรเมียร์อาจจะอยู่ตรงกลาง ค่อนไปทางปลาย หรือปลายสุดของโครโมโซม จึงแบ่งลักษณะโครโมโซมเป็นแบบต่าง ๆ ได้ดังนี้ (ภาพที่ 2.9)

(1) เมตาเซนตริก (metacentric) เป็นโครโมโซมที่มีแขนยื่น 2 ข้างออกจากเซนโทรเมียร์เท่ากันหรือเกือบเท่ากัน

(2) ซับเมตาเซนตริก (submetacentric) เป็นโครโมโซมที่มีแขนยื่นออกมา 2 ข้างจากเซนโทรเมียร์ไม่เท่ากัน

(3) อะโครเซนตริก (acrocentric) เป็นโครโมโซมที่มีลักษณะเป็นแท่ง โดยมีเซนโทรเมียร์อยู่ใกล้กับปลายข้างใดข้างหนึ่ง จึงเห็นส่วนเล็ก ๆ ยื่นออกจากเซนโทรเมียร์

(4) เทโลเซนตริก (telocentric) เป็นโครโมโซมที่มีลักษณะเป็นแท่ง โดยมีเซนโทรเมียร์อยู่ตอนปลายสุดของโครโมโซม



ภาพที่ 2.9 รูปร่างของโครโมโซมแบบต่าง ๆ

ที่มา: sites.google.com (2018)

2.11 การย้อมแถบโครโมโซมแบบจี (G-banding)

เป็นเทคนิคที่นิยมใช้กันมากที่สุด เพราะเป็นเทคนิคที่ทำได้ง่าย และวัสดุที่ใช้ย้อมไม่สิ้นเปลือง เทคนิคนี้เหนี่ยวนำให้เกิดแถบโดยใช้สารเคมีหรือเอนไซม์ที่สามารถย่อยโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของโครโมโซม ซึ่งก่อนย้อมสไลด์ต้องเติมเอนไซม์ช่วยย่อยโปรตีน เช่น เอนไซม์ทริปซิน หรือทำการบ่มแผ่นสไลด์ใน saline-citrate ที่ร้อน แถบที่ได้มี 2 แบบ คือ แถบมืด (dark bands) และแถบสว่าง (light bands) หรือแถบสีเข้มสลับกับจางบนแท่งโครโมโซมกลไกการติดสีอาศัย คุณสมบัติของความแตกต่างกันขององค์ประกอบของโปรตีนที่อยู่ บน แท่ง โครโมโซม บริเวณที่ติดสีได้ดีในส่วนของเฮเทอโรโครมาทินซึ่งมีโปรตีน ที่มีกรดอะมิโนไลซีน (lysine) และอาร์จินีน (arginine) อยู่อย่าง

หนาแน่น สายดีเอ็นเอจะพันกันแน่น เอนไซม์ทริปซินจึงเข้าไปย่อยโปรตีนได้ น้อยบริเวณนี้จึงติดสีเข้ม ทำให้เกิดแถบสีมืด ส่วนที่เป็นยูโครมาทินในแท่งโครโมโซมจะไม่ค่อยติดสีเพราะสายดีเอ็นเออยู่อย่างหลวม ๆ เอนไซม์ทริปซินจึงเข้าไปย่อยโปรตีนได้ มากบริเวณนี้จึงติดสีจาง โดยทั่วไปแผ่นสไลด์ที่จะนำมาย้อมแบบจีควริงไว้ สัก 3-5 วัน ที่อุณหภูมิห้อง หรืออบบน hot plate ที่อุณหภูมิ 56-60 °C นาน 16-18 ชั่วโมง หลังจากหยดตะกอนเซลล์บนแผ่นสไลด์ สไลด์ที่หยดตะกอนเซลล์ไว้นานต้องใช้ เอนไซม์ทริปซินที่เข้มข้นกว่าหรือใช้เวลาในการย้อมนานกว่า เพื่อที่จะให้ได้แถบโครโมโซมที่ชัดเจน ซึ่งในปฏิกิริยานี้เอนไซม์ทริปซินจะไปสลาย (hydrolyzes) สายโพลีเปปไทด์ (polypeptide) บริเวณที่มีด้านคาร์บอกซิลของกรดอะมิโนอาร์จินีนและไลซีน

2.12 การย้อมแถบโครโมโซมแบบซี (C-banding or constitutive heterochromatin banding or centromeric banding)

เป็นเทคนิคที่ทำให้ติดสีเข้มบริเวณ constitutive heterochromatin ซึ่งเป็นบริเวณที่โครโมโซมขดตัวกันแน่น และเป็นตำแหน่งของดีเอ็นเอที่มีการเรียงตัวซ้ำกัน (repeated sequence ชนิด satellite DNA) และมีโครโมโซมหดตัวสุด ซึ่งได้แก่ บริเวณเซนโทรเมียร์ ของเกือบทุก ๆ โครโมโซม ยกเว้นโครโมโซมวาย นอกจากนั้นยังพบบริเวณเทโลเมียร์ (telomere) ของโครโมโซมบางแท่งอีกด้วย เทคนิคนี้ทำได้โดยนำเซลล์ระยะเมทาเฟสแช่ในกรดไฮโดรคลอริก (HCl) และแบเรียมไฮดรอกไซด์ $[Ba(OH)_2]$ แล้วบ่มเซลล์ในเกลือโซเดียม (2XSSC) ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส แล้วย้อมด้วยสีจิมซ่า ส่วนของยูโครมาทิน (euchromatin) จะไม่ติดสีแต่เฮเทอโรโครมาทิน (heterochromatin) จะติดสีเข้ม โดย แบเรียม ไฮดรอกไซด์จะช่วยให้ดีเอ็นเอคลายจากเกลียวคู่เป็นสายเดี่ยว และเกลือโซเดียมจะช่วยให้การจับคู่คือพันเกลียวจากสายเดี่ยวเป็นสายคู่ เทคนิคนี้สามารถใช้ในการศึกษาโครโมโซมเพศเพราะโครโมโซมวายจะไม่ติดสีเข้ม บริเวณเซนโทรเมียร์หรือบริเวณ constitutive heterochromatin

2.13 การย้อมแถบโครโมโซมแบบนอร์ (NOR-banding)

เป็นเทคนิคที่ทำให้ส่วน nucleolar organizer regions (NOR) ติดสีเข้มเรียกอีกอย่างหนึ่งว่าเทคนิค silver staining เพราะใช้สารละลายซิลเวอร์ไนเตรต (silver nitrate) ซึ่งจะเลือกติดบริเวณนี้เท่านั้น (Goodpasture and Bloom, 1976) เทคนิคนี้ใช้ตรวจหา NOR ซึ่งในสัตว์มีกระดูกสันหลังส่วนนี้มียีนสำหรับสังเคราะห์ ribosomal RNA gene (rRNA gene) ชนิด 18S และ 28S ในมนุษย์จะอยู่ในบริเวณรอยคอดที่สองของโครโมโซมคู่ที่ 13, 14, 15, 21 และ 22 ตำแหน่งของ NOR นี้อยู่บริเวณก้านของแซตเทลไลต์โครโมโซมหรือบริเวณรอยคอดที่สอง ของโครโมโซม จึงเรียกโครโมโซมที่มีรอยคอดที่ 2 นี้ว่าแซตเทลไลต์โครโมโซม ตำแหน่ง NOR มีความหลากหลาย (polymorphism) ได้ในโครโมโซมแท่งเดียวกัน ของแต่ละบุคคล มีความแตกต่างกัน ซึ่งใช้เป็นโครโมโซมเครื่องหมาย (chromosome marker) ได้และใช้ในการติดตามคุณภาพดีการถ่ายทอด ลักษณะบางประการของสิ่งมีชีวิต ซึ่งการถ่ายทอดเป็นไปตามกฎของเมนเดล

2.14 การศึกษาเซลล์พันธุศาสตร์ของปาด

ปาดเป็นสัตว์ในตระกูลกบที่มีชีวิตส่วนใหญ่อาศัยอยู่บนต้นไม้หรือในพื้นที่ดิน มีแขนขายาว ปลายนิ้วเป็นปุ่มกลมใหญ่ใช้สำหรับเกาะกิ่งไม้ พบได้โดยทั่วไปตามต้นไม้สูงและช่วยให้พิษเจริญเติบโตเร็วขึ้น เนื่องจากปาดเป็นตัวกำจัดแมลงศัตรูพืช นอกจากนี้ปาดไม่ได้อาศัยอยู่บนพื้นดินเหมือนกับสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกชนิดอื่น ๆ ยกเว้นกรณีที่จะมีการผสมพันธุ์และวางไข่ ซึ่งบางครั้งสร้างรังไข่ (foam nests) ไว้บนใบไม้ และไม่ค้อยออกจากต้นไม้พบได้ทั่วไปในประเทศไทย เช่น ปาดใน Subfamily Rhacophoridae มีมากกว่า 80 ชนิด (species) ที่พบในทวีปเอเชีย (Frost, 2013; Frost, 2011) ในความเป็นจริงแล้วปัญหาหลักคือ ไม่อาจทราบได้ว่าความหลากหลายทางชีวภาพว่ามีมากหรือน้อยเพียงใด การศึกษาเพื่อที่จะอธิบายข้อมูลเกี่ยวกับสัตว์กลุ่มนี้มากกว่า 10 ปีนั้น สามารถศึกษาสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในสกุล *Rhacophorus* (Rujirawan et al., 2013) ศึกษาได้เพียง 1 ใน 4 ส่วนเท่านั้น การค้นพบสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกอย่างต่อเนื่องนั้นเป็นผลมาจากข้อมูล 2 ประการคือ ประการที่ 1 คือการแบ่งหมวดหมู่ของอนุกรมวิธาน ที่ยังมีความคลุมเครือและซับซ้อน (Kellie et al., 2013; Sheridan et al., 2012; Savage et al., 2011) และประการที่ 2 คือการค้นพบสายพันธุ์ใหม่จากการสำรวจทางสัตววิทยาที่เกี่ยวกับสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก และสัตว์เลื้อยคลาน (Shunqing et al., 2010) นอกจากนี้ยังมีข้อมูลเกี่ยวกับ จำนวนโครโมโซมและตำแหน่ง secondary constriction ของปาดใน Subfamily Rhacophorinae มีน้อยมาก เนื่องจากปาดในวงศ์ย่อยนี้ มีจำนวนมากถึง 355 ชนิด (species) แต่มีเพียง 16 ชนิด (species) เท่านั้น ที่มีการรายงานผลการศึกษานับจำนวนโครโมโซมและตำแหน่ง secondary constriction ซึ่งปาดทั้ง 16 ชนิดล้วนมีจำนวนโครโมโซมเท่ากับ 26 ดังแสดงในตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 จำนวนโครโมโซมของปาดชนิดต่าง ๆ

ชนิด (species)	จำนวน โครโมโซม (2n)	ตำแหน่ง Secondary constriction	อ้างอิง
<i>Chiromatis petresi</i>	26	-	Bogart and Tandy, 1981; Morescalchi, 1963
<i>Chiromatis rufescens</i>	26	-	Bogart and Tandy, 1981
<i>Chiromatis xerampelina</i>	26	12,13	Schmid, 1978; 1980
<i>Polypaedates leucomystax</i>	26	6	Matsui et al., 1985; ถาวร สุภาพรมและคณะ, 2535
<i>Polypaedates megacephalus</i>	26	-	Matsui et al., 1985
<i>Rhacophorus arboreus</i>	26	12	Yamamoto and Masuda, 1973; Okumoto, 1977
<i>Rhacophorus boettgeri</i>	26	7	Yamamoto and Masuda, 1973
<i>Rhacophorus chenfui</i>	26	11	Anming and Ermi, 1987
<i>Rhacophorus eiffingeri</i>	26	-	Sato, 1934
<i>Rhacophorus japonicus</i>	26	12	Okumoto, 1977
<i>Rhacophorus leucomystax</i>	26	-	Morescalchi et al., 1970
<i>Rhacophorus maculatus</i>	26	-	Singh et al., 1970; Singh, 1976
<i>Rhacophorus moltrechti</i>	26	-	Kuramoto, 1985
<i>Rhacophorus owstoni</i>	26	-	Kuramoto, 1985
<i>Rhacophorus schlegelii</i>	26	7	Okumoto, 1977
<i>Rhacophorus taipeianus</i>	26	11	Kuramoto, 1985

ที่มา: King (1990)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

การดำเนินการวิจัยแบ่งออกเป็น 4 ขั้นตอน คือ การเก็บตัวอย่าง การเตรียมโครโมโซม การย้อมแถบโครโมโซม การตรวจสอบโครโมโซมและการจัดคาริโอไทป์

3.1 การสำรวจและเก็บตัวอย่าง

3.1.1 การสำรวจและเก็บตัวอย่างปาด ผู้วิจัยจะออกสำรวจและเก็บตัวอย่างปาด จากแหล่งที่อยู่อาศัยตามธรรมชาติในแต่ละฤดูกาล แบบเห็นด้วยตาเปล่าโดยบังเอิญ (visual encounter survey) ในเวลากลางคืน (18.00 น. เป็นต้นไป) โดยตัวอย่างปาด 3 ชนิด คือ ปาดบ้าน (*Polypedates leucomystax*) (ภาพที่ 3.1) และปาดเหนือ (*Polypedates mutus*) (ภาพที่ 3.2) จะเก็บตัวอย่างจากป่าต้นน้ำร่องก้อ ตำบลโพธิ์ใหญ่ อำเภอลำปาง จังหวัดอุบลราชธานี และปาดแคระป่า (*Philautus parvulus*) (ภาพที่ 3.3) จะเก็บตัวอย่างจากป่าต้นน้ำลำห้วยตะขบ ตำบลเสาธงชัย อำเภอกันทรลักษ์ จังหวัดศรีสะเกษ ในช่วงเดือนมิถุนายนถึงเดือนกันยายน พ.ศ. 2559 และในช่วงเดือนมิถุนายนถึงเดือนกันยายน พ.ศ. 2560 จำนวนตัวอย่างดังแสดงในตารางที่ 3.1

3.1.2 นำตัวอย่างปาดที่ได้มาตรวจสอบ ระบุชนิดและบันทึกภาพตัวอย่างปาดแต่ละชนิด ตามเอกสารตำราของ Taylor (1962) และ Chan-Ard (1999) โดยการเปรียบเทียบลักษณะทางสรีรวิทยาและสัณฐานวิทยา และหากมีข้อสงสัยจะสอบถามผู้เชี่ยวชาญทางด้านอนุกรมวิธานสัตว์กลุ่มนี้



ภาพที่ 3.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของปาดบ้าน (*Polypedates leucomystax*)



ภาพที่ 3.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาปาดเหนือ (*Polypedates mutus*)



ภาพที่ 3.3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแคะระป่า (*Philautus parvulus*)

ตารางที่ 3.1 จำนวนปาดที่พบจากการสำรวจในการศึกษา

ชนิดปาด	เก็บตัวอย่างทั้งหมด (ตัว)	เพศผู้ (ตัว)	เพศเมีย (ตัว)
ปาดบ้าน (<i>P. leucomystax</i>)	13	5	8
ปาดแคะระป่า (<i>P. parvulus</i>)	18	8	10
ปาดเหนือ (<i>P. mutus</i>)	5	2	3

3.2 การเตรียมโครโมโซมโดยตรงจากเซลล์ไขกระดูก (bone marrow cells)

เซลล์และเนื้อเยื่อที่นำมาเตรียมโครโมโซม คือ ไขกระดูก (bone marrow) เนื่องจากไขกระดูกเป็นแหล่งกำเนิดของเซลล์เม็ดเลือดขาว ซึ่งเซลล์เม็ดเลือดขาวมีการแบ่งตัวอยู่ตลอดเวลา โดยการเตรียมโครโมโซมภายในตัวของสิ่งมีชีวิต (*in vivo*) ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Schmid (1978) มีขั้นตอนดังนี้

3.2.1 คีโตโคลชิซิน (colchicine) ความเข้มข้น 0.2 mg/ml เข้าที่บริเวณช่องท้องของสัตว์ตัวอย่าง (intraperitoneal injection) โดยใช้ปริมาตร 0.1 ml ต่อน้ำหนักตัวของสัตว์ตัวอย่าง 100 กรัม จากนั้นพักไว้ประมาณ 12-18 ชั่วโมง

3.2.2 ทำให้สัตว์สลบด้วยอีเทอร์ (ether) จากนั้นเลาะเอาเนื้อออกจากกระดูกแขนขาให้หมด แล้วตัดส่วนปลายของกระดูกแขน และกระดูกขาทั้ง 2 ด้าน ด้วยกรรไกรผ่าตัด จากนั้นใช้กระบอกฉีดยาที่มีเข็มติดอยู่ เพื่อดันไขกระดูกออกมา แล้วใส่ใน Tissue Grinder เพื่อที่จะบดไขกระดูกให้เซลล์แยกเป็นเซลล์เดี่ยว ๆ

3.2.3 เติมน้ำสารละลาย 0.075 M KCl ลงไปใน Tissue Grinder ที่ละน้อยแล้วค่อยๆ บดไขกระดูกให้ละเอียด แล้วเทของเหลว (suspension) ที่ได้ ใส่ลงในหลอดปั่นเหวี่ยง (centrifuge tube) จากนั้นเติมน้ำสารละลาย 0.075 M KCl ลงไปจนครบปริมาตร 12 ml นำไปบ่มที่ในตู้บ่ม (incubator) ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 15 นาที

3.2.4 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใส (supernatant) ทิ้งไปจนเหลือปริมาตร 1-2 ml

3.2.5 Re-suspension ด้วยสารละลาย cold fixative (absolute methanol: glacial acetic acid; 3:1) โดยใช้ pasture pipette พร้อม ๆ กับเขย่าหลอดทดลองด้วย vortex mixer จากนั้นเติมน้ำ fresh cold fixative จนครบปริมาตร 10 ml ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

3.2.6 ดูดส่วนใส (supernatant) ทิ้งไปแล้วเปลี่ยน fresh cold fixative ใหม่ ทำตามวิธีในข้อที่ 1.5 จำนวน 3-4 ครั้ง เพื่อที่กำจัดเศษเซลล์

3.2.7 ในครั้งสุดท้ายให้ดูดส่วนใส (supernatant) ออกจนหมดจากนั้นเติมน้ำ fresh cold fixative ลงไปปริมาตร 0.5-1 ml เพื่อที่จะผสมกับตะกอนของเซลล์ จากนั้นนำไปเตรียมโครโมโซมบนแผ่นสไลด์ หรือเก็บตะกอนไว้ในช่องแช่แข็ง (freezer) โดยปิดปากหลอดทดลองให้แน่นหรือด้วยการพันแผ่นพาราฟิล์มหลาย ๆ ชั้น

3.2.8 ในการเตรียมสไลด์ผสม ตะกอนเซลล์ (cell suspension) ให้เข้ากัน แล้วใช้ pasture pipette ดูดและหยด cell suspension ลงบนแผ่นสไลด์ที่เย็น (cold slide) สูงจากแผ่นสไลด์ประมาณ 1-2 ฟุต จำนวน 2-3 หยด แล้วนำแผ่นสไลด์วางลงบน hot plate หรืออ่างน้ำร้อน (water bath) เพื่อให้แผ่นสไลด์แห้ง

3.3 การย้อมแถบโครโมโซม

นำแผ่นสไลด์ที่แห้งแล้วมาย้อมด้วยวิธีการย้อมแถบโครโมโซมแบบต่าง ๆ ดังนี้ คือ ย้อมแถบโครโมโซมแบบจี ย้อมแถบโครโมโซมแบบซี และย้อมแถบโครโมโซมแบบเอ็นโออาร์

3.3.1 ย้อมแถบโครโมโซมแบบจี (G-banding)

ดัดแปลงมาจากวิธีของ Seabright (1971) มีขั้นตอนดังนี้

3.3.1.1 นำแผ่นสไลด์ที่หยดตะกอนเซลล์ (cell suspension) ไปวางบนเตาให้ความร้อน (hot plate) หรืออ่างน้ำอุ่น (water bath) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้โครโมโซมมีความคงตัวเพิ่มขึ้น (chromosome stability)

3.3.1.2 นำแผ่นสไลด์ที่ได้ไปจุ่มเอนไซม์ทริปซิน (0.25% trypsin enzyme) เป็นเวลา 10 วินาที เพื่อที่จะเหนี่ยวนำให้เกิดแถบบนแท่งโครโมโซม โดยเอนไซม์จะไปย่อยโปรตีนฮิสโตน (histone) บนแท่งโครโมโซม

3.3.1.3 ล้างแผ่นสไลด์ด้วย phosphate buffer 2-3 ครั้ง จากนั้นย้อมโครโมโซม ด้วย 15% Giemsa เป็นเวลา 15 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น จากนั้นปล่อยให้สไลด์แห้งที่อุณหภูมิห้อง

3.3.2 ย้อมแถบโครโมโซมแบบซี (C-banding)

ดัดแปลงมาจากวิธีของ Schmid (1978) มีขั้นตอนดังนี้

3.3.2.1 นำแผ่นสไลด์ที่หยดตะกอนเซลล์ (cell suspension) ไปวางบนเตาให้ความร้อน (hot plate) หรืออ่างน้ำอุ่น (water bath) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้โครโมโซมมีความคงตัวเพิ่มขึ้น (chromosome stability)

3.3.2.2 แช่แผ่นสไลด์ในสารละลาย 0.1 N HCl เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง

3.3.2.3 แช่แผ่นสไลด์ในสารละลาย 0.025 M Ba(OH)₂ ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นอุณหภูมิ 65 °C จำนวน 2-3 ครั้ง

3.3.2.4 แช่สไลด์ใน 2X SSC (0.3 M NaCl + 0.03 M tri-sodium citrate) ที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง ในอ่างน้ำอุ่น (water bath) จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นอุณหภูมิ 65 °C จำนวน 2-3 ครั้ง

3.3.2.5 ย้อมโครโมโซมด้วย 15% Giemsa เป็นเวลา 30-45 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น จากนั้นปล่อยให้สไลด์แห้งที่อุณหภูมิห้อง

3.3.3 ย้อมแถบโครโมโซมแบบนอร์ (NOR-banding)

ดัดแปลงมาจากวิธีของ Goodpasture and Bloom (1976) มีขั้นตอนดังนี้

3.3.3.1 นำแผ่นสไลด์ที่หยด cell suspension ไปวางบนเตาให้ความร้อน (hot plate) หรืออ่างน้ำอุ่น (water bath) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้โครโมโซมมีความคงตัวเพิ่มขึ้น (chromosome stability)

3.3.3.2 เตรียมสารละลาย 50% AgNO₃ จากนั้นหยดสารละลาย AgNO₃ 1-2 หยดลงบนแผ่นสไลด์แล้วปล่อยให้สไลด์แห้ง จากนั้นหยดสารละลาย 2% gelatin ลงไป 1-2 หยด แล้วนำไปใส่ใน moisture chamber แล้วปิดฝาให้สนิท นำไปต้มใน อ่างน้ำอุ่น (water bath) ที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 5 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง แล้วปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

3.3.3.3 ย้อมแถบโครโมโซมด้วย 15% Giemsa เป็นเวลา 1 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น จากนั้นฝังสไลด์ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

3.4 การวัดขนาดโครโมโซม การจัดเรียงคาริโอไทป์ การวิเคราะห์โครโมโซมและการทำแบบจำลองโครโมโซม (Ideogram)

นำแผ่นสไลด์ที่ผ่านการย้อมโครโมโซมไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์จำนวน 10 เซลล์ต่อตัวอย่าง เพื่อนับจำนวนโครโมโซม และคัดเลือกเซลล์ในระยะเมตาเฟสที่มีความเหมาะสม กระจายตัวดี จากนั้นทำการบันทึกภาพ แล้วนำภาพที่ได้มาอัดขยาย เพื่อจัดเรียงคาริโอไทป์และดูลักษณะการติดสปีนแถบโครโมโซม แล้วปรับภาพลงบนกระดาษ A4 จากนั้นวัดด้วยเวอร์เนียคาลิเปอร์ (vernier caliper) หาความยาวของแขนสั้นและแขนยาวของโครโมโซมตามวิธีของ Green and Sessions (1991) เพื่อศึกษาค่าเปอร์เซ็นต์ความยาวโครโมโซมสัมพันธ์ (percent of relative length; %RL) และค่าอัตราส่วนของความยาวแขนโครโมโซมแต่ละแท่ง (arm ratio or centromeric ratio; AR or CR) โดยมีรายละเอียดดังนี้

การคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์ความยาวโครโมโซมสัมพันธ์ (percent of relative length; %RL) ได้ตามสูตรนี้

$$\%RL = \frac{\text{ความยาวของโครโมโซมแท่ง (total length; LT) X100}}{\text{ความยาวของผลรวมของแท่งโครโมโซมทั้งหมด (summation total length; \Sigma LT)}} \quad (3.1)$$

โครโมโซมขนาดใหญ่ (large size; L) จะต้องมีค่าเปอร์เซ็นต์ความยาวโครโมโซมสัมพันธ์มากกว่า 9 และโครโมโซมขนาดเล็ก (small size; s) จะต้องมีค่าเปอร์เซ็นต์ความยาวโครโมโซมสัมพันธ์น้อยกว่า 9

โครโมโซมรูปร่างเมตาเซนตริก (metacentric; m) ส่วนค่าอัตราส่วนความยาวแขนของโครโมโซมอยู่ในช่วง 1.00-1.67 โครโมโซมรูปร่างซับเมตาเซนตริก (submetacentric; sm) มีค่าอัตราส่วนความยาวแขนของโครโมโซมอยู่ในช่วง 1.68-3.00 โครโมโซมรูปร่างซิปเทโลเซนตริก (subtelocentric or acrocentric; st or ac) มีค่าอัตราส่วนความยาวแขนของโครโมโซมอยู่ในช่วง 3.01-7.00 และโครโมโซมรูปร่างเทโลเซนตริก (telocentric; tc) มีค่าอัตราส่วนความยาวแขนของโครโมโซมอยู่ในช่วง 7.00- ∞ (ตารางที่ 3.2) จากนั้นนำค่า %RL และค่า CR มาเขียนแบบจำลองโครโมโซมหรืออิดิโอแกรม (ideogram)

การคำนวณค่าอัตราส่วนความยาวแขนโครโมโซม (arm ratio or centromeric ratio; AR or CR) ได้ตามสูตรนี้

$$AR \text{ or } CR = \frac{\text{ความยาวของแขนยาว (length of long arm)}}{\text{ความยาวของแขนสั้น (length of short arm)}} \quad (3.2)$$

ตารางที่ 3.2 การจำแนกรูปร่างโครโมโซมโดยอาศัยค่า CR

Chromosome type	Abbreviation	Centroric ratio (CR)
metacentric	m	1.00-1.67
submetacentric	sm	1.68-3.00
subtelocentric or acrocentric	st or ac	3.01-7.00
telocentric	tc	7.00- ∞

ที่มา: Green and Session (1991)

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 ผลการวิจัย

ผลการศึกษาเซลล์พันธุศาสตร์ของปาด 3 ชนิด คือ ปาดบ้าน (*Polypedates leucomystax*) ปาดแคระป่า (*Philautus parvulus*) และปาดเหนือ (*Polypedates mutus*) ในการศึกษาครั้งนี้ ปาดแคระป่าและปาดเหนือ เป็นการรายงาน ผลการศึกษาทางเซลล์พันธุศาสตร์เป็น ครั้งแรก โดยปาด ทั้ง 3 ชนิด มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 26 และมีคาริโอไทป์ประกอบด้วยโครโมโซมขนาดใหญ่ 5 คู่ และโครโมโซมขนาดเล็ก 8 คู่ ซึ่งเมื่อวัดค่าเปอร์เซ็นต์ความยาวโครโมโซมสัมพันธ์ ค่าอัตราส่วนของความยาวแขน ขนาดของโครโมโซม และการวิเคราะห์รูปร่างโครโมโซม และรายละเอียดของคาริโอไทป์ของปาดทั้ง 3 ชนิดมีดังนี้

4.1.1 ปาดบ้าน (*Polypedates leucomystax*)

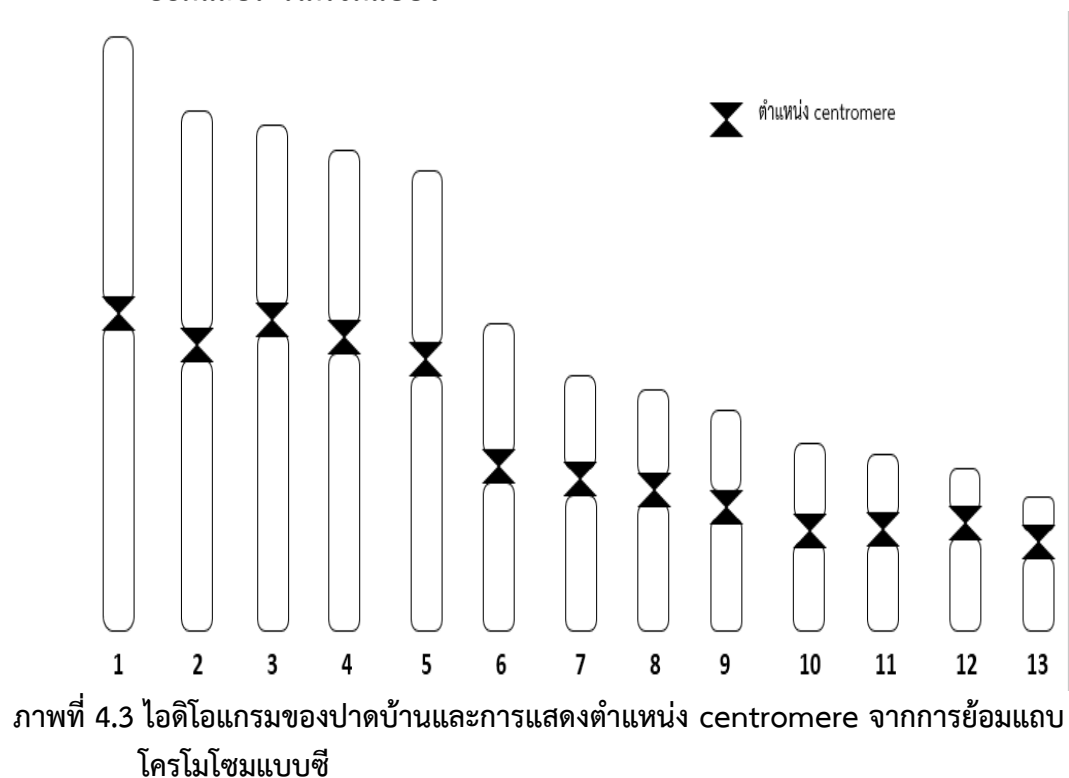
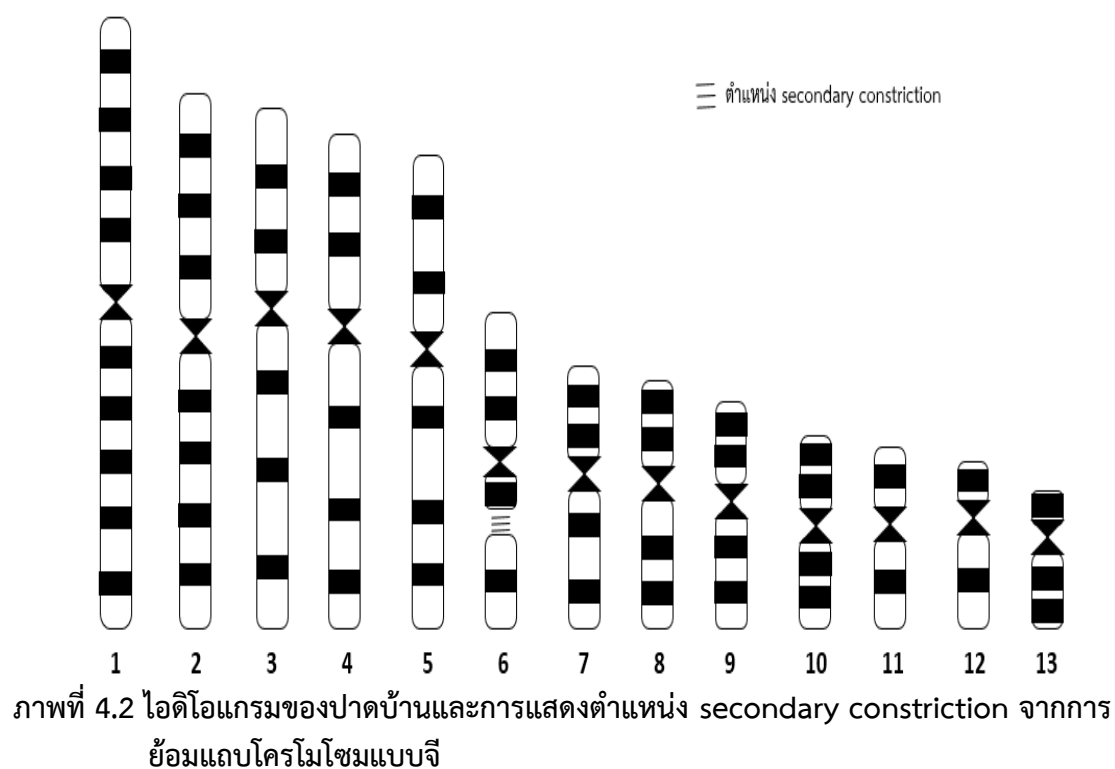
ลักษณะสัณฐานวิทยาของปาดบ้านดังแสดงในภาพที่ 3.1 และการศึกษาเซลล์พันธุศาสตร์ของปาดบ้าน มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 26 และมีคาริโอไทป์ประกอบด้วยโครโมโซมขนาดใหญ่ 5 คู่ และโครโมโซมขนาดเล็ก 8 คู่ (ภาพที่ 4.1) เมื่อวัดความยาวของโครโมโซมและคำนวณอัตราส่วนของแขนโครโมโซมดังปรากฏในตารางที่ 4.1 มีรายละเอียดดังนี้ โครโมโซม รูปร่างเมตาเซนตริกขนาดใหญ่จำนวน 3 คู่ คือ โครโมโซมคู่ที่ 1, 4 และคู่ที่ 5 ซับเมตาเซนตริกขนาดใหญ่จำนวน 2 คู่ คือโครโมโซมคู่ที่ 2 และ 3 เมตาเซนตริกขนาดเล็กจำนวน 6 คู่ คือ โครโมโซมคู่ที่ 6, 7, 8, 10, 11 และคู่ที่ 12 และซับเมตาเซนตริกขนาดเล็กจำนวน 2 คู่ คือ โครโมโซมคู่ที่ 9 และ 13 มีค่าเปอร์เซ็นต์ความยาวโครโมโซมสัมพันธ์ อยู่ในช่วง 14.27-3.16 และค่าอัตราส่วนความยาวแขนของโครโมโซม อยู่ในช่วง 1.20-2.12 นอกจากนี้ยังพบตำแหน่ง secondary constriction ที่บริเวณแขนยาวของโครโมโซมคู่ที่ 6 (ภาพที่ 4.1a และภาพที่ 4.2) การย้อมแถบแบบซีแสดงให้เห็นตำแหน่ง centromeric c-positive ที่ปรากฏบน constitutive heterochromatin บนโครโมโซมทุกแท่ง ดังภาพที่ 4.1b และภาพที่ 4.3 ส่วนการย้อมแบบนอร์ พบ ตำแหน่งนอร์ 1 ตำแหน่งคือ บริเวณแขนสั้นของโครโมโซมคู่ที่ 12 (ภาพที่ 4.1c และภาพที่ 4.4)

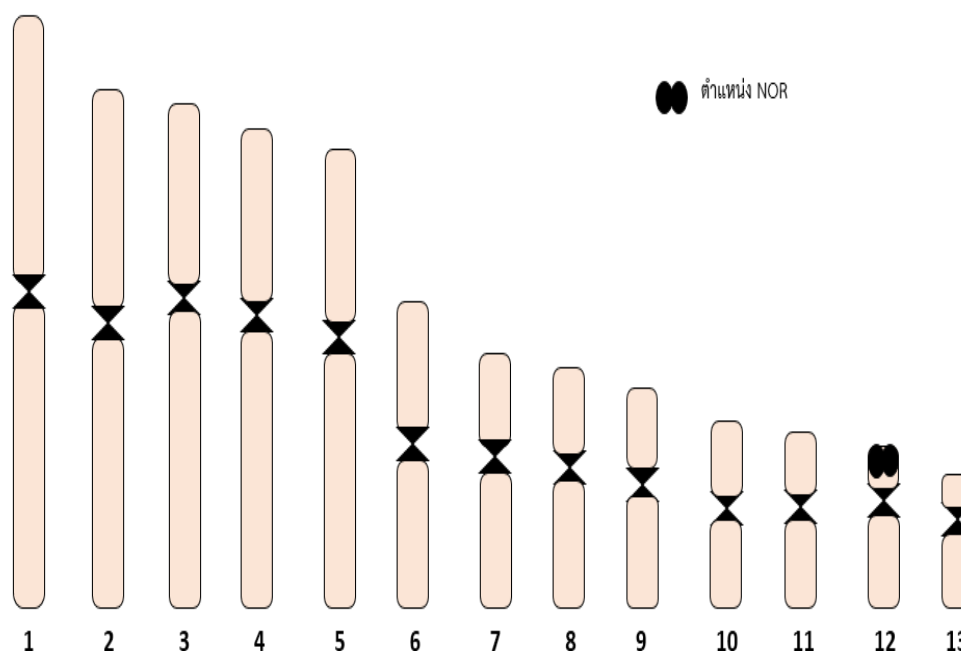
ตารางที่ 4.1 ผลการวิเคราะห์ค่าเปอร์เซ็นต์ความยาวโครโมโซมสัมพันธ์ (%RL) ค่าอัตราส่วนของความยาวแขนโครโมโซมแต่ละแท่ง (CR) และขนาดของโครโมโซมของปาดบ้าน

ชื่อ	ปาดบ้าน (<i>Polypedates leucomystax</i>)			
คู่ที่	%RL	CR	size	Type
1	14.27±0.535	1.20±0.036	L	m
2	12.39±0.615	1.83±0.052	L	sm
3	11.53±0.632	1.83±0.041	L	sm
4	11.96±0.596	1.43±0.061	L	m
5	10.72±0.575	1.41±0.064	L	m
6	7.35±0.560	1.31±0.029	S	m
7	5.68±0.570	1.41±0.049	S	m
8	5.89±0.641	1.16±0.109	S	m
9	5.04±0.582	1.88±0.061	S	sm
10	4.40±0.550	1.18±0.072	S	m
11	4.23±0.611	1.25±0.130	S	m
12	3.76±0.613	1.62±0.077	S	m
13	3.16±0.748	2.12±0.115	S	sm



ภาพที่ 4.1 คาร์ิโอไทป์ของปาดบ้าน (*Polypedates leucomystax*) จากการย้อมแถบโครโมโซมในแบบต่าง ๆ ที่กำลังขยาย 5,000X a) การย้อมแบบจี (G-banding) b) การย้อมแบบซี (C-banding) c) การย้อมแบบนอร์ (NOR-banding) ลูกศรสีดำชี้ตำแหน่ง secondary constriction หรือตำแหน่งนอร์





ภาพที่ 4.4 ไอดิโอแกรมของปาดบ้านและการแสดงตำแหน่งนอร์จากการย้อมแถบโครโมโซมแบบนอร์

4.1.2 ปาดแคระปา (*Philautus parvulus*)

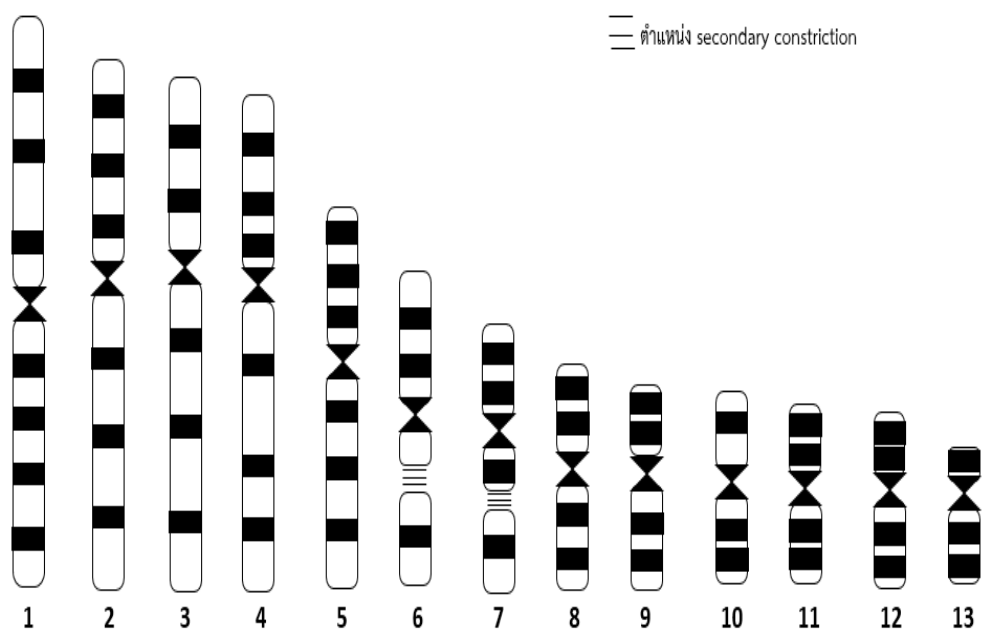
รายงานครั้งนี้เป็นการรายงานผลศึกษาเกี่ยวกับจำนวนโครโมโซมและคาริโอไทป์ครั้งแรกของปาดแคระปามีลักษณะสัณฐานวิทยาดังแสดงในภาพที่ 3.2 มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 26 และมีคาริโอไทป์ ประกอบด้วยโครโมโซมขนาดใหญ่ 5 คู่และโครโมโซมขนาดเล็ก 8 คู่ (ภาพที่ 4.5) เมื่อวัดความยาวของโครโมโซมและคำนวณอัตราส่วนของแขนโครโมโซมดังปรากฏในตารางที่ 4.2 มีรายละเอียดดังนี้ โครโมโซมรูปร่างเมตาเซนตริกขนาดใหญ่จำนวน 4 คู่ คือ โครโมโซมคู่ที่ 1, 2, 4 และคู่ที่ 5 ซับเมตาเซนตริกขนาดใหญ่จำนวน 1 คู่ คือ โครโมโซมคู่ที่ 3 เมตาเซนตริกขนาดเล็กจำนวน 5 คู่ คือ โครโมโซมคู่ที่ 6, 7, 9, 10 และคู่ที่ 12 ซับเมตาเซนตริกขนาดเล็กจำนวน 2 คู่ คือ โครโมโซมคู่ที่ 8 และคู่ที่ 11 และซับเทโลเซนตริกขนาดเล็กจำนวน 1 คู่ คือ โครโมโซมคู่ที่ 13 มีค่าเปอร์เซ็นต์ความยาวโครโมโซมสัมพัทธ์ อยู่ในช่วง 15.36-3.11 และค่าอัตราส่วนความยาวแขนของโครโมโซม อยู่ในช่วง 1.16-3.81 ดังแสดงในตารางที่ 4 นอกจากนี้ยังพบตำแหน่ง secondary constriction ที่บริเวณแขนยาวของโครโมโซมคู่ที่ 6 และคู่ที่ 7 (ภาพที่ 4.6a และภาพที่ 4.6) การย้อมแถบแบบซีแสดงให้เห็นตำแหน่ง centromeric c-positive ที่ปรากฏบน constitutive heterochromatin ดังภาพที่ 4.5b และภาพที่ 4.7 ส่วนการย้อมแบบนอร์ พบตำแหน่งนอร์ 2 ตำแหน่ง คือ บริเวณแขนยาวของโครโมโซมคู่ที่ 6 และคู่ที่ 7 (ภาพที่ 4.5c และภาพที่ 4.8)

ตารางที่ 4.2 ผลการวิเคราะห์ค่าเปอร์เซ็นต์ความยาวโครโมโซมสัมพันธ์ (%RL) ค่าอัตราส่วนของความยาวแขนโครโมโซมแต่ละแท่ง (CR) และขนาดของโครโมโซมของปาดแคระป่า

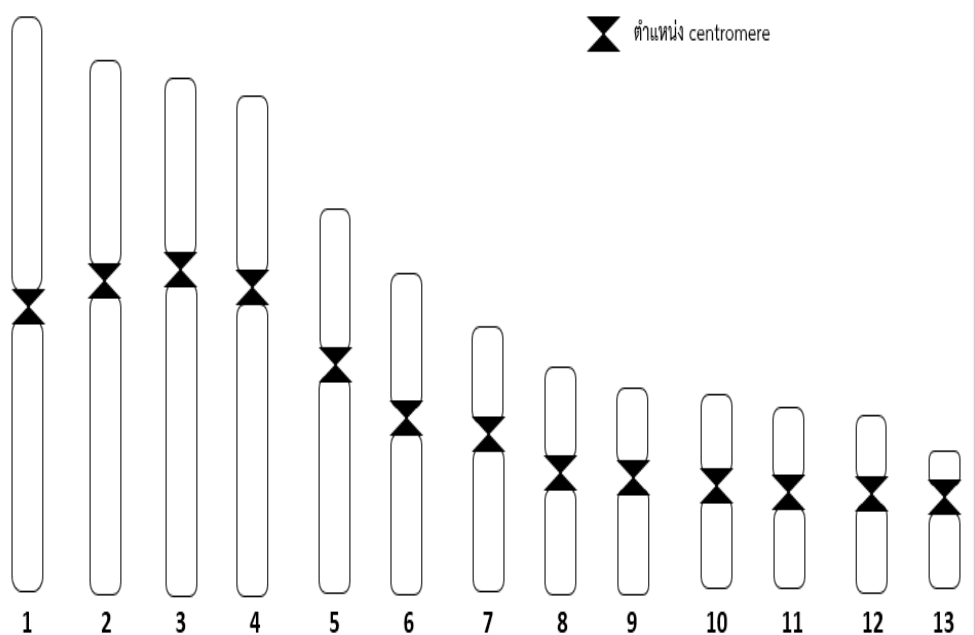
ชื่อ	ปาดแคระป่า (<i>Philautus parvulus</i>)			
ลำดับ	%RL	CR	size	Type
1	15.36±0.532	1.16±0.075	L	m
2	12.18±0.569	1.64±0.072	L	m
3	11.74±0.618	1.74±0.050	L	sm
4	10.59±0.628	1.52±0.038	L	m
5	9.05±0.596	1.41±0.060	L	m
6	7.20±0.537	1.28±0.050	S	m
7	6.85±0.589	1.35±0.029	S	m
8	5.77±0.596	2.26±0.039	S	sm
9	5.12±0.583	1.44±0.051	S	m
10	5.08±0.542	1.28±0.053	S	m
11	4.08±0.589	2.20±0.072	S	sm
12	3.81±0.692	1.71±0.138	S	m
13	3.11±0.711	3.81±0.143	S	st



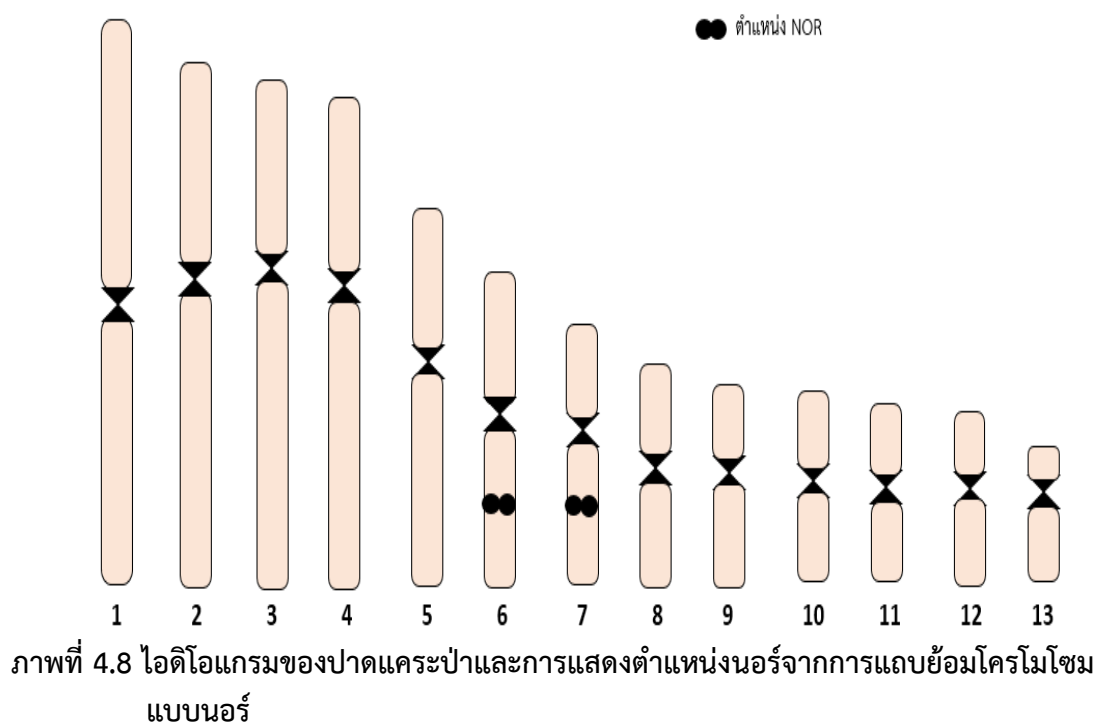
ภาพที่ 4.5 คาร์ิโอไทป์ของแคระป่า (*Philautus parvulus*) จากการย้อมแถบโครโมโซมในแบบต่าง ๆ ที่กำลังขยาย 5,000X a) การย้อมแบบจี (G-banding) b) การย้อมแบบซี (C-banding) c) การย้อมแบบนอร์ (NOR-banding) ลูกศรสีดำชี้ตำแหน่ง secondary constriction หรือตำแหน่งนอร์



ภาพที่ 4.6 ไอดิโอแกรมของปาดแคระป่าและการแสดงตำแหน่ง secondary constriction จากการย้อมแถบโครโมโซมแบบจี



ภาพที่ 4.7 ไอดิโอแกรมของปาดแคระป่าและการแสดงตำแหน่ง centromere จากการย้อมแถบโครโมโซมแบบจี



4.1.3 ปาดเหนื่อ (*Polypedates mutus*)

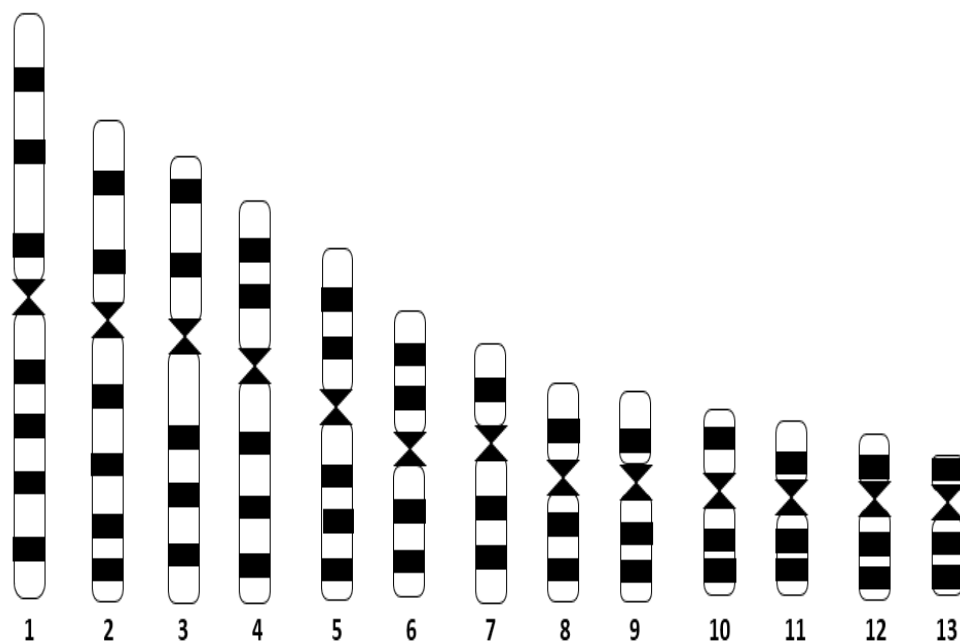
รายงานครั้งนี้เป็นการรายงานผลการศึกษาเกี่ยวกับจำนวนโครโมโซมและคาริโอไทป์เป็นครั้งแรกของปาดเหนื่อ มีลักษณะสัณฐานวิทยาดังแสดงในภาพที่ 3.3 มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 26 และมีคาริโอไทป์ประกอบด้วยโครโมโซมขนาดใหญ่ 5 คู่และโครโมโซมขนาดเล็ก 8 คู่ (ภาพที่ 4.9) เมื่อวัดความยาวของโครโมโซมและคำนวณอัตราส่วนของแขนโครโมโซมดังปรากฏในตารางที่ 4.3 มีรายละเอียดดังนี้ มีโครโมโซมรูปร่างเมตาเซนตริกขนาดใหญ่จำนวน 3 คู่ คือ โครโมโซมคู่ที่ 1, 4 และคู่ที่ 5 ซับเมตาเซนตริกขนาดใหญ่จำนวน 2 คู่ คือ โครโมโซมคู่ที่ 2 และ 3 เมตาเซนตริกขนาดเล็กจำนวน 5 คู่ คือ โครโมโซมคู่ที่ 6, 7, 8, 10 และคู่ที่ 11 และซับเมตาเซนตริกขนาดเล็กจำนวน 3 คู่ คือ โครโมโซมคู่ที่ 9, 12 และคู่ที่ 13 มีค่าเปอร์เซ็นต์ความยาวโครโมโซมสัมพันธ์ อยู่ในช่วง 13.38-3.47 และค่าอัตราส่วนความยาวแขนของโครโมโซม อยู่ในช่วง 1.21-2.12 ดังแสดงในตารางที่ 4 และไม่พบตำแหน่ง secondary constriction (ภาพที่ 4.9a และภาพที่ 4.10) การย้อมแถบแบบซีแสดงให้เห็นตำแหน่ง centromeric c-positive ที่ปรากฏบน constitutive heterochromatin ดังภาพที่ 4.9b และภาพที่ 4.11 แต่ในการย้อมแบบนอร์ พบตำแหน่งนอร์ 2 ตำแหน่ง คือ บริเวณแขนสั้นของโครโมโซมคู่ที่ 1 และคู่ที่ 4 (ภาพที่ 4.9c และภาพที่ 4.12)

ตารางที่ 4.3 ผลการวิเคราะห์ค่าเปอร์เซ็นต์ความยาวโครโมโซมสัมพันธ์ (%RL) ค่าอัตราส่วนของความยาวแขนโครโมโซมแต่ละแท่ง (CR) และขนาดของโครโมโซมของปาดเทนีโอ

ชื่อ	ปาดเทนีโอ (<i>Polypedates mutus</i>)			
คู่ที่	%RL	CR	size	Type
1	13.38±0.540	1.21±0.061	L	m
2	12.53±0.634	1.85±0.067	L	sm
3	11.36±0.634	1.83±0.067	L	sm
4	10.15±0.581	1.43±0.057	L	m
5	10.15±0.578	1.41±0.060	L	m
6	7.90±0.561	1.32±0.040	S	m
7	7.10±0.579	1.42±0.053	S	m
8	5.41±0.534	1.20±0.035	S	m
9	4.94±0.553	1.90±0.134	S	sm
10	4.82±0.533	1.20±0.059	S	m
11	4.49±0.546	1.30±0.083	S	m
12	3.99±0.603	1.62±0.075	S	sm
13	3.47±0.650	2.12±0.106	S	sm



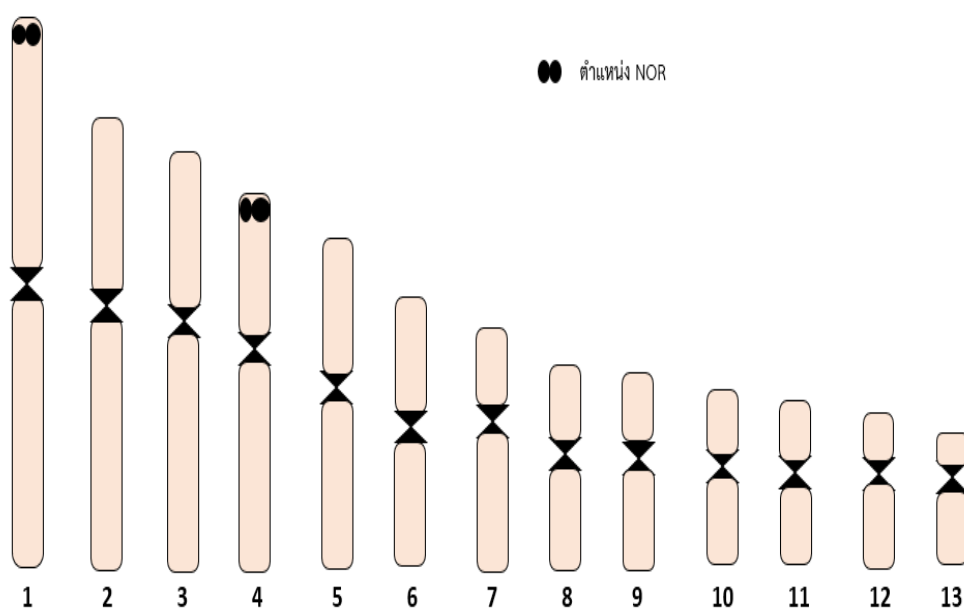
ภาพที่ 4.9 คาร์ิโอไทป์ของปาดเทนีโอ (*Polypedates mutus*) จากการย้อมแถบโครโมโซมในแบบต่าง ๆ ที่กำลังขยาย 5,000X a) การย้อมแบบจี (G-banding) b) การย้อมแบบซี (C-banding) c) การย้อมแบบนอร์ (NOR-banding) ลูกศรสีดำชี้ตำแหน่ง secondary constriction หรือตำแหน่งนอร์



ภาพที่ 4.10 ไอดิโอแกรมของปาดเหนือจากการย้อมแถบโครโมโซมแบบจี



ภาพที่ 4.11 ไอดิโอแกรมของปาดเหนือและแสดงตำแหน่ง centromere จากการย้อมแถบโครโมโซมแบบจี



ภาพที่ 4.12 ไอดิโอแกรมของปาดเหนือและการแสดงตำแหน่งนอร์ จากการย้อมแถบโครโมโซมแบบนอร์

เมื่อเปรียบเทียบคาริโอไทป์ของปาดเพศผู้และเพศเมีย จะไม่พบความแตกต่างของโครโมโซมเพศในปาดทั้ง 3 ชนิด

บทที่ 5

สรุปผลวิจัย อภิปรายผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

การศึกษาเซลล์พันธุศาสตร์ของปาดทั้ง 3 ชนิด คือ ปาดบ้าน (*Polypedates leucomystax*) ปาดแคระป่า (*Philautus parvulus*) และปาดเหนือ (*Polypedates mutus*) โดยการเตรียมไมโทดิกโครโมโซมจากเซลล์ไขกระดูกโดยใช้วิธี *in vivo* colchicine treatment จากนั้นย้อมโครโมโซมแบบจี (G-banding) ย้อมแบบซี (C-banding) และย้อมแบบนอร์ (NOR-banding) พบว่ามีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 26 และมีคาริโอไทป์ประกอบด้วยโครโมโซมขนาดใหญ่ 5 คู่ และโครโมโซมขนาดเล็ก 8 คู่ เหมือนกันทั้ง 3 ชนิด ในการศึกษาครั้งนี้ ปาดแคระป่าและปาดเหนือ เป็นการรายงานผลการศึกษาเกี่ยวกับโครโมโซมและคาริโอไทป์ครั้งแรก สรุปผลวิจัยดังนี้

การศึกษาตำแหน่ง secondary constriction ปาดบ้านพบตำแหน่ง secondary constriction บริเวณแขนยาวของโครโมโซมคู่ที่ 6 และปาดแคระป่าพบที่บริเวณแขนยาวของโครโมโซมคู่ที่ 6 และคู่ที่ 7 แต่ในการศึกษาครั้งนี้ไม่พบตำแหน่ง secondary constriction ในปาดเหนือ เมื่อย้อมแถบแบบซี เพื่อแสดงตำแหน่งของ centromeric c-positive จะพบที่ตำแหน่งเซนโตรเมียร์ของโครโมโซมทุกแท่งในปาดทั้ง 3 ชนิด ส่วนการย้อมแถบแบบนอร์ ในปาดบ้านพบตำแหน่งนอร์ 1 ตำแหน่ง คือ บริเวณแขนสั้นโครโมโซมคู่ที่ 12 ปาดแคระป่าพบตำแหน่งนอร์ 2 ตำแหน่ง คือ บริเวณแขนยาวโครโมโซมคู่ที่ 6 และคู่ที่ 7 และปาดเหนือพบตำแหน่งนอร์ 2 ตำแหน่งคือ บริเวณแขนสั้นโครโมโซมคู่ที่ 1 และคู่ที่ 4 การศึกษาครั้งนี้ไม่พบความแตกต่างของโครโมโซมเพศ (homomorphic of sex chromosome) ในปาดทั้ง 3 ชนิด

5.2 อภิปรายผลการวิจัย

รายงานนี้เป็นรายงานของการศึกษาเซลล์พันธุศาสตร์ในปาดวงศ์ Rhacophoridae จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ ปาดบ้าน ปาดแคระป่าและปาดเหนือ จากการตรวจสอบเอกสารพบว่ามีความหลากหลายของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก ในปัจจุบันมีมากกว่า 6,800 ชนิด (Frost, 2013) ถูกจำแนกเป็น 3 อันดับ (Order) คือ อันดับกบเขียด อันดับซาลาแมนเดอร์ และอันดับเขียดงู ในปัจจุบันมีการค้นพบสัตว์ชนิดใหม่จากการสำรวจสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกและสัตว์เลื้อยคลานเพิ่มมากขึ้น (Ziegler et al., 2014; Suarez et al., 2013) และมีการจัดจำแนกอันดับของกบเขียด ด โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีระวิทยา สามารถจัดจำแนกได้เป็น 27 วงศ์ (Family) 419 สกุล (Genus) มากกว่า 5,556 ชนิด (species) และปัจจุบันมีการจำแนกเป็นวงศ์ปาด 4 วงศ์ (Family) คือ Hylidae, Hyperoliidae, Dendrobatidae, และ Rhacophoridae ในประเทศไทยพบ ปาดเฉพาะ Family Rhacophoridae เท่านั้น (วีระยุทธ์ เลาหะจินดา, 2552)

ปัจจุบันการศึกษาปาดใน Family Rhacophoridae มีมากกว่า 80 ชนิดที่พบในทวีปเอเชีย (Frost, 2013) และกำลังประสบ ปัญหาหลักคือ ไม่สามารถทราบได้ว่าความหลากหลายทางชีวภาพของสัตว์กลุ่มนี้มีปริมาณมากหรือน้อยเพียงใด จากการศึกษาเซลล์พันธุศาสตร์เกี่ยวกับสัตว์กลุ่มนี้มา มากกว่า 10 ปีนั้น สามารถศึกษาสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกได้เพียง 1 ใน 4 ส่วนเท่านั้นและยังไม่ทราบอีกเป็นจำนวนมาก ที่ผ่านมามีการรายงาน ข้อมูลเกี่ยวกับ โครโมโซมและ คาร์ิโอไทป์ของปาดเพียง 16 ชนิดเท่านั้น เมื่อเปรียบเทียบกับความหลากหลายของสัตว์ในกลุ่มนี้แล้วอัตราส่วนของ ข้อมูลทาง เซลล์พันธุศาสตร์ของปาดมีไม่ถึง 1% ซึ่งเป็นปริมาณที่น้อยมาก และจากข้อมูลทางเซลล์พันธุศาสตร์ของปาด พบว่าปาดส่วนใหญ่จะมีจำนวนโครโมโซม ดิพลอยด์ เท่ากับ 26 ($2n=26$) (Kakampuy et al, 2013; Dehling, 2011; Biju et al, 2010; ถาวร สุภาพรมและคณะ, 2535; Max, 1990; Kuramoto and Wang, 1987; Schmid, 1978; Walter, 1972; Kuramoto, 1976)

จากการ ตรวจสอบเอกสารเกี่ยวกับข้อมูลทางเซลล์พันธุศาสตร์ของปาดบ้าน (*P. leucomystax*) มีจำนวนโครโมโซมเท่ากับ 26 และมีตำแหน่ง secondary constriction บริเวณแขนยาวของโครโมโซมคู่ที่ 6 การวิจัยในครั้งนี้มีผลสอดคล้องกับงานวิจัยของ Schmid (1978) งานวิจัยของ Matsui และคณะ (1986) และงานวิจัยของถาวร สุภาพรมและคณะ (2535) ที่มีการศึกษาโครโมโซมของปาดบ้านมาก่อน ดังแสดงในตารางที่ 5.1 ส่วนผลโครโมโซมของ ปาดแคระป่า (*P. parvulus*) และ ปาดเหนือ (*P. mutus*) เป็นการรายงานผลการศึกษาก่อนหน้านี้ ยังไม่มีข้อมูลพื้นฐานใดๆ เกี่ยวกับโครโมโซมและคาร์ิโอไทป์ที่สามารถ อ้างอิงได้ แต่อย่างไรก็ตาม เมื่อนำผลการศึกษามา เปรียบเทียบกับปาดชนิดต่าง ๆ ทั้งในสกุลเดียวกันและต่างสกุลกัน ต่างก็มีจำนวนของโครโมโซมเท่ากับ 26เช่นเดียวกัน

การศึกษาตำแหน่ง secondary constriction และตำแหน่งนอร์โมในปาด มีรายละเอียดดังนี้ ปาดบ้านพบตำแหน่ง secondary constriction จำนวน 1 ตำแหน่ง ที่โครโมโซมคู่ที่ 6 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Schmid (1978), Matsui และคณะ (1986) และงานวิจัยของถาวร สุภาพรมและคณะ (2535) ส่วนในปาดแคระป่าพบตำแหน่ง secondary constriction จำนวน 2 ตำแหน่ง คือโครโมโซมคู่ที่ 6 และคู่ที่ 7 แต่ไม่พบตำแหน่ง secondary constriction ในปาดเหนือ ส่วนการศึกษาตำแหน่งนอร์โม ปาดแคระป่าพบตำแหน่งนอร์โม จำนวน 2 ตำแหน่ง ที่โครโมโซมคู่ที่ 6 และคู่ที่ 7 ส่วนปาดเหนือพบตำแหน่งนอร์โม จำนวน 2 ตำแหน่ง ที่โครโมโซมคู่ที่ 1 และคู่ที่ 4 แต่ปาดบ้านพบตำแหน่งนอร์โมเพียง 1 ตำแหน่ง ที่โครโมโซมคู่ที่ 12 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Schmid (1978)

ตารางที่ 5.1 ข้อมูลจำนวนโครโมโซมของปลาในการศึกษครั้งนี้ เทียบกับข้อมูลจำนวนโครโมโซมของปลาชนิดต่าง ๆ ที่มีมาก่อนหน้า

ชนิด (species)	จำนวนโครโมโซม (2n)	ตำแหน่ง Secondary constriction	อ้างอิง
<i>Chiromatis petresi</i>	26	-	Bogart and Tandy, 1981; Morescalchi, 1963
<i>Chiromatis rufescens</i>	26	-	Bogart and Tandy, 1981
<i>Chiromatis xerampelina</i>	26	12,13	Schmid, 1978; 1980
<i>Polypaedates leucomystax</i>	26	6	Matsui et al., 1985; ถาวรสุภาพรและคณะ, 2535
<i>Polypaedates megacephalus</i>	26	-	Matsui et al., 1985
<i>Rhacophorus arboreus</i>	26	12	Yamamoto and Masuda, 1973; Okumoto, 1977
<i>Rhacophorus boettgeri</i>	26	7	Yamamoto and Masuda, 1973
<i>Rhacophorus chenfui</i>	26	11	Anming and Ermi, 1987
<i>Rhacophorus eiffingeri</i>	26	-	Sato, 1934
<i>Rhacophorus japonicus</i>	26	12	Okumoto, 1977
<i>Rhacophorus leucomystax</i>	26	-	Morescalchi et al., 1970
<i>Rhacophorus maculatus</i>	26	-	Singh et al., 1970; Singh, 1976
<i>Rhacophorus moltrechti</i>	26	-	Kuramoto, 1985
<i>Rhacophorus owstoni</i>	26	-	Kuramoto, 1985
<i>Rhacophorus schlegelii</i>	26	7	Okumoto, 1977
<i>Rhacophorus taipeianus</i>	26	11	Kuramoto, 1985
<i>Polypaedates leucomystax</i>	26	6	การศึกษครั้งนี้
<i>Polypaedates mutus</i>	26	-	การศึกษครั้งนี้
<i>Philautus parvulus</i>	26	6,7	การศึกษครั้งนี้

การย้อมแบบจี (G-banding) ในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกจะให้แถบโครโมโซมที่ได้ไม่ชัดเจน เพราะว่าโครโมโซมของสัตว์กลุ่มนี้มีการหดตัวมากเกินไป (highly chromosome condensation) ส่งผลให้เอนไซม์ทริปซิน (trypsin enzyme) ย่อยโปรตีนบนแท่งโครโมโซมได้น้อย จึงทำให้แถบมืดและแถบสว่างที่เกิดบนแท่งโครโมโซมไม่ชัดเจน (Green and sessions, 1991; King, 1990)

จากผลการศึกษาจำนวนโครโมโซมและคาริโอไทป์ของปลาพบว่ายังมีความอนุรักษ์ค่อนข้างสูง

ซึ่งสาเหตุของการอนุรักษ์ของโครโมโซม (chromosome conservative) ในพวกอะนุเรน จากการศึกษาพบว่าสัตว์เหล่านี้มีบรรพบุรุษร่วมกัน ส่งผลให้โครโมโซมมีลักษณะจำเพาะ ในพิจารณาการจัดเรียงตัวใหม่ของโครโมโซมระหว่างเกิดวิวัฒนาการนั้น จำเป็นต้องคำนึงถึงจำนวนโครโมโซม ดิพลอยด์และรูปร่างโครโมโซมในคาริโอไทป์ที่ปรากฏในปาดชนิดต่างๆ ในแต่ละวงศ์ด้วย เช่น ในคาริโอไทป์ประกอบด้วยโครโมโซมมีรูปร่างเป็นเทโลเซนตริกเพียงอย่างเดียว ให้ถือว่าเป็นกลุ่มที่ไม่มี ความผันแปร (symmetric karyotype) และจัดว่าเป็นคาริโอไทป์แบบโบราณ (primitive stage) ส่วนในคาริโอไทป์ที่ประกอบด้วยโครโมโซมที่มีรูปร่างหลากหลายรูปแบบทั้งแบบเมตาเซนตริก ซับเมตาเซนตริก และอะโครเซนตริก (asymmetric karyotype) จะจัดว่าเป็นคาริโอไทป์แบบสมัยใหม่ (advanced stage) บางกรณีที่สัตว์มีการกระจายพันธุ์อย่างกว้างขวาง เนื่องจากไม่มีสิ่งกีดขวางทางภูมิศาสตร์ หรือหากมีก็น้อย ทำให้เกิดการเคลื่อนย้ายของยีน (gene flow) ได้สูง และมีความสม่ำเสมอ ซึ่งเป็นไปตามทฤษฎีพันธุศาสตร์ของเมนเดล (Lande, 1979)

แม้ว่าผู้วิจัยจะใช้เทคนิคการย้อมแถบโครโมโซมถึง 3 แบบ คือ การย้อมแถบแบบจี แบบซี และแบบนอร์ ก็ไม่สามารถจำแนกความแตกต่างทางรูปพรรณสัณฐานและรูปแบบการย้อมติดลักษณะของแถบที่แตกต่างกัน ของโครโมโซมเพศได้ แสดงว่าโครโมโซมเพศของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกมีรูปร่างลักษณะที่เหมือนกัน (homomorphic characteristics) ซึ่งจากการตรวจสอบเอกสารพบว่า วิวัฒนาการของโครโมโซมเพศในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก ยังอยู่ในขั้นเริ่มต้นเท่านั้น (early stage of sex chromosome differentiation) (King, 1990)

5.3 ข้อเสนอแนะ

5.3.1 การสำรวจได้ยาก เนื่องจากการสำรวจปาดนั้น มีความจำเป็นที่จะต้องคำนึงถึงหลายปัจจัย เช่น ฤดูกาล การเดินทาง บริเวณที่ต้องการสำรวจ ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยได้ทำการสำรวจในหลาย จังหวัด ได้แก่ อุดรธานี นครพนม ศรีสะเกษ อุบลราชธานี อำนาจเจริญ สุรินทร์ บุรีรัมย์ ซึ่งสามารถเก็บตัวอย่างปาดได้เพียง 2 จังหวัด คือ ศรีสะเกษ และอุบลราชธานี

5.3.2 การเตรียมโครโมโซมเพื่อให้ได้เซลล์ในระยะเมตาเฟสค่อนข้างยาก เนื่องจากศึกษาโครโมโซมของปาดนั้น มีความจำเป็นที่จะต้องมีเซลล์ในระยะเมตาเฟส (metaphase) มาก ๆ ต้องคำนึงถึงหลายปัจจัย เช่น สัตว์ต้องมีความเครียดน้อยที่สุด สัตว์ต้องไม่มีการอดอาหาร ระยะเวลาที่ใช้ในการพักสัตว์หลังจากฉีดสารโคชิซินต้องเหมาะสม

5.3.3 โครโมโซมมีการหดตัวมากจนเกิดไปทำให้ศึกษาได้ยาก เนื่องจากสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกมีการหดตัวของโครโมโซมมากจนเกินไปจนทำให้คาริโอไทป์ที่ได้นั้น ส่วนใหญ่มีลักษณะสั้นป้อม แถบโครโมโซมชิดติดกันมาก จนทำให้ดูรายละเอียดที่ปรากฏบนแท่งโครโมโซมแทบมองไม่เห็น ผู้วิจัยจึงต้องมีการนำผลคาริโอไทป์หลาย ๆ อันที่ได้มาเปรียบเทียบกับกัน จึงจะสามารถจำแนก รายละเอียดที่ปรากฏบนแท่งโครโมโซมได้

เอกสารอ้างอิง

เอกสารอ้างอิง

- ถาวร สุภาพรม, วาริณี อรุณมงคลผล และแก้ว อุดมศิริชาคร. “การศึกษาโครโมโซมและคาริโอไทป์ของอิงปากขวดและปาดบ้าน”, ใน การประชุมวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทยครั้งที่ 18, p. 717-724. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2535.
- วีระยุทธ์ เล่าหะจินดา. *วิทยาสัตว์เลื้อยคลานและสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก*. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 10900. 2552.
- Animing T. And Z. Ermi. “Studies on the karyotype, C-bands and Ag-NORs of *Rhacophorus chenfui* Liu”, **Acta Zool.** 33: 105-109, 1987
- Aprea G. and et al. “Karyotogical evolution and systematics of Malagasy microhylid frogs”, **Zoologischer Anzeiger.** 246: 23-41, 2007.
- Bogart J.P. and M. Tandy. “Chromosome lineages in African Ranoid frogs”, **Monit Zool. Ital. Suppl.** 15: 55-91, 1981
- Biju S.D. and et al. “A ground-dwelling rhacophorid frog from the highest mountain peak of the Western Ghats of India”, **Current Science**, 98: 1119-1125, 2010.
- Chan-Ard T. and et al. **Amphibian and Reptiles of peninsular Malaysia and Thailand.** Germany, Wuersele: Busmaster Publications, 1999.
- Dehling M.J. “Taxonomic status of the population of *Rhachophorus angulirostris* Ahl, 1927 (Anura: Rhacophoridae) from Sumatara Barat (West Sumatra) and its description as a new species”, **Salamandra-journal**: 133-143, 2011.
- Frost D.R. **Amphibian Species of the World: an online reference in: version 5.6.** New York, USA.: American Museum of Natural History, 2013.
- Frost D.R. **Amphibian Species of the World: an online reference. Version 5.5.** New York, USA.: American Museum of Natural History, 2011.
- Green D.M. and S.K. Sessions. **Amphibian Cytogenetics and Evolution.** San Diego-New York: Academic Press, 1991.
- Goodpasture C. and Bloom S.E. “An improved technique for selective silver staining of nucleolar organizer regions in human chromosomes”, **Human Genetics.** 34(2): 199–206; January, 1976.
- Gvozdk V. and et al. “Phytogeography of the middle-eastern treefrogs (Hyla, Hylidae, Amphibia) as inferred from nuclear and mitochondrial DNA variation, with a description of a new species”, **Molecular phylogenetic and evolution.** 55: 1146-1166, 2010.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- IUCN. **IUCN red list of threatened species**. Glong, Switzerland.: IUCN, 2011.
- Kakampuy W. and et al. "Chromosome banding of two *Litoria* species (Anura, Hylidae) ", **Songklanakarin J.Sci.technol.** 35(4): 383-387, 2013.
- Kellie W. and et al. "Global peclines of amphibians. In Levin S.A. (ed) **Encyclopedia of biodiversity**. 3: 691-699, 2013.
- Kuramoto M. "A comparative study of karyotypes in the tree frogs (family Rhacophoridae) from japan and Taiwan", **Caryologia; international journal of cytology, cytosystematics and cytogenetics**. 333-342, 1976.
- Kuramoto M. "Karyotypes of two Taiwan Rhacophorid frogs, *Rhacophorus taipeianus* and *R. moltrechti* ", **Bull. Inst. Zool. Acad. Sin.** 24: 63-68, 1985.
- King M. **Animal Cytogenetics**. U.K.: Gebruder Borntraeger Berlin, 1990.
- Lande R. "Effective dame size during long-term evolution estimated from rate of chromosomal rearrangement", **Evolution**. 33: 234-251, 1979.
- Matsui M. and et al. "Bearing of chromosome C-banding patterns of the classification ofrurasian toads of the *Bufo bufo* Complex", **Amphib. Rept.** 6: 23-33, 1985.
- Morescalchi A. " Il corredo cromosoico e il problema dei cromosomi ses suoi in *Bufo viridis* Laur", **Rend. Accad. Naz. Sci. Fis. Mat. Napoli**. 30: 236-240, 1963.
- Morescachi A., E. Olmo and G. Gargiulo. "Considerazioni sull' evoluzion del DNA nucleare negli anfi", **Boll. Zool.** 37: 504-505, 1970
- Nabhitahata J. and T. Chan-ard. **Thailand red data: mammals, reptiles and amphibians**. Bangkok: Office of natural resources and environment policy and planning, 2005.
- Okumoto H. "The karyotypes of four *Rhacophorus* species distributed in japan", **Sci. Rep. Lab. Amphib. Biol.** 2: 199-211, 1977.
- Ohler A. and M. Delorme. "Well known does not mean well studied: morphological and molecular support for existence to sibling species n Javanese gliding frog *Rhacophorus reinwardtii* (amphibian, anura)", **C.R. biologies**: 86-97, 2006.
- Vences M. and J. Kohler. "Global diversity of amphibians (Amphibia) in freshwater", **Springer science business media B.V. Hydrobiologia**. 595: 569-580, 2007.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Rujirawan A., B.L. Sturt and A. Aowphol. "A new tree frog in the genus *Polypedates* (Anura; Rhacophoridae) from southern Thailand", **Zootaxa****3702**. 6: 545-565, 2013.
- Sato I. "On the chromosome of *Rana limnocharis* and *Polypedates buergeri* (*Rhacophorus eiffingeri*)", **Zool. Mag.** 46: 98-104, 1934.
- Schmid M. "Chromosome banding in Amphibia. II. Constitutive hetero chromatin and nucleolar organizer region in Ranidae, Microhylidae and Rhacophoridae", **Chromosoma**. 77: 83-103, 1978.
- Schmid M. **Chromosome evolution in Amphibia**. Muller. H. (ed). Cytogenetics of Vertebrates. USA. Birkhauser, Basel, Boston, 1980.
- Singh L., I.F. Purdom and K.W. Jones. "Satellite DNA and evolution of sex chromosome", **Chromosoma**. 59: 43-62, 1976.
- Singh L., T. Sharma and S.P. Ray-Chaudhuri. "Chromosome numbers and sex chromosome in few indian species of amphibian and reptiles", **Mamm. Chrom. Newslett.** 11: 91-94, 1970.
- Schooch R.R. "Evolution of life cycles early amphibians". **Annual Review of Earth and Planetary Sciences****37**. 1: 135-62, 2009.
- Stuart S. and et al. **Threatened amphibians of the world**. Arlington, virginia, USA.: Lynx Edicions, 2008.
- Suarez P. and et al. "Chromosome evolution in Dendropsophini (Amphibia, Anura, Hyalinae) ", **Cytogenetic genome research****1**. 295-308, 2013.
- Shunqing L. and et al. "Taxonomic status of the spot-legged tree frog in southern Yunnan", **Inferred from mitochondrial DNA sequences. Asian herpetological research****1**. 2: 86-89, 2010.
- Seabright M. "A rapid banding technique for human chromosomes", **Send to Lancet**. 2: 971-2, 1971.
- Sheridan J. A and et al. "Novel behaviors of Southeast Asian Rhacophorid frogs (anura, Rhacophoridae) with an updated anuran species list for panum velley, sabah, Malaysian borneo ", **Tropical natural history**. 1: 1-8, 2012.
- Savage A. E. and et al. "First record of *Batrachochytrium dendrobatidis* infecting four frog families from peninsular Malaysia", **Eco heath**. 8(1): 121(8); March, 2011.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Taylor E.H. **The amphibian fauna of Thailand**. Bangkok Thailand. Univ. Kansas Sci Bull.1962.
- Walter B.V. **Textbook of cytogenetics**. London, U.K. The C.V. MOSBY COMPANY. 139-141, 1972.
- Yamamoto K., and H. Masuda. “Comparative studies on karyotypes in two species of frogs (*Rhacapkorus buerger* and *R. arboreus*)”, **La Kromosomo**. 94: 2932-2936, 1973.
- Ziegler T. and et al. “New amphibian and records from ha Giang province, northern Vietnam”, **Herpetology note**. 7: 185-201, 2014.
- _____. “ครีปปลากระดูกอ่อนหรือกระดูกแข็ง”, **คลาสออสติคไทอิส (Class Osteicthyces)** <http://www.nana.bio.com>. June, 2018
- _____. “กระดูกคลุมเหงือก เหงือก เกล็ดแบบ ganoid และหางที่สมมาตร”, **คลาสออสติคไทอิส (Class Osteicthyces)**. <http://www.sysp.ac.th>. June, 2018
- _____. “กระเพาะลม (swim bladder) และหัวใจห้อง ventricle ของปลา”, **คลาสออสติคไทอิส (Class Osteicthyces)**. <http://www.sysp.ac.th>. June, 2018
- _____. “ปลา coelacanth”, **คลาสออสติคไทอิส (Class Osteicthyces)**. <http://www.geol.umd.edu>. June, 2018
- _____. “ปลาปอดออสเทรเรีย”, **คลาสออสติคไทอิส (Class Osteicthyces)**. <http://www.fishwallpapers.com>. June, 2018
- _____. “ลักษณะการมีช่องเปิดกระดูกโหลกระดูกศีรษะบริเวณกระดูกขมับ”, **temporal fenestration**. <http://www.realmagick.com>. June, 2018
- _____. “การวิวัฒนาการของปลาอยู่บนบกจนกลายมาเป็นสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกและกลายเป็นสัตว์เลื้อยคลานในที่สุด”, **Ichthyostega and Acanthostaga**. <http://th.wikipedia.org/wiki>. June, 2018
- _____. “ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของปลาและสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก”, **Evolution amphibian**. <http://en.wikipedia.org/wiki/ichthyostega>. June, 2018
- _____. “รูปร่างของโครโมโซมแบบต่าง ๆ”, **ลักษณะทางพันธุกรรมของมนุษย์**. <http://sites.google.com>. June, 2018

ภาคผนวก

รายการวัสดุอุปกรณ์ สารเคมีและการเตรียมสารเคมีต่าง ๆ

วัสดุอุปกรณ์

1. เครื่องแก้วขนาดต่าง ๆ
2. Hot plate และ magnetic stirrer
3. กระบอกฉีดยา (syringe) ขนาดต่าง ๆ
4. ชุดเครื่องมือผ่าตัด
5. โลบดเชลล์ (tissue grinder)
6. Pasture pipette ขนาดต่าง ๆ
7. โถสำหรับบดสีย้อม (staining jar)
8. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)
9. เครื่องกรองสาร และแผ่นกรองสาร
10. เครื่องชั่งแบบละเอียด (electronic balance)
11. ตู้เย็น
12. อ่างน้ำอุ่น (water bath)
13. หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave)
14. เครื่อง Vortex mixture
15. ตู้บ่ม (incubator)
16. ตู้ปลอดเชื้อ (lamina air flow)
17. หลอดปั่นเหวี่ยงปลอดเชื้อ (sterile centrifuge tube)
18. ขวดแก้ว Duran Laboratory Bottle ขนาดต่าง ๆ
19. แผ่นสไลด์
20. กล้องจุลทรรศน์ที่ใช้แสงและสามารถถ่ายภาพได้
21. จานเพาะเชื้อ (sterilize plate)
22. ถุงมือปลอดเชื้อ
23. หน้ากากอนามัย (Face mask)

สารเคมี

1. Ether
2. Potassium chloride (KCl)
3. Colchicine
4. Absolute Methanol
5. Ethanol
6. Giemsa's stock solution
7. Sodium hydrogen carbonate (NaHCO_3)
8. Sodium hydrogen phosphate (NaHPO_4)
9. Potassium hydrogen phosphate (KH_2PO_4)
10. Hydrochloric acid (HCl)
11. Sodium hydroxide (NaOH)
12. Colchicine powder
13. Glycerol
14. Barium hydroxide ($\text{Ba}(\text{HO})_3$)
15. Sodium chloride (NaCl)
16. Tri-sodium citrate ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$)
17. Silver nitrate (AgNO_3)
18. Gelatin powder
19. Sterilize water
20. Glacial acetic acid
21. Trypsin enzyme stock solution
22. Normal saline
23. Sulfuric acid
24. Gelatin

การเตรียมสารเคมี

การเตรียมสารละลาย hypotonic solution 0.075 M KCl

สารเคมีที่ใช้ในการเตรียม

1. KCl crystal
2. น้ำกลั่น

วิธีการเตรียม (ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร)

ชั่งน้ำหนัก KCl 5.5880 กรัม แล้วใส่ลงในขวดแก้วปริมาตร (volumetric flask) จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร เขย่าจนผลึกละลายหมด เทใส่ในขวด duran แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง หมายเหตุ: สารละลายนี้มีอายุในเก็บได้นาน 1-2 สัปดาห์

การเตรียมสารละลาย colchicine

สารเคมีที่ใช้ในการเตรียม

1. Colchicine powder
2. น้ำกลั่น

วิธีการเตรียม (ปริมาตร 100 มิลลิลิตร)

ชั่งน้ำหนัก Colchicine powder 0.1000 กรัม แล้วใส่ลงในขวดแก้วปริมาตร (volumetric flask) จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าจนผลึกละลายหมด เทใส่ในขวด duran แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส

การเตรียม Fixative

สารเคมีที่ใช้ในการเตรียม

1. Glacial acetic acid
2. Absolute methanol

วิธีการเตรียม (ปริมาตร 400 มิลลิลิตร)

เท glacial acetic acid ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และ absolute methanol ปริมาตร 300 มิลลิลิตร ลงในขวดแก้ว Duran จากนั้นผสมให้เข้ากัน แล้วใส่ในตู้เย็นช่องแช่แข็ง (freezer) เพื่อให้เย็นจัดและลดการระเหย ข้อควรระวังในการเตรียม fixative จะต้องมีการเตรียมใหม่ทุกครั้ง

การเตรียม Sorensen buffer หรือ phosphate solution buffer

สารเคมีที่ใช้ในการเตรียม

1. Potassium hydrogen phosphate (KH_2PO_4)
2. Sodium hydrogen phosphate (NaHPO_4)
3. น้ำกลั่น

วิธีการเตรียมสารละลายเข้มข้น (stock solution)

1. Stock solution A: ชั่งน้ำหนัก Potassium hydrogen phosphate (KH_2PO_4) 9.1 กรัม แล้วใส่ลงในขวดปริมาตร จากนั้นเติมน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร เขย่าจนผลึกละลายหมดแล้วเทใส่ขวด duran เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

2. Stock solution B: ชั่งน้ำหนัก Sodium hydrogen phosphate (NaHPO_4) 9.5 กรัม แล้วใส่ลงในขวดปรับปริมาตร จากนั้นเติมน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร เขย่าจนผลึกละลายหมดแล้วเทใส่ขวด duran เก็บไว้ในตู้เย็นหมุ่ห้อง
3. วิธีการเตรียม Sorensen buffer หรือ phosphate solution buffer ก่อนนำไปใช้ โดยใช้ stock solution A ปริมาตร 50.8 มิลลิลิตร ผสมกับ stock solution B ปริมาตร 49.2 มิลลิลิตร จะได้ Sorensen buffer หรือ phosphate solution buffer ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ก่อนนำไปใช้งานตามปกติ

การเตรียมสีย้อมจีมา (Giemsa's)

สารเคมีที่ใช้ในการเตรียม

1. Stock Giemsa's solution
2. Phosphate solution buffer

วิธีการเตรียมสีย้อมจีมา 15% (15% Giemsa's solution)

ใช้ stock Giemsa's solution ปริมาตร 15 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางด้วย Phosphate solution buffer ปริมาตร 85 มิลลิลิตร จะได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นกรองด้วยแผ่นกรอง แล้วนำไปใช้งานได้ตามปกติ

การเตรียมสารละลาย 1 N HCl

สารเคมีที่ใช้ในการเตรียม

1. Conc. HCl
2. น้ำกลั่น

วิธีการเตรียมสารละลาย 1 N HCl (ปริมาตร 500 มิลลิลิตร)

ใช้ conc. HCl ปริมาตร 43.68 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่น 456.32 มิลลิลิตร โดยค่อยๆเท conc. HCl ลงไปในน้ำกลั่น (ข้อควรระวังห้ามเทน้ำกลั่นลงใน conc. HCl เป็นอันตราย เนื่องจากปฏิกิริยาเคมีที่เกิดขึ้นระหว่างน้ำกลั่นกับ conc. HCl มีการคายความร้อน ซึ่งอาจก่อให้เกิดอันตรายได้)

การเตรียมสารละลาย 1 N NaOH

สารเคมีที่ใช้ในการเตรียม

1. Sodium hydroxide crystal (NaOH)
2. น้ำกลั่น

วิธีการเตรียมสารละลาย 1 N NaOH (ปริมาตร 500 มิลลิลิตร)

ชั่งน้ำหนักผลึก NaOH 20 กรัม ใส่ลงในขวดปรับปริมาตร จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 500 มิลลิลิตร เขย่าให้ผลึกละลายจนหมดแล้วเทใส่ในขวดแก้ว duran แล้วเก็บไว้ในตู้เย็นหมุ่ห้อง

การเตรียมกระตุ้นสารละลาย 0.25% trypsin

สารเคมีที่ใช้ในการเตรียม

1. Trypsin enzyme stock solution
2. Normal saline solution

วิธีการในการกระตุ้นสารละลาย 0.25% trypsin (ปริมาตร 50 มิลลิลิตร)

ใช้ pasture pipette ดูด Trypsin stock solution ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในขวดปลอดเชื้อจากนั้นเติม Normal saline solution ปริมาตร 45 มิลลิลิตร ลงไปแล้วนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ก่อนนำไปใช้งาน (ข้อควรระวัง ต้องมีการเตรียมใหม่ทุกครั้ง)

วิธีการเตรียมสารละลาย 2X SSC

สารเคมีที่ใช้ในการเตรียม

1. Sodium chloride crystal (NaCl)
2. Tri-sodium citrate crystal ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$)
3. น้ำกลั่น

วิธีการเตรียมสารละลาย 2X SSC (ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร)

1. Stock solution A: เตรียมสารละลาย Sodium chloride 0.3 M ปริมาตร 500 มิลลิลิตร โดยชั่งน้ำหนักผลึก Sodium chloride 17.5500 กรัม ลงในขวดปรับปริมาตรแล้ว เขย่าให้ผลึกละลาย
2. Stock solution B: เตรียมสารละลาย Tri-sodium citrate 0.03 M ปริมาตร 500 มิลลิลิตร โดยชั่งน้ำหนักผลึก Tri-sodium citrate 8.8230 กรัม ลงในขวดปรับปริมาตรแล้ว เขย่าให้ผลึกละลาย
3. นำ Stock solution A และ Stock solution B มาผสมกันแล้วปรับ pH ให้เท่ากับ 7.2 ก่อนนำไปใช้งานตามปกติ

การเตรียมสารละลาย 50% AgNO_3 และสารละลาย 2% gelatin

สารเคมีที่ใช้ในการเตรียม

1. Silver nitrate crystal
2. น้ำกลั่น
3. Gelatin powder
4. Sulfuric acid

วิธีการเตรียมสารละลาย

1. สารละลาย 50% AgNO_3 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร โดยเริ่มจากชั่งผลึก Silver nitrate 0.5000 กรัม แล้วเติมน้ำกลั่นปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้ผลึกละลาย
2. สารละลาย 2% gelatin ปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยเริ่มจากชั่ง Gelatin powder 1.000 กรัม ใส่ลงในขวดปรับปริมาตร แล้ว Sulfuric acid จน Gelatin powder ละลายหมดจากนั้นเติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ 50 มิลลิลิตร เขย่าให้สารละลายผสมกัน

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล

นายพิทักษ์ สีดา

ประวัติการศึกษา

ระดับประถมศึกษา-ระดับมัธยมศึกษาตอนต้น

โรงเรียนบ้านโพธิ์

ระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย

โรงเรียนลือคำหาญวารินชำราบ

ระดับปริญญาตรี

วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

ประวัติงานวิจัย

Isolation and characterization of the Saccharification molds for making Kao-mak (Sweeten rice) inoculum.

ที่อยู่

บ้านเลขที่ 14 หมู่ที่ 8 ตำบลโพธิ์ใหญ่ อำเภовารินชำราบ

จังหวัดอุบลราชธานี 34190