



การศึกษาแคโรไทป์ครั้งแรกของอึ่งหลังจุด (*Micryletta inornata*) ในประเทศไทย
 The first karyotypic study of false ornate narrow-mouthed frog
 (*Micryletta inornata*) in Thailand

ธีรภัทร์ มีบุญ¹ และ อิศสระ ปะทะวัง^{1*}

¹ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อ.เมือง จ.เชียงใหม่ 50200

Teerapat Meeboon¹ and Isara Patawang^{1*}

¹Department of Biology Faculty of Science, Chiang Mai University, Muang, Chiang Mai, 50200 Thailand

*Corresponding Author, E-mail: isara.p@cmu.ac.th

Received: 18 June 2019 | Revised: 26 December 2019 | Accepted: 22 January 2020

บทคัดย่อ

รายงานนี้เป็นการศึกษาแคโรไทป์ครั้งแรกของอึ่งหลังจุด (*Micryletta inornata*) ใช้ตัวอย่างอึ่งหลังจุดเพศผู้ 5 ตัว และเพศเมีย 5 ตัว จากพื้นที่แหล่งน้ำภายในศูนย์การศึกษามหาวิทยาลัยเชียงใหม่หรือภูงูไฮย จังหวัดลำพูน เตรียมโครโมโซมด้วยวิธีตรงจากไขกระดูก เก็บเกี่ยวเซลล์ด้วยเทคนิคโคลชิซิน-ไฮโปโทนิก-ฟิกเซชัน-แอร์ไดรยอิง ย้อมแถบสีโครโมโซมแบบธรรมดาด้วยสีจิมซ่า ผลการศึกษาพบว่าอึ่งหลังจุดมีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ ($2n$) เท่ากับ 26 แห่ง มีจำนวนโครโมโซมพื้นฐาน (NF) เท่ากับ 52 ทั้งในเพศผู้และเพศเมีย แคโรไทป์ประกอบด้วยโครโมโซมชนิดเมทาเซนทริกขนาดใหญ่ 6 แห่ง ซับเมทาเซนทริกขนาดใหญ่ 4 แห่ง เมทาเซนทริกขนาดเล็ก 8 แห่ง และซับเมทาเซนทริกขนาดเล็ก 8 แห่ง ไม่สามารถจำแนกความแตกต่างของโครโมโซมเพศได้ อึ่งหลังจุดมีสูตรแคโรไทป์ คือ $2n (26) = L^m_6 + L^{sm}_4 + S^m_8 + S^{sm}_8$

ABSTRACT

This study is the first report on karyological analysis of the false ornate narrow-mouthed frog, *Micryletta inornata*. Five males and five females were collected from Chiang Mai University Hariphunchai Education Centre, Lamphun Province. Chromosomes were directly prepared from bone marrow. The cells were harvested by colchicine-hypotonic-fixation-air drying method. Conventional staining was applied to stain the chromosome using Giemsa's solution. The results showed that the diploid chromosome number was $2n=26$, the fundamental number (NF) was 56 in both male and female. The karyotype consisted of 6 large metacentric, 4 large submetacentric, 8 small metacentric and 8 small submetacentric chromosomes. No cytologically distinguishable sex chromosome was observed. The karyotype is as follows: $2n (26) = L^m_6 + L^{sm}_4 + S^m_8 + S^{sm}_8$.

คำสำคัญ: แคริโอไทป์ โครโมโซม อึ่งหลังจุด

Keywords: Karyotype, Chromosome, *Micryletta inornata*

บทนำ

อึ่งเป็นสัตว์ที่มีความสำคัญต่อระบบนิเวศ ทำหน้าที่ควบคุมปริมาณแมลงศัตรูพืชไม่ให้แพร่ระบาดมากเกินไป และเป็นหนึ่งในตัวชี้วัดสภาพสิ่งแวดล้อม (indicator species) สามารถบ่งบอกถึงสภาพมลภาวะ ในอากาศและสิ่งแวดล้อมได้เป็นอย่างดี (ธวัช, 2552) อึ่งเป็นสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกจัดอยู่ในอันดับกบ (order Anura) วงศ์อึ่ง (family Microhylidae) ประกอบด้วยสมาชิกประมาณ 641 ชนิด คิดเป็น 9.4% ของประชากรอันดับกบทั้งหมด สามารถแบ่งออกได้เป็น 13 วงศ์ย่อย (subfamily) โดยพบกระจายตัวอย่างกว้างขวางบนทวีปที่อยู่ในเขตร้อนและกึ่งเขตร้อนรวมถึงเอเชีย (Suwannapoom et al., 2018) ประเทศไทยมีรายงานการค้นพบสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในวงศ์อึ่งจำนวน 2 วงศ์ย่อย ได้แก่ Microhylinae จำนวน 6 สกุล 19 ชนิด และ Kalophryninae จำนวน 1 สกุล 2 ชนิด (สำนักงานพัฒนาเศรษฐกิจจากฐานชีวภาพ, 2559)

อึ่งหลังจุด (*Micryletta inornata*) เป็นอึ่งเพียงชนิดเดียวในสกุล *Micryletta* ที่พบในประเทศไทย จัดอยู่ในวงศ์ย่อย Microhylinae อึ่งหลังจุดเป็นอึ่งขนาดเล็ก ขนาดลำตัวยาวประมาณ 25 มิลลิเมตร ลำตัวยาวและแบน หัวเรียวเล็ก ด้านหลังสีเทา น้ำตาลเทา หรือน้ำตาลเหลือง อาจไม่มีหรือมีลวดลายเป็นปื้นสีเข้มรูปร่างกลม ด้านท้องสีขาว คางและส่วนต้นของหน้าอกมีลายจุดสีเข้ม ขาหน้าและขาหลังสั้น (รูปที่ 1) พบกระจายตัวทางตอนใต้ของประเทศจีน เมียนมาร์ ลาว เวียดนาม กัมพูชา มาเลเซียตะวันตก สิงคโปร์ อินโดนีเซีย ภาคเหนือตลอดจนภาคตะวันตกและภาคใต้ของประเทศไทย รวมไปถึงบริเวณหมู่เกาะอันดามัน (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย, ม.ป.ป.; Poyarkov et al., 2018)

มีรายงานการศึกษาโครโมโซมในวงศ์ย่อย Microhylinae ประมาณ 8 ชนิด พบว่าอึ่งในวงศ์ย่อยนี้ มีจำนวน

โครโมโซมดิพลอยด์ ($2n$) อยู่ระหว่าง 22-28 แท่ง (ตารางที่ 1) ลักษณะแคริโอไทป์ประกอบด้วยออโตโซมและโครโมโซมเพศ ออโตโซมจะเป็นโครโมโซมที่มีสองแขนทั้งหมด (bi-armed chromosome) ส่วนโครโมโซมเพศพบว่าอึ่งบางชนิดมีระบบกำหนดเพศแบบ XX/XY โดยโครโมโซม X และ Y เป็นชนิดเมทาเซนทริก (metacentric) (วรวิภา และคณะ, 2541; ธวัชและอัจฉริยา, 2548; จารุพันธ์และคณะ, 2561; Bogart and Nelson, 1976; Kuramoto and Yong, 1992; Joshy and Kuramoto, 2011; Sangpakdee et al., 2017)



รูปที่ 1 ลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกทั่วไปของอึ่งหลังจุด (*Micryletta inornata*)

การศึกษาโครโมโซมของอึ่งสามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานด้านพันธุกรรม เพื่อประโยชน์ในการอนุรักษ์พันธุกรรมของอึ่ง การศึกษาด้านอนุกรมวิธาน ตลอดจนจนถึงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ และใช้เป็นข้อมูลในการศึกษาพันธุศาสตร์ด้านอื่น ๆ ต่อไปในอนาคต

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างอึ่งหลังจุดตัวเต็มวัย เพศผู้ 5 ตัวและเพศเมีย 5 ตัว จากพื้นที่แหล่งน้ำภายในศูนย์การศึกษามหาวิทยาลัยเชียงใหม่หรือภูเขียง จังหวัดลำพูน นำมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการก่อนทำการศึกษาเป็นเวลา 1 วัน เพื่อเป็นการปรับสภาพสัตว์

ตารางที่ 1 ข้อมูลการศึกษาโครโมโซมของอึ่งในวงศ์ย่อย Microhylinae

ชนิด	โครโมโซม ดิพลอยด์	โครโมโซม พื้นฐาน	แคโรไทป์ ออโตโซม	โครโมโซมเพศ		แหล่งอ้างอิง
				X	Y	
อึ่งหลังจุด (<i>Micryletta inomata</i>)	26	52	14m+12sm	-	-	การศึกษาครั้งนี้ (2562)
อึ่งปากขวด (<i>Glyphoglossus molossus</i>)	26	52	18m+8sm	-	-	ธวัชและอัจฉริยา (2548)
	26	52	20m+6sm	-	-	จารุพันธ์และคณะ (2561)
อึ่งแดง (<i>Glyphoglossus guttulatus</i>)	26	52	18m+8sm	-	-	Aprea et al. (2007)
อึ่งอ่างบ้าน (<i>Kaloula pulchra</i>)	24	44	12m+8sm+4a	-	-	Bogart and Nelson (1976)
	28	56	14m+14sm	-	-	จารุพันธ์และคณะ (2561)
อึ่งอ่างก้นขีด (<i>Kaloula mediolineata</i>)	28	54	12m+14sm+2a	-	-	วรวิฑูริและคณะ (2541)
	28	56	8m+20sm	-	-	จารุพันธ์และคณะ (2561)
อึ่งลายแต้ม (<i>Microhyla butleri</i>)	22	44	18m+4sm	-	-	Kuramoto and Yong (1992)
อึ่งน้ำเต้า (<i>Microhyla fissipes</i>)	24	48	16m+6sm	m	m	Sangpakdee et al. (2017)
	26	52	16m+10sm	-	-	Joshy and Kuramoto (2011)
อึ่งขาคำ (<i>Microhyla pulchra</i>)	24	48	12m+12sm	-	-	Sangpakdee et al. (2017)
อึ่งข้างดำ (<i>Microhyla heymonsi</i>)	24	48	20m+4sm	-	-	Kuramoto and Yong (1992)
	24	48	18m+6sm	-	-	Sangpakdee et al. (2017)

หมายเหตุ: m คือ โครโมโซมชนิดเมทาเซนทริก sm คือ โครโมโซมชนิดซับเมทาเซนทริก a คือ โครโมโซมชนิดอะโครเซนทริก และ - คือ ไม่พบโครโมโซมเพศ

2. การเตรียมโครโมโซม

เตรียมโครโมโซมด้วยวิธีตรงจากไขกระดูก ดัดแปลงจากวิธีการของ Patawang et al. (2014) โดยฉีดสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ เข้าช่องท้อง (ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรต่อน้ำหนักตัว 10 กรัม) ทิ้งไว้เป็นเวลา 8-12 ชั่วโมง ทำการสลบอึ่งและผ่าตัดนำไขกระดูกแช่ในสารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.075 โมลาร์ (0.075 M KCl) สับไขกระดูกให้ละเอียด แล้วถ่ายเซลล์ลงในหลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 15 มิลลิลิตร บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปปั่น

เหวี่ยงด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ทำการดูดสารส่วนใสด้านบนทิ้งให้เหลือเฉพาะตะกอนเซลล์ ตรึงเซลล์ด้วยการเติมน้ำยาตรึงเซลล์สูตรคาร์นอยด์ (Carnoy's fixative) จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงและทำซ้ำ 2 รอบจนได้ตะกอนเซลล์สีขาวขุ่น

3. การย้อมสีโครโมโซม

ดูดสารละลายตะกอนเซลล์หยดลงบนแผ่นสไลด์ 1-2 หยด จากนั้นนำไปย้อมสีโครโมโซมด้วยเทคนิคการย้อมแถบสีโครโมโซมแบบธรรมดา ดัดแปลงจากวิธีการของอลงกลดและ

คณะ (2562) โดยนำแผ่นสไลด์ มาย้อมด้วยสีจิมซ่า (Giemsa's solution) ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ ทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที ล้างสีออกด้วยน้ำกลั่น และทิ้งแผ่นสไลด์ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

4. การตรวจสอบโครโมโซม

นำแผ่นสไลด์ที่ผ่านการย้อมสี ไปตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า ทำการถ่ายภาพโครโมโซมระยะเมทาเฟสให้ได้จำนวนมากที่สุด เพื่อนำมาวิเคราะห์จำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ (2n)

5. การจัดทำแคโรไทป์

ตัดภาพโครโมโซมที่ดีที่สุดจากเพศผู้จำนวน 12 เซลล์ และเพศเมียจำนวน 12 เซลล์ มาจัดทำแคโรไทป์ ดัดแปลงจากวิธีการของอลกลดและคณะ (2562) ดังนี้

5.1 นำภาพที่ได้มาตัดโครโมโซมออกเป็นแท่ง โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ประยุกต์ จับคู่โครโมโซมคู่เหมือน (homologous chromosome) โดยกำหนดตำแหน่งเซนโทรเมียร์ของโครโมโซมแต่ละแท่ง จากนั้นวัดค่าความยาวของแขนโครโมโซมข้างสั้น (length of short arm, Ls) ความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาว (length of long arm, Ll) นำมารวมเป็นค่าความยาวของโครโมโซมทั้งแท่ง (length of total, Lt) เมื่อวัดความยาวเสร็จแล้วจึงจับคู่โครโมโซมคู่เหมือนที่มี Ls, Ll และ Lt ใกล้เคียงกันมากที่สุด จากนั้นคำนวณหาค่าความยาวสัมพัทธ์ (relative length, RL) เพื่อช่วยในการจับคู่โครโมโซม ซึ่งค่า RL ของโครโมโซมแต่ละแท่งจะคงที่ในทุก ๆ เซลล์ และนำค่า RL มาหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) โดยค่า RL มีสูตรคำนวณ

$$\text{Relative length (RL)} = \text{LT} / \sum \text{LT}$$

5.2 กำหนดชนิดของโครโมโซมแต่ละคู่ โดยใช้ค่าดัชนีเซนโทรเมียร์ (centromeric index, CI) และนำค่า CI มาหาค่า SD โดยค่า CI มีสูตรคำนวณ

$$\text{Centromeric index (CI)} = \text{Ll} / \text{Lt}$$

5.3 กำหนดขนาดของโครโมโซมแต่ละคู่ โดยให้โครโมโซมคู่ที่ใหญ่ที่สุดเป็นโครโมโซมคู่ที่ 1 และโครโมโซมคู่ที่เล็กที่สุดเป็นโครโมโซมคู่สุดท้าย โดยแบ่งออกเป็น 3 ขนาด ดังนี้

โครโมโซมขนาดใหญ่ (large, L) คือ โครโมโซมคู่ที่มีความยาวทั้งแท่งมากกว่าครึ่งหนึ่งของผลบวกความยาวทั้งแท่งเฉลี่ยของโครโมโซมคู่ที่ใหญ่ที่สุดรวมกับโครโมโซมคู่ที่เล็กที่สุด

โครโมโซมขนาดกลาง (medium, M) คือ โครโมโซมคู่ที่มีความยาวทั้งแท่งน้อยกว่าครึ่งหนึ่งของผลบวกความยาวทั้งแท่งเฉลี่ยของโครโมโซมคู่ที่ใหญ่ที่สุดรวมกับโครโมโซมคู่ที่เล็กที่สุด

โครโมโซมขนาดเล็ก (small, S) คือ โครโมโซมคู่ที่มีความยาวทั้งแท่งน้อยกว่าครึ่งหนึ่งของความยาวทั้งแท่งเฉลี่ยของโครโมโซมคู่ที่ใหญ่ที่สุด

หาค่าจำนวนโครโมโซมพื้นฐาน (fundamental number, NF) โดยคำนวณจากผลรวมของจำนวนแขนของโครโมโซมทุกแท่งในหนึ่งเซลล์

5.4 จัดเรียงแคโรไทป์ โดยนำโครโมโซมแต่ละคู่มาเรียงแยกเป็นคู่ จากขนาดใหญ่ที่สุดเรียงไปหาขนาดเล็กที่สุดโดยวางโครโมโซมในแนวตั้ง ให้แขนโครโมโซมข้างสั้นอยู่ด้านบน แขนโครโมโซมข้างยาวอยู่ด้านล่าง กำหนดหมายเลขคู่โครโมโซม เรียงจากหมายเลข 1, 2, 3, ..., n ตามลำดับ จนถึงคู่สุดท้าย

6. การจัดทำอิดิโอแกรม

จัดทำอิดิโอแกรมจากการวัดความยาวของโครโมโซมทั้งหมด 24 เซลล์ โดยนำค่าเฉลี่ยความยาวของแขนโครโมโซมข้างสั้น และแขนโครโมโซมข้างยาวแต่ละคู่มาจัดทำกราฟ ให้แกนตั้ง (Y) เป็นความยาวของโครโมโซมแต่ละคู่ และแกนนอน (X) เป็นลำดับของโครโมโซมคู่ที่ใหญ่ที่สุดเรียงไปหาคู่ที่เล็กที่สุด

ผลการวิจัย

1. จำนวนโครโมโซม

การตรวจสอบจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ของอึ่งหลังจุด โดยการนับจำนวนโครโมโซมจากภาพถ่ายพบว่า เป็นเซลล์ระยะเมทาเฟสของเพศผู้จำนวน 98 เซลล์ และเพศเมียจำนวน 180 เซลล์ พบว่าเซลล์ระยะเมทาเฟสที่มีจำนวนโครโมโซม 26 แท่ง มีความถี่สูงสุด โดยในเพศผู้พบเซลล์ที่มีจำนวนโครโมโซม 26 แท่ง จำนวน 74 เซลล์ คิดเป็นร้อยละ 75.51 และเพศเมียพบเซลล์ที่มีจำนวนโครโมโซม 26 แท่ง จำนวน 128 เซลล์ คิดเป็นร้อยละ 71.11 จึงสรุปได้ว่าอึ่งหลังจุดมีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 26 แท่ง (ตารางที่ 2)

2. การย้อมแถบสีโครโมโซมแบบธรรมดาและการจัดทำแคโรไทป์

การตรวจสอบโครโมโซมของอึ่งหลังจุดโดยใช้เทคนิคการย้อมแถบสีโครโมโซมแบบธรรมดา พบว่ามีจำนวนโครโมโซม

ดีพลอยด์เท่ากับ 26 แห่ง และมีจำนวนโครโมโซมพื้นฐานเท่ากับ 52 ทั้งในเพศผู้และเพศเมีย แคริโอไทป์ของอิ่งหลังจุดประกอบด้วยโครโมโซมชนิดเมทาเซนทริกขนาดใหญ่ 6 แห่ง (คู่ที่ 1, 2 และ 5) ซับเมทาเซนทริกขนาดใหญ่ 4 แห่ง (คู่ที่ 3 และ 4) เมทาเซนทริกขนาดเล็ก 8 แห่ง (คู่ที่ 6-9) ซับเมทาเซนทริกขนาดเล็ก 8 แห่ง (คู่ที่ 10-13) (รูปที่ 2, 3 และตารางที่ 3)

แคริโอไทป์ของอิ่งหลังจุดจากการย้อมแถบสีโครโมโซมแบบธรรมดาไม่สามารถตรวจพบบริเวณที่เป็นรอยคอดที่สอง (2^{nd} constriction) หรือโครโมโซมที่เป็นแซตเทลไลต์ (satellite chromosome) อันจะใช้เพื่อระบุเป็นโครโมโซมเครื่องหมายได้ นอกจากนี้แคริโอไทป์ยังไม่สามารถระบุโครโมโซมเพศของอิ่งหลังจุดได้ อิ่งหลังจุดมีสูตรแคริโอไทป์ คือ

$$2n (26) = L^m_6 + L^{sm}_4 + S^m_8 + S^{sm}_8$$

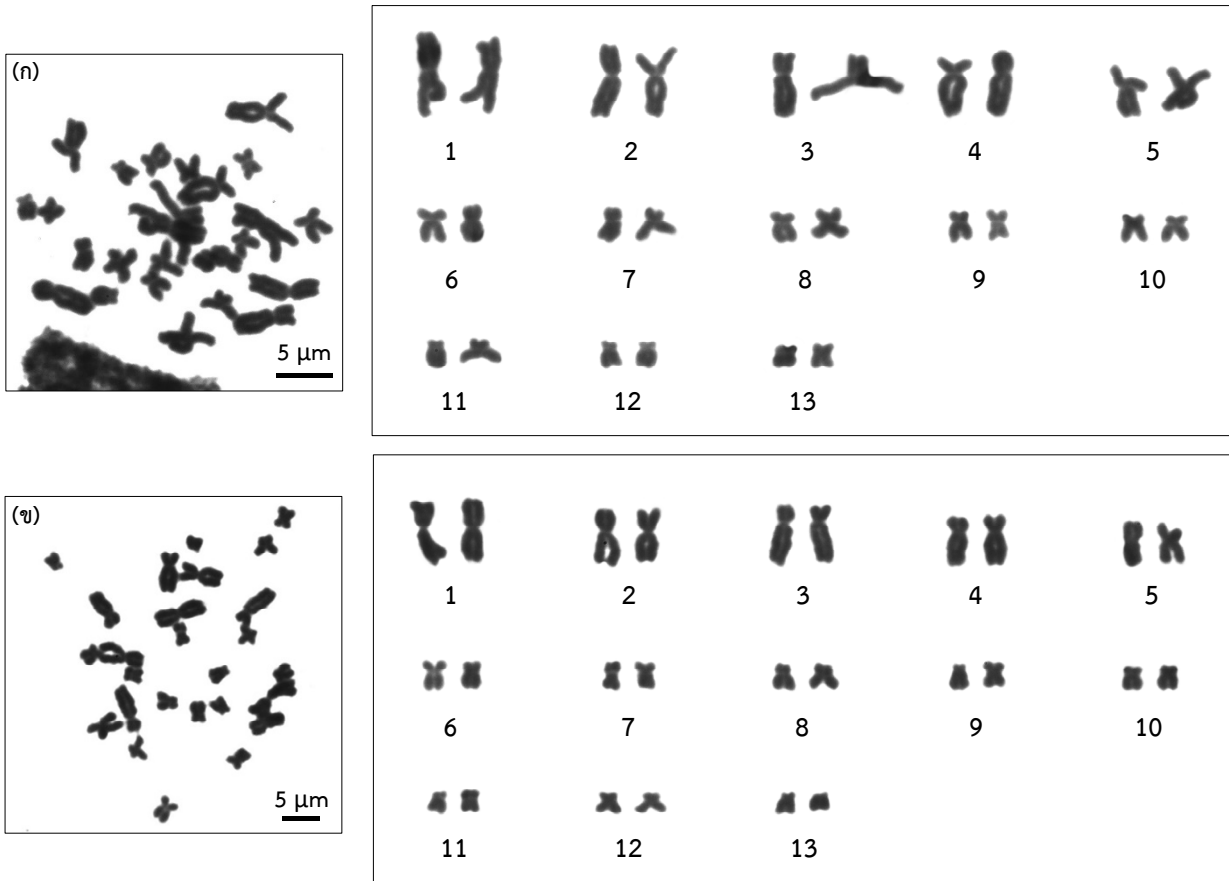
ตารางที่ 2 จำนวนโครโมโซม จำนวนเซลล์ที่พบและร้อยละของเซลล์อิ่งหลังจุด

จำนวนโครโมโซม (แห่ง)	จำนวนเซลล์ (ร้อยละ)	
	เพศผู้	เพศเมีย
<24	3 (3.06)	11 (6.11)
24	6 (6.12)	9 (5.00)
25	5 (5.10)	15 (8.33)
26	74 (75.51)	128 (71.11)
27	4 (4.08)	8 (4.44)
>27	6 (6.12)	9 (5.00)
รวม	98	180

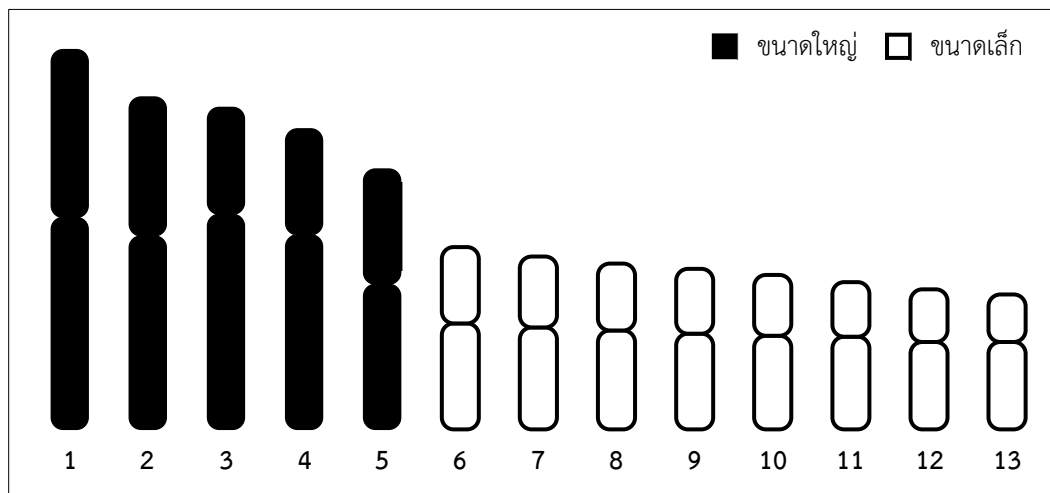
ตารางที่ 3 ค่าเฉลี่ยความยาวของแขนโครโมโซมข้างสั้น (Ls) แขนข้างยาว (LL) ความยาวทั้งแท่ง (LT) ค่า relative length (RL) ค่า centromeric index (CI) ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) ของค่า RL และ CI จากโครโมโซมระยะเมทาเฟสจำนวน 24 เซลล์ ของอิ่งหลังจุด (*M. inornata*, $2n = 26$) ทั้งเพศผู้และเพศเมีย

คู่ที่	Ls	LL	LT	RL±SD	CI±SD	ขนาดโครโมโซม	ชนิดโครโมโซม
1	3.081	3.897	6.978	0.133±0.006	0.559±0.026	ใหญ่	เมทาเซนทริก
2	2.544	3.558	6.102	0.116±0.006	0.583±0.043	ใหญ่	เมทาเซนทริก
3	1.964	3.959	5.923	0.113±0.006	0.668±0.031	ใหญ่	ซับเมทาเซนทริก
4	1.944	3.582	5.526	0.105±0.006	0.648±0.041	ใหญ่	ซับเมทาเซนทริก
5	2.124	2.669	4.794	0.091±0.005	0.557±0.029	ใหญ่	เมทาเซนทริก
6	1.401	1.950	3.351	0.064±0.004	0.582±0.023	เล็ก	เมทาเซนทริก
7	1.303	1.870	3.173	0.060±0.003	0.589±0.029	เล็ก	เมทาเซนทริก
8	1.232	1.814	3.046	0.058±0.002	0.595±0.036	เล็ก	เมทาเซนทริก
9	1.194	1.765	2.958	0.056±0.004	0.597±0.032	เล็ก	เมทาเซนทริก
10	1.124	1.714	2.838	0.054±0.004	0.604±0.037	เล็ก	ซับเมทาเซนทริก
11	1.016	1.693	2.708	0.052±0.004	0.625±0.042	เล็ก	ซับเมทาเซนทริก
12	0.965	1.603	2.567	0.049±0.003	0.624±0.044	เล็ก	ซับเมทาเซนทริก
13	0.872	1.610	2.482	0.047±0.004	0.649±0.043	เล็ก	ซับเมทาเซนทริก

หมายเหตุ: โครโมโซมขนาดใหญ่มีค่า LT มากกว่า 4.730, โครโมโซมขนาดกลางมีค่า LT ระหว่าง 3.489-4.730 และโครโมโซมขนาดเล็กมีค่า LT น้อยกว่า 3.489



รูปที่ 2 โครโมโซมระยะเมทาเฟสและแคโรไทป์ของอีงหลังจุด (*Micryletta inornata*, $2n=26$) เพศผู้ (ก) และเพศเมีย (ข) โดยเทคนิคการย้อมแถบสีโครโมโซมแบบธรรมดา



รูปที่ 3 อิติโอแกรมมาตรฐานของอีงหลังจุด (*Micryletta inornata*, $2n = 26$) โดยเทคนิคการย้อมแถบสีโครโมโซมแบบธรรมดา

วิจารณ์ผลการวิจัย

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าลักษณะแคริโอไทป์ของอึ่งหลังจุดประกอบด้วยโครโมโซม 26 แท่ง โดยเป็นโครโมโซมชนิดที่มีแขนสองข้างทั้งหมด (รูปที่ 2 และ 3) เมื่อเปรียบเทียบกับแคริโอไทป์ของอึ่งหลังจุดจากการศึกษาในครั้งนี้กับผลการศึกษาโครโมโซมในอึ่งวงศ์ย่อยเดียวกันพบว่าอึ่งหลังจุดมีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์และจำนวนโครโมโซมพื้นฐานเท่ากับอึ่งปากขวด (*Glyphoglossus molossus*) อึ่งแดง (*G. guttulatus*) และในบางรายงานของอึ่งน้ำเต้า (*Microhyla fissipes*) (ธวัชและอัจฉริยา, 2548; จารุพันธ์และคณะ, 2561; Aprea et al., 2007; Joshy and Kuramoto, 2011) แต่มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์น้อยกว่าอึ่งอ่างกันซิด (*Kaloula mediolineata*) และในบางรายงานของอึ่งอ่างบ้าน (*K. pulchra*) (วรวิฑูมิและคณะ, 2541; จารุพันธ์และคณะ, 2561) และมีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์มากกว่าอึ่งลายแต้ม (*M. butleri*) อึ่งขาคำ (*M. pulchra*) อึ่งข้างดำ (*M. heymonsi*) ในบางรายงานของอึ่งน้ำเต้า (*K. butleri*) และในบางรายงานของอึ่งอ่างบ้าน (*K. pulchra*) (Bogart and Nelson, 1976; Kuramoto and Yong, 1992; Sangpakdee et al., 2017) (ตารางที่ 1) ลักษณะแคริโอไทป์ของอึ่งหลังจุดจัดว่าค่อนข้างพัฒนาแล้ว (advance karyotype) เนื่องจากมีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ไม่มากและอยู่ในช่วงเดียวกับของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกชนิดอื่น ๆ คือ อยู่ภายในช่วง 22-28 แท่ง และแคริโอไทป์ประกอบด้วยโครโมโซมที่มีแขนสองข้างทั้งหมด (Morescalchi, 1980; Green and Sessions, 2012) อึ่งในวงศ์ย่อย Microhylinae มีการเปลี่ยนแปลงระดับโครโมโซมในขั้นตอนของวิวัฒนาการ โดยลดจำนวนโครโมโซมลง ซึ่งอาจเกิดการเปลี่ยนแปลงมาจากบรรพบุรุษที่เกิดการแตกหักของชิ้นส่วนโครโมโซมชนิดเทโลเซนทริกหรืออะโครเซนทริกแล้วเกิดการเชื่อมรวมกันกลายเป็นโครโมโซมที่มีแขนสองข้าง (อลงกลด และคณะ, 2562)

เมื่อเปรียบเทียบกับลักษณะแคริโอไทป์กับอึ่งชนิดอื่นในวงศ์ย่อยต่าง ๆ ภายในวงศ์ Microhylidae พบว่า แคริโอไทป์มีลักษณะคล้ายคลึงกัน คือ โครโมโซมเป็นชนิดที่มีแขนสองข้างซึ่งประกอบด้วยโครโมโซมชนิดเมทาเซนทริกและซับเมทาเซนทริก แต่ในอึ่งบางชนิดอาจมีโครโมโซมชนิดอะโครเซนทริกร่วมด้วย ดังรายงานของ Kuramoto and Allison (1989) และ Mahony et al. (1992) พบว่าอึ่งในวงศ์ย่อย Asterophryinae

มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์อยู่ในช่วง 26-32 แท่ง และโครโมโซมเป็นชนิดที่มีแขนสองข้าง โดยอึ่งบางชนิดมีโครโมโซมชนิดอะโครเซนทริกร่วมด้วย Blommers-Schlösser (1976) และ Aprea et al. (2007) รายงานว่าอึ่งในวงศ์ย่อย Cophylinae มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 26 และโครโมโซมเป็นชนิดที่มีแขนสองข้าง โดยอึ่งบางชนิดมีโครโมโซมชนิดอะโครเซนทริก รายงานของ Bogart and Nelson (1976) พบว่าอึ่งในวงศ์ย่อย Gastrophryinae มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์อยู่ในช่วง 22-24 แท่ง และโครโมโซมเป็นชนิดที่มีแขนสองข้าง และการศึกษาของ Vences et al. (2002) และ Aprea et al. (2007) รายงานว่าอึ่งในวงศ์ย่อย Scaphiophryinae มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 26 โครโมโซมประกอบด้วยชนิดเมทาเซนทริกและซับเมทาเซนทริก

ดังนั้นแคริโอไทป์ของอึ่งในวงศ์ Microhylidae จัดว่าค่อนข้างพัฒนาจนถึงพัฒนามากที่สุด มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ค่อนข้างน้อยและประกอบด้วยโครโมโซมขนาดใหญ่และมีแขนสองข้าง (ประวิวัฒน์, 2561) นอกจากนี้พบว่าอึ่งหลังจุดและอึ่งอีกหลายชนิดในวงศ์ Microhylidae ไม่สามารถตรวจพบโครโมโซมเพศโดยการย้อมแถบสีโครโมโซมแบบธรรมดาด้วยสีจิมซาได้

สรุปผลการวิจัย

ผลการศึกษารูปได้ว่าอึ่งหลังจุดมีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 26 แท่ง มีจำนวนโครโมโซมพื้นฐานเท่ากับ 52 แท่งในเพศผู้และเพศเมีย แคริโอไทป์ประกอบด้วยโครโมโซมชนิดเมทาเซนทริกขนาดใหญ่ 6 แท่ง ซับเมทาเซนทริกขนาดใหญ่ 4 แท่ง เมทาเซนทริกขนาดเล็ก 8 แท่ง และซับเมทาเซนทริกขนาดเล็ก 8 แท่ง ไม่สามารถจำแนกความแตกต่างของโครโมโซมเพศได้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากทุนวิจัยโครงการส่งเสริมการผลิตครูที่มีความสามารถพิเศษทางวิทยาศาสตร์และคณิตศาสตร์ (สควค.) สถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สสวท.) และได้รับอนุญาตการใช้สัตว์ทดลองตามมาตรฐานสถาบันพัฒนาการดำเนินการต่อสัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (เลขที่คำขอรับใบอนุญาตใช้สัตว์ U1-04491-2559)

เอกสารอ้างอิง

- จารุพันธ์ พาภักดิ์, นพคุณ ภักดีณรงค์ และคมศร เล่าห์ประเสริฐ. (2561). พันธุศาสตร์ของเซลล์อย่างที่นิยมบริโภคในจังหวัดกาฬสินธุ์. ใน: การประชุมทางวิชาการมหาวิทยาลัยมหาสารคามวิจัย ครั้งที่ 14. มหาวิทยาลัยมหาสารคาม, มหาสารคาม. 702-710.
- รัชช ดอนสกุล และอัจฉริยา รังษิรุจิ. (2548). คาร์ิโอไทป์ของเซลล์ตับในกบภูเขา เขียดบัว เขียดกาญจนบุรี เขียดน้ำนอง และอึ่งเพ้า. ใน: การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 43 สาขาสัตวแพทยศาสตร์ สาขาวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 544-551.
- รัชช ดอนสกุล. (2552). แคริโอไทป์ของเซลล์ตับในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก 7 ชนิดที่พบในประเทศไทย. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม 28(2): 162-170.
- ประวีร์ณ สุพรรณอมว. (2561). วิวัฒนาการของโครโมโซมของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในประเทศไทย. วารสารวิทยาศาสตร์ มช. 46(4): 654-663.
- วรวิมล จุฬาลักษณ์านุกุล, อัจฉรา สุวรรณเกิด และผุสดี ปริยานนท์ (2541). การศึกษาคริโอไทป์ของ อึ่งอ่างกันซิด (สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก: ไมโครไฮลิด) วารสารวิจัยวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 23(2): 129-134.
- สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย. (ม.ป.ป.). อึ่งหลังจุด. แหล่งข้อมูล: https://www.tistr.or.th/sakaerat/Flora_Fauna/amphebian/amphebian/%E0%B8%AD%E0%B8%B6%E0%B9%88%E0%B8%87%E0%B8%AB%E0%B8%A5%E0%B8%B1%E0%B8%87%E0%B8%88%E0%B8%B8%E0%B8%94.pdf. ค้นเมื่อวันที่ 19 มิถุนายน 2562.
- สำนักงานพัฒนาเศรษฐกิจจากฐานชีวภาพ (องค์การมหาชน). (2559). บัญชีรายการทรัพยากรชีวภาพ สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: สำนักงานพัฒนาเศรษฐกิจจากฐานชีวภาพ (องค์การมหาชน). หน้า 9-15.
- อลงกลด แทนอมทอง, กฤษณ์ ปิ่นทอง และอิสสระ ปะทะวัง. (2562). พันธุศาสตร์ระดับเซลล์. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. หน้า 464-469.
- Aprea, G., Odierna, G., Andreone, F., Glaw, F. and Vences, M. (2007). Karyological evolution and systematics of Malagasy microhylid frogs. *Zoologischer Anzeiger - A Journal of Comparative Zoology* 246(1): 23-41.
- Blommers-Schlösser, R. M. A. (1976). Chromosomal analysis of twelve species of Microhylidae (Anura) from Mada-gascar. *Genetica* 46(2): 199-210.
- Bogart, J. P. and Nelson, C. E. (1976). Evolutionary implications from karyotypic analysis of frogs of the families Microhylidae and Rhinophrynidae. *Herpetologica* 32(2): 199 -208.
- Green, D. M. and Sessions, S. K. (2012). Amphibian cytogenetics and evolution. San Diego: Academic Press. pp. 113-126.
- Joshy, S. H. and Kuramoto, M. (2011). Karyological studies on 5 anuran species (Rhacophoridae, Microhylidae) from the Western Ghats, southwest India. *Cytologia* 76(2): 111-117.
- Kuramoto, M. and Allison, A. (1989). Karyotypes of microhylid frogs of Papua New Guinea and their systematic implications. *Herpetologica* 45(2): 250-259.
- Kuramoto, M. and Yong, H. (1992). Karyotypes of several frog species from Peninsular Malaysia. *Herpetologica* 48(4): 434-438.
- Mahony, M., Donnellan, S. C. and Aplin, K. (1992). Karyotypes of Australo-Papuan microhylid frogs (Anura: Microhylidae). *Herpetologica* 48(2): 184-192.
- Morescalchi, A. (1980). Evolution and karyology of the amphibians. *Bolletino di Zoologia* 47: 113-126.
- Patawang, I., Tanomtong, A., Phimphan, S., Chuaynkern, Y., Chuaynkern, C., Phaengphairee, P., Khruanet, W. and Nithikulworawong, N. (2014). The identification of sex-chromosomes and karyological analysis of rice frog, *Fejervarya limnocharis* (Anura, Ranidae) from northeast Thailand. *Cytologia* 79(2): 141-150.
- Poyarkov, N. A., Nguyen, T. V., Duong, T. V., Gorin, V. A. and Yang, J. (2018). A new limestone-dwelling species of *Micryletta* (Amphibia: Anura: Microhylidae) from northern Vietnam. *PeerJ* 6: e4422.
- Sangpakdee, W., Phimphan, S., Tengjaroenkul, B., Pinthong, K., Neeratanaphan, L. and Tanomtong, A. (2017). Cytogenetic study of three microhylid species (Anura, Microhylidae) from Thailand. *Cytologia* 82(1): 67-74.
- Suwannapoom, C., Sumontha, M., Tunprasert, J., Ruangsuwan, T., Pawangkhanant, P., Korost, D. V. and Poyarkov, N. A. (2018). A striking new genus and species of cave-dwelling frog (Amphibia: Anura: Microhylidae: Asterophryinae) from Thailand. *PeerJ* 6: e4422.
- Vences, M., Aprea, G., Capriglione, T., Andreone, F. and Odierna, G. (2002). Ancient tetraploidy and slow molecular evolution in Scaphiophryne: ecological correlates of speciation mode in Malagasy relict amphibians. *Chromosome Research* 10(2): 127-136.

