BRT 542059

การตรวจสอบโครโมโซมเพศของกบนา RANA RUGULOSA ด้วยเทคนิคการย้อมแถบสีโครโมโซม

นางสาวเพลินพิศ โชคชัยชำนาญกิจ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาสัตวศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2543
ISBN 974-13-1273-3
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Aug7

433/44

RECEIVED
BY 23/5/44 DATE

23 W.A. 2544

โครงการ BRT ชั้น 15 อาคารมหานครยิบซั่ม
BRT 539/2 ถนนศรีอยุธยา เขตราชเทวี กรุงเทพฯ 10400

2 3 มี.ค. 2544

การตรวจสอบโครโมโซมเพศของกบนา *Rana rugulosa* ด้วยเทคนิคการย้อมแถบสีโครโมโซม

นางสาวเพลินพิศ โชคชัยชำนาญกิจ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2543
ISBN 974-13-1273-3
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

SEX CHROMOSOME IDENTIFICATION OF THE FROG *Rana rugulosa* BY CHROMOSOME BANDING TECHNIQUE

Miss Ploenpis Chockchaichomnankit

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Genetics
Department of Botany
Faculty of Science Chulalongkorn University
Academic Year 2000

ISBN 974-13-1273-3

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การตรวจสอบโครโมโซมเพศของกบนา *Rana rugulosa* ด้วยเทคนิคการย้อมแถบสีโครโมโซม
โดย	นางสาว เพลินพิศ โชคชัยชำนาญกิจ
สาขาวิชา	พันธุศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ผุสตี ปริยานนท์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร.วันชัย โพธิ์พิจิตร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ สุมิตรา คงชื่นสิน)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ดร. วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ผุสตี ปริยานนท์)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ มุกดา คูหิรัญ)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ธีรวรรณ นุตประพันธ์)

BRT 542059

เพลินพิศ โชคชัยชำนาญกิจ : การตรวจสอบโครโมโซมเพศของกบนา *Rana rugulosa* ด้วยเทคนิคการย้อมแถบสีโครโมโซม (SEX CHROMOSOME IDENTIFICATION OF THE FROG *Rana rugulosa* BY CHROMOSOME BANDING TECHNIQUE) อ.ที่ปรึกษา : รศ.ดร.วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล, อ.ที่ปรึกษาร่วม : ผศ.ผุสดี ปริยานนท์, 55 หน้า. ISBN 974-13-1273-3

กบนาเป็นสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก อยู่ในวงศ์ Ranidae พบอยู่ทั่วทุกภาคของประเทศไทย มีความสำคัญต่อระบบนิเวศทำให้เกิดความสมดุลในห่วงโซ่และสายใยอาหาร สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้การเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อม และเป็นอาหารที่ให้คุณค่าโปรตีนต่อมนุษย์ อย่างไรก็ดียังไม่มีรายงานการศึกษาโครโมโซมเพศในกบนา ซึ่งการศึกษาโครโมโซมเพศในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกมีความสำคัญและน่าสนใจ เนื่องจากสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกแต่ละชนิดจะมีรูปแบบของโครโมโซมเพศที่แตกต่างกันไป การศึกษาครั้งนี้จึงได้ศึกษาเปรียบเทียบคาริโอไทป์ของกบนาเพศผู้และเพศเมียด้วยการย้อมสีแบบธรรมดา พบว่ากบนาทั้งสองเพศมีจำนวนโครโมโซม 2n = 26 จัดเป็นโครโมโซมขนาดใหญ่ 5 คู่ มีรูปร่างเป็นเมทาเซนทริก 4 คู่ และอีก 1 คู่มีรูปร่างเป็นสับเมทาเซนทริก และโครโมโซมขนาดเล็ก 8 คู่ มีรูปร่างเป็นเมทาเซนทริก 4 คู่ และอีก 4 คู่มีรูปร่างเป็นสับเมทาเซนทริก และพบเซคันดารีคอนสทริกชันบนแขนข้างยาวของโครโมโซมคู่ที่ 8 ทั้งสองเพศ เมื่อการย้อมแถบสีโครโมโซมแบบจี แบบซี ย้อมเพื่อตรวจสอบตำแหน่งนิวคลีโอลาร์ออร์แกไนเซอร์ และย้อมเพื่อตรวจสอบรูปแบบการจำลองตัวเอง พบว่าโครโมโซมทั้ง 13 คู่เป็นฮอโมมอร์ฟิกโครโมโซม เนื่องจากโครโมโซมแต่ละคู่มีรูปแบบของแถบสีไม่แตกต่างกันทั้งสองเพศ คือไม่พบโครโมโซมเพศในกบนา แสดงว่าโครโมโซมเพศของกบนายังไม่มีวิวัฒนาการของโครโมโซมเพศ

ภาควิชา	พฤกษศาสตร์	ลายมือชื่อนิสิต.....
สาขาวิชา	พันธุศาสตร์	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ปีการศึกษา	2543	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

##4072339823 :MAJOR GENETICS

KEY WORD: *Rana rugulosa* / CHROMOSOME BANDING / SEX CHROMOSOME / CYTOGENETICS

PLOENPIS CHOCKCHAICHOMNANKIT : SEX CHROMOSOME IDENTIFICATION OF THE FROG *Rana rugulosa* BY CHROMOSOME BANDING TECHNIQUE. THESIS ADVISOR : ASSO. PROF. WARAWUT CHULALAKSANANUKUL,Ph.D. THESIS COADVISOR : ASSIST. PROF. PUTSATEE PARIYANONTH, 55 pp.ISBN 974-13-1273-3

Rana rugulosa, family Ranidae, are common amphibians which can be found in most regions of Thailand. The animals play very important role in the ecosystem. It is well known that they contribute tremendously on the food chain and have great influence on the environment surrounding the particular habitat. Moreover, the frogs can serve as the very good protein source for men. However, the sex chromosomes in this frog have not been identified. The studies on this animal's sex chromosomes are therefore not only interesting but also important since each species will exhibit different forms of the chromosomes. This study compared the karyotypes between males and females by using the conventional staining methods. It was found that the number of sex chromosomes in both males and females was similar namely 2n=26. Five pairs of large chromosomes were classified as follows: four pairs as metacentric-type and the other as submetacentric-type. On the other hand, the results on the chromosomes were as follows 4 of the eight pairs were metacentric and the other 4 were submetacentric. Moreover, secondary constriction was found on the long arm of the eight in both male and female chromosomes

When the G-band and C-band stainings were conducted in order to indicate the position of the nucleolar organizer regions and also to check on the type of self replication, it was found that 13 pairs of the chromosomes are homomorphic since no difference in each pair of chromosomes were obviously detectable between these male and female frogs. From these results, it could be concluded that the sex chromosomes in *Rana rugulosa* have not yet evolutionarily developed.

Department ot Botany Student's signature Ploenpis Chockchaichomnankit

Field of study Genetics Advisor's signature Warawut Chulalaksananukul

Academic year 2543 Co-advisor's signature Putsatee P.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความช่วยเหลือของหลายๆ ท่านดังต่อไปนี้

กราบขอบพระคุณภาควิชาพฤกษศาสตร์ที่ให้โอกาสในการศึกษา

กราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ผุสดี ปริยานนท์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ให้คำแนะนำ ข้อคิดเห็นและความช่วยเหลือต่างๆ ในการวิจัยด้วยดี

กราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ สุมิตรา คงชื่นสิน รองศาสตราจารย์ มุกดา คูหิรัญ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ธีรวรรณ นุตประพันธ์ ที่กรุณาสละเวลามาเป็นกรรมการสอบและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์

กราบขอบพระคุณศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยทรายอันเนื่องมาจากพระราชดำริ ที่สนับสนุนตัวอย่างสัตว์เพื่อใช้ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้

กราบขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัย ที่ให้ทุนอุดหนุนการศึกษาเพื่อทำหน้าที่ผู้ช่วยสอนและ/หรือวิจัย

ผลงานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากโครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทยซึ่งร่วมจัดตั้งโดยสำนักงานกองทุนสนันสนุนการวิจัยและศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ รหัสโครงการ BRT 542059 จึงขอขอบคุณมา ณ โอกาสนี้ด้วย

กราบขอบพระคุณ บิดา มารดา และพี่ๆ ที่สนับสนุนด้านการเงินและให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยเสมอมาจนสำเร็จการศึกษา

ท้ายนี้ขอขอบคุณ พี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ที่ให้ความช่วยเหลือด้านต่างๆ ในงานวิจัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ
กิตติกรรมประกาศ..... ฉ
สารบัญ..... ช
สารบัญตาราง..... ญ
สารบัญภาพ..... ฎ
บทที่ 1 บทนำ..... 1
บทที่ 2 ตรวจเอกสาร..... 2
2.1 โครโมโซม..... 2
2.1.1 เซนโทรเมียร์..... 3
2.1.2 ทีโลเมียร์..... 4
2.1.3 แขนของโครโมโซม..... 4
2.1.4 เซคันดารี คอนสทริกชัน..... 4
2.2 การย้อมแถบสีโครโมโซม..... 5
2.2.1 การย้อมแถบสีแบบจี..... 5
2.2.2 การย้อมแถบสีแบบซี..... 6
2.2.3 การย้อมเพื่อตรวจสอบตำแหน่งนิวคลีโอลาร์ออร์แกไนเซอร์ ด้วยวิธี Ag-NOR staining..... 7
2.2.4 การย้อมเพื่อตรวจสอบรูปแบบการจำลองตัวเองโดยใช้ BrdU..... 7
2.3 โครโมโซมเพศ..... 8
2.3.1 ระบบ XO..... 9
2.3.2 ระบบ XY..... 9
2.3.3 ระบบ ZW..... 9
2.4 โครโมโซมเพศในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก..... 10
2.4.1 โครโมโซมเพศมีรูปร่างไม่แตกต่างกัน..... 14
2.4.2 โครโมโซมเพศมีขนาดและรูปร่างแตกต่างกัน..... 16
2.4.3 โครโมโซมเพศมีรูปแบบของแถบสีแตกต่างกัน..... 17
2.4.4 โครโมโซมเพศซนิดซูเปอร์นิวเมอรารี..... 18

สารบัญ(ต่อ)

หน้า

2.4.5 โครโมโซมเพศแบบสลับซับซ้อน..... 18
2.4.6 โครโมโซมเพศหลายรูปแบบ..... 19
2.5 การศึกษาโครโมโซมของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในประเทศไทย..... 20
2.6 วัตถุประสงค์..... 22
บทที่ 3 วัสดุอุปกรณ์และวิธีการศึกษา..... 23
3.1 ตัวอย่างสัตว์ทดลอง..... 23
3.2 สารเคมี..... 23
3.3 อุปกรณ์..... 24
3.4 วิธีดำเนินการศึกษา..... 24
3.4.1 การเตรียมโครโมโซมจากการเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาว..... 25
3.4.2 การย้อมสีแบบธรรมดา..... 26
3.4.3 การย้อมแถบสีแบบจี..... 26
3.4.4 การย้อมแถบสีแบบซี..... 26
3.4.5 การย้อมเพื่อตรวจสอบตำแหน่งนิวคลีโอลาร์ออร์แกไนเซอร์ ด้วยวิธี Ag-NOR staining..... 27
3.4.6 การเตรียมโครโมโซมจากการเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาว เพื่อการย้อมเพื่อตรวจสอบรูปแบบการจำลองตัวเอง โดยใช้ BrdU..... 27
3.4.7 การวิเคราะห์โครโมโซม..... 28
บทที่ 4 ผลการศึกษา..... 30
4.1 ผลจากการย้อมสีแบบธรรมดา..... 30
4.2 ผลจากการย้อมแถบสีแบบจี..... 30
4.3 ผลจากการย้อมแถบสีแบบซี..... 30
4.4 ผลจากการย้อมเพื่อตรวจสอบตำแหน่งนิวคลีโอลาร์ออร์แกไนเซอร์ ด้วยวิธี Ag-NOR staining..... 31
4.5 ผลจากการย้อมเพื่อตรวจสอบรูปแบบการจำลองตัวเองโดยใช้ BrdU... 31
บทที่ 5 อภิปรายผลการศึกษา..... 40
5.1 ผลจากการย้อมสีแบบธรรมดา..... 40
5.2 ผลจากการย้อมแถบสีแบบจี..... 40

สารบัญ(ต่อ)

หน้า

5.3 ผลจากการย้อมแถบสีแบบซี..... 41

5.4 ผลจากการย้อมเพื่อตรวจสอบตำแหน่งนิวคลีโอลาร์ออร์แกไนเซอร์ ด้วยวิธี Ag-NOR staining..... 42

5.5 ผลจากการย้อมเพื่อตรวจสอบรูปแบบการจำลองตัวเองโดยใช้ BrdU... 42

บทที่ 6 สรุปผลการศึกษา..... 44

รายการอ้างอิง..... 46

ภาษาไทย..... 46

ภาษาอังกฤษ..... 47

ภาคผนวก..... 51

ประวัติผู้วิจัย..... 55

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1 รูปแบบโครโมโซมเพศในกลุ่มซาลามานเดอร์..... 11

2 รูปแบบโครโมโซมเพศในกลุ่มกบ เขียด อึ่งอ่าง คางคก ปาด..... 13

3 รายงานจำนวนโครโมโซมของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในประเทศไทย..... 20

4 แสดงค่า RL, NVC ขนาดและรูปร่างของโครโมโซมกบนา..... 32

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ส่วนประกอบของโครโมโซม	3
2	รูปร่างของโครโมโซมแบบต่างๆ	4
3	กบนาเพศผู้	25
4	กบนาเพศเมีย	25
5	โครโมโซมระยะเมทาเฟสและคาริโอไทป์ของกบนาเพศเมีย	33
6	โครโมโซมระยะเมทาเฟสและคาริโอไทป์ของกบนาเพศผู้	33
7	โครโมโซมระยะเมทาเฟสและคาริโอไทป์จากการย้อมแถบสีแบบจี ของกบนาเพศเมีย	34
8	โครโมโซมระยะเมทาเฟสและคาริโอไทป์จากการย้อมแถบสีแบบจี ของกบนาเพศผู้	34
9	โครโมโซมระยะเมทาเฟสและคาริโอไทป์จากการย้อมแถบสีแบบซี ของกบนาเพศเมีย	35
10	โครโมโซมระยะเมทาเฟสและคาริโอไทป์จากการย้อมแถบสีแบบซี ของกบนาเพศผู้	35
11	โครโมโซมระยะเมทาเฟสและคาริโอไทป์จากการย้อมเพื่อตรวจสอบ ตำแหน่งนิวคลีโอลาร์ออร์แกไนเซอร์ด้วยวิธี Ag-NOR staining ของกบนาเพศเมีย	36
12	โครโมโซมระยะเมทาเฟสและคาริโอไทป์จากการย้อมเพื่อตรวจสอบ ตำแหน่งนิวคลีโอลาร์ออร์แกไนเซอร์ด้วยวิธี Ag-NOR staining ของกบนาเพศผู้	36
13	โครโมโซมระยะเมทาเฟสและคาริโอไทป์จากการย้อมเพื่อตรวจสอบ รูปแบบการจำลองตัวเองโดยใช้ BrdU ของกบนาเพศเมีย	37
14	โครโมโซมระยะเมทาเฟสและคาริโอไทป์จากการย้อมเพื่อตรวจสอบ รูปแบบการจำลองตัวเองโดยใช้ BrdU ของกบนาเพศผู้	37
15	อิดิโอแกรมของกบนา	38
16	อิดิโอแกรมจากการย้อมแถบสีแบบจีของกบนา	38
17	อิดิโอแกรมจากการย้อมแถบสีแบบซีของกบนา	38
18	อิดิโอแกรมจากการย้อมเพื่อตรวจสอบตำแหน่ง นิวคลีโอลาร์ออร์แกไนเซอร์ด้วยวิธี Ag-NOR staining ของกบนา	39

สารบัญภาพ(ต่อ)

ภาพที่ หน้า

19 อิดิโอแกรมจากการย้อมเพื่อตรวจสอบรูปแบบการจำลองตัวเอง โดยใช้ BrdU ของกบนา..... 39

บทที่ 1

บทนำ

การศึกษาทางด้านเซลล์พันธุศาสตร์ (cytogenetics) สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในหลายๆ ด้าน เช่น ใช้ช่วยในการจำแนกชนิดของสิ่งมีชีวิต ใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต ใช้ในการศึกษาโรคทางพันธุกรรมอันเนื่องมาจากความผิดปกติของโครโมโซม รวมทั้งใช้ประโยชน์ในการจัดทำแผนที่ยีนบนโครโมโซม สำหรับการศึกษาทางด้านเซลล์พันธุศาสตร์ เกิดขึ้นหลังจากมีการประดิษฐ์กล้องจุลทรรศน์ และความรู้ทางด้านเซลล์พันธุศาสตร์ได้ถูกนำไปประยุกต์ใช้ศึกษาในสิ่งมีชีวิตหลายๆ ชนิด ซึ่งสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกก็เป็นอีกกลุ่มหนึ่งที่มีการศึกษาทางด้านเซลล์พันธุศาสตร์ เนื่องจากโครโมโซมของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกมีขนาดใหญ่ และมีจำนวนโครโมโซมน้อย (Schmid, Olert and Klett, 1979) นอกจากนี้ยังมีประเด็นที่น่าสนใจในการศึกษาเซลล์พันธุศาสตร์ในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก เช่น การศึกษาโครโมโซมเพศ เนื่องจากในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกส่วนใหญ่ไม่สามารถแยกความแตกต่างของโครโมโซมเพศได้อย่างชัดเจน (Schmid, Olert and Klett, 1979) และในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกจำนวนน้อยที่พบโครโมโซมเพศนั้นยังมีรูปแบบโครโมโซมเพศที่แตกต่างกัน ซึ่งนักวิทยาศาสตร์เชื่อกันว่าโครโมโซมเพศของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกอยู่ในขั้นระหว่างกึ่งกลางของกระบวนการวิวัฒนาการของโครโมโซมเพศ (Schmid et al., 1991; Solari, 1994) ดังนั้นจึงมีความสนใจที่จะศึกษาโครโมโซมเพศของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก เพื่อให้ทราบถึงวิถีทางในการวิวัฒนาการของโครโมโซมเพศของสัตว์มีกระดูกสันหลัง (Schmid et al., 1988) ซึ่งในการตรวจสอบโครโมโซมเพศในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกหลายชนิดจำเป็นต้องใช้เทคนิคการย้อมแถบสีโครโมโซม (chromosome banding technique) เข้ามาช่วย

สำหรับในประเทศไทยนั้น พบว่ามีสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกอยู่เป็นจำนวนมาก แต่มีการศึกษาทางด้านเซลล์พันธุศาสตร์ในสัตว์กลุ่มนี้ไม่มากนัก นอกจากนี้ยังมีการนำเทคนิคการย้อมแถบสีโครโมโซมมาใช้ศึกษากับสัตว์ในกลุ่มนี้น้อยมาก และยังไม่มีการศึกษาโครโมโซมเพศของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในประเทศไทย การศึกษาครั้งนี้ได้นำเทคนิคการย้อมแถบสีโครโมโซมมาใช้ในการตรวจสอบโครโมโซมเพศของกบนา (*Rana rugulosa*) ซึ่งเป็นกบพื้นเมืองที่พบอยู่ทั่วทุกภาคของประเทศไทย และจากการศึกษาในครั้งนี้คาดว่าจะทำให้ทราบถึงรูปแบบโครโมโซมเพศของกบนา และสามารถนำเทคนิคการย้อมแถบสีโครโมโซมแบบต่างๆ ไปประยุกต์ใช้กับสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกชนิดอื่นๆ ต่อไป

บทที่ 2

ตรวจเอกสาร

เซลล์พันธุศาสตร์ (cytogenetics) เป็นการศึกษาถึงส่วนประกอบของเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมจากรุ่นพ่อแม่ไปยังลูกหลาน ที่เน้นการศึกษาองค์ประกอบสำคัญในการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรม คือโครโมโซม โดยศึกษาลักษณะและพฤติกรรมของโครโมโซมที่อธิบายได้จากการมองเห็นภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Halnan, 1989) นอกจากจะมีการศึกษาขนาดและรูปร่างของโครโมโซมแล้วยังมีการศึกษาโดยการย้อมแถบสีโครโมโซม (chromosome banding) แบบต่างๆ อีกด้วย ซึ่งความรู้ทางด้านเซลล์พันธุศาสตร์สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ในหลายๆ ด้าน เช่น การจัดจำแนกชนิดของสิ่งมีชีวิต การศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ ใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการปรับปรุงพันธุ์ นอกจากนี้ยังสามารถใช้ในการศึกษาโรคทางพันธุกรรมที่เกิดจากความผิดปกติของโครโมโซม หรือใช้ประโยชน์ในการจัดทำแผนที่ยีนบนโครโมโซม (Clerk and Wall, 1996)

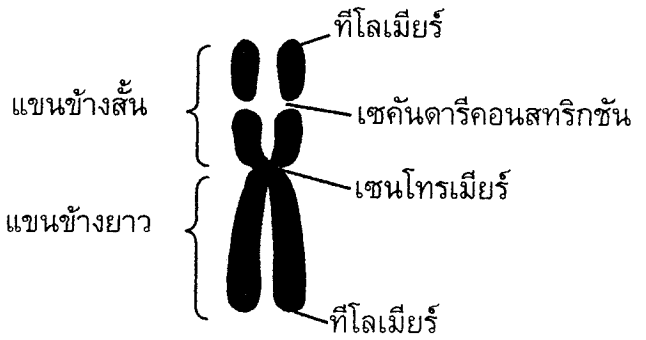
2.1 โครโมโซม

โครโมโซมเป็นองค์ประกอบทางพันธุกรรมของเซลล์ ในโปรคาริโอต (prokaryote) เช่น แบคทีเรีย โครโมโซมจะมีโครงสร้างที่ไม่สลับซับซ้อน มีเพียงดีเอ็นเอ (DNA) เป็นองค์ประกอบ ส่วนในยูคาริโอต (eukaryote) โครโมโซมจะอยู่ภายในนิวเคลียส เกิดจากการขดตัวของเส้นใยโครมาทิน (chromatin fiber) ซึ่งมีองค์ประกอบที่สำคัญคือ ดีเอ็นเอ และโปรตีน

การศึกษาโครโมโซม นิยมศึกษาโครโมโซมระยะเมทาเฟส (metaphase) ซึ่งเป็นระยะที่โครโมโซมมีการหดตัวมากที่สุด ทำให้สามารถมองเห็นขนาดและรูปร่างของโครโมโซมอย่างชัดเจน นอกจากนี้ยังสามารถนับจำนวนโครโมโซมได้อีกด้วย การศึกษาโครโมโซมในระยะเมทาเฟสนี้ จะนำภาพของโครโมโซมมาจัดเรียงลำดับจากขนาดใหญ่ที่สุดไปยังขนาดเล็กที่สุด และจัดคู่ตามรูปร่างของโครโมโซม ซึ่งเรียกว่า การจัดทำคาริโอไทป์ (karyotype) (Weaver, 1997) คาริโอไทป์ของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดจะมีลักษณะเฉพาะตัว ในสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันจะมีรูปแบบคาริโอไทป์เหมือนกัน มีจำนวนโครโมโซมเท่ากัน เช่น คน (*Homo sapiens sapiens*) มีจำนวนโครโมโซมทั้งหมด 46 แท่ง ในแมลงหวี่ (*Drosophila melanogaster*) มีจำนวนโครโมโซมทั้งหมด 8 แท่ง เป็นต้น ในสิ่งมีชีวิตพวกยูคาริโอต จะมี

โครโมโซม 2 ชุด เรียกว่า ดิพพลอยด์ (diploid) หรือ 2n ซึ่งโครโมโซมทั้ง 2 ชุดนี้ได้มาจากการรวมกันของเซลล์สืบพันธุ์จากพ่อ 1 ชุด และเซลล์สืบพันธุ์จากแม่ 1 ชุด ในแต่ละเซลล์สืบพันธุ์ที่มีจำนวนโครโมโซม 1 ชุด เรียกว่า แฮพพลอยด์ (haploid) หรือ n ในดิพพลอยด์นั้น โครโมโซมที่เป็นคู่กันเรียกว่า ฮอโมโลกัสโครโมโซม (homologous chromosomes) ซึ่งโครโมโซมที่เป็น ฮอโมโลกัสกันจะมีขนาดและรูปร่าง รวมทั้งการจัดเรียงตัวของยีนบนโครโมโซมเหมือนกันทุกประการ ส่วนโครโมโซมที่ไม่ได้เป็นคู่กันเรียกว่า นันฮอโมโลกัสโครโมโซม (nonhomologous chromosomes)

การจัดทำคาริโอไทป์ จะต้องทราบถึงส่วนต่างๆ ที่สำคัญ และรูปร่างของโครโมโซมก่อน ซึ่งโครโมโซมที่มองเห็นได้จากภายใต้กล้องจุลทรรศน์ มีส่วนประกอบที่สำคัญ คือ เซนโทรเมียร์ (centromere) ทีโลเมียร์ (telomere) และแขนของโครโมโซม นอกจากนี้ในบางโครโมโซมอาจพบลักษณะพิเศษ คือ เซคันดารีคอนสทริกชัน (secondary constriction) (ภาพที่ 1)

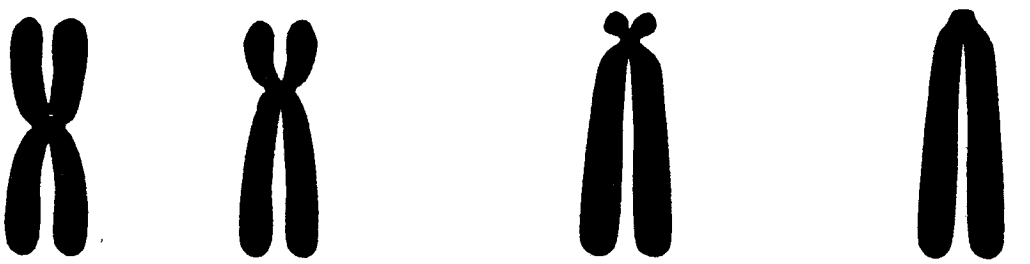


ภาพที่ 1 ส่วนประกอบของโครโมโซม

2.1.1 <u>เซนโทรเมียร์</u> จะเห็นเป็นรอยคอดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เป็นบริเวณที่มีความสำคัญขณะที่มีการแบ่งเซลล์ เนื่องจากเป็นบริเวณที่มีเส้นใยสปินเดิล (spindle fiber) มาจับเพื่อดึงแต่ละโครมาทิด (chromatid) ไปยังขั้วของเซลล์ ตำแหน่งของเซนโทรเมียร์จะช่วยในการบอกรูปร่างของโครโมโซม (ภาพที่ 2) คือ ถ้าเซนโทรเมียร์อยู่บริเวณกลางของโครโมโซม ทำให้แขนทั้งสองข้างของโครโมโซมยาวเท่ากัน จัดเป็นโครโมโซมเมทาเซนทริก (metacentric chromosome) ถ้าตำแหน่งของเซนโทรเมียร์อยู่ค่อนไปทางแขนข้างใดข้างหนึ่งของโครโมโซม ทำให้แขนของโครโมโซมยาวไม่เท่ากัน จัดเป็นโครโมโซมสับเมทาเซนทริก (submetacentric chromosome) ถ้าตำแหน่งของเซนโทรเมียร์ อยู่เกือบปลายสุดของโครโมโซม จัดเป็นโครโมโซมอะโครเซนทริก (acrocentric chromosome) หรือ

โครโมโซมสับทีโลเซนทริก (subtelocentric chromosome) และถ้าตำแหน่งของเซนโทรเมียร์อยู่บริเวณปลายสุดของโครโมโซม จัดเป็นโครโมโซมทีโลเซนทริก (telocentric chromosome) (Sambamurty, 1999)

2.1.2 ทีโลเมียร์ อยู่บริเวณปลายสุดของโครโมโซม ช่วยให้ส่วนปลายของโครโมโซมไม่ถูกทำลาย และช่วยให้โครโมโซมแต่ละแท่งไม่เชื่อมต่อกัน บริเวณทีโลเมียร์จะประกอบไปด้วยโมเลกุลของดีเอ็นเอที่มีลำดับไนโตรจีนัสเบสสั้นๆ เรียงต่อกันซ้ำๆ เป็นจำนวนมาก (Weaver, 1997)



โครโมโซมเมทาเซนทริก โครโมโซมสับเมทาเซนทริก โครโมโซมสับทีโลเซนทริก หรืออะโครเซนทริก โครโมโซมทีโลเซนทริก

ภาพที่ 2 รูปร่างของโครโมโซมแบบต่างๆ

2.1.3 แขนของโครโมโซม จะถูกแบ่งเป็นแขนข้างสั้น และแขนข้างยาวโดยเซนโทรเมียร์

2.1.4 เซคันดารีคอนสทริกชัน จะมองเห็นเป็นรอยคอดแห่งที่ 2 ซึ่งไม่ใช่เซนโทรเมียร์ จากภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เป็นบริเวณที่ตั้งของนิวคลีโอลัส (nucleolus) จึงอาจเรียกว่า นิวคลีโอลาร์ออร์แกไนเซอร์รีเจียน (nucleolar organizer rigions หรือ NOR)

ในการศึกษาเซลล์พันธุศาสตร์ จะจำแนกโครโมโซมตามคุณสมบัติในการติดสีได้เป็น 2 ส่วน คือ ยูโครมาทิน (euchromatin) ซึ่งเป็นบริเวณที่ติดสีจาง และเฮเทอโรโครมาทิน (heterochromatin) ซึ่งเป็นบริเวณที่ติดสีเข้ม ส่วนของเฮเทอโรโครมาทินสามารถแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ คอนสทิทิวทีฟ เฮเทอโรโครมาทิน (constitutive heterochromatin) เป็นบริเวณที่ไม่สามารถเปลี่ยนไปเป็นยูโครมาทิน และแฟคคัลเททีฟ เฮเทอโรโครมาทิน (facultative heterochromatin) เป็นบริเวณที่ยูโครมาทินเกิดการขดตัวกัน

แน่นจนกลายเป็นเฮเทอโรโครมาทิน จึงสามารถเปลี่ยนกลับไปเป็นยูโครมาทินได้ (Weaver, 1997)

2.2 การย้อมแถบสีโครโมโซม (Chromosome banding)

การศึกษาโครโมโซมของสิ่งมีชีวิตเริ่มแรกใช้เฉพาะการย้อมสีแบบธรรมดา (conventional staining) ซึ่งโครโมโซมจะติดสีเข้มทั้งแท่ง จึงสามารถศึกษาได้เพียงจำนวน ขนาด และรูปร่างของโครโมโซม ซึ่งในบางกรณีอาจมีปัญหาในการจัดคู่ของโครโมโซมเกิดขึ้น เนื่องจากโครโมโซมมีขนาดและรูปร่างใกล้เคียงกันมาก ต่อมาจึงได้มีการพัฒนาการย้อมแถบสีโครโมโซมแบบต่างๆ (chromosome banding technique) ขึ้น ช่วยให้อธิบายส่วนประกอบของโครโมโซม และจัดคู่ของโครโมโซมได้ถูกต้องยิ่งขึ้น นอกจากนี้รูปแบบของแถบสีโครโมโซม (banding pattern) ยังสามารถใช้อธิบายการเกิดมิวเทชันระดับโครโมโซม (chromosome mutation) และสามารถแสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระดับชนิด (species) ได้ (Clerk and Wall, 1996)

แถบสีโครโมโซม เป็นการใช้วิธีการย้อมสีแบบพิเศษ เพื่อให้เกิดรูปแบบของแถบสีเข้มและจางตามแนวขวางตลอดความยาวของโครโมโซม ซึ่งเกิดจากโครงสร้างของโครโมโซมที่แตกต่างกัน (Gosden, 1994) การย้อมแถบสีของโครโมโซมมีอยู่ด้วยกันหลายวิธี ขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ในการศึกษาว่าต้องการศึกษาองค์ประกอบใดของโครโมโซม ในที่นี้จะกล่าวเฉพาะวิธีการย้อมแถบสีที่ใช้ในงานวิจัยครั้งนี้

2.2.1 การย้อมแถบสีแบบจี (G-banding)

การย้อมแถบสีแบบจี คือการทำให้โครโมโซมติดสีเข้มและจางสลับกันไปตลอดความยาวของโครโมโซม (Sumner, 1990) ซึ่งบริเวณที่ติดสีจางจะเกิดการจำลองตัวเอง (replication) ก่อน บริเวณที่ติดสีเข้มจะเกิดการจำลองตัวเองหลัง (Clerk and Wall, 1996) และบริเวณที่ติดสีเข้มจะมีไนโตรจีนัสเบสชนิดอะดีนีนและไธมีนมาก (AT rich) ส่วนบริเวณที่ติดสีจางจะมีไนโตรจีนัสเบสชนิดกัวนีนและไซโตซีนมาก (GC rich) (Clerk and Wall, 1996; Sumner, 1990)

สำหรับวิธีการที่ทำให้เกิดแถบสีแบบจีนั้นมี 2 วิธีที่นิยมใช้ คือวิธี ASG (Acetic/Saline/Giemsa) และวิธีการของ Seabright (1971) สำหรับวิธี ASG มี 2 ขั้นตอนหลักคือ การใช้ fixative จะไปทำให้นิวคลีโอโซม (nucleosome) เสียสภาพ โดยทำให้โปรตีนฮิสโทนชนิด H1 เสียสภาพ จากนั้นอุ่นในสารละลาย 2X SSC ทำให้ดีเอ็นเอและ

โปรตีนฮิสโทนในนิวคลีโอโซมคอร์ (nucleosome core) จับตัวกันใหม่ ซึ่งดีเอ็นเอบริเวณที่มีไนโตรจีนัสเบสชนิดกัวนีนและไซโทซีนมาก จะจับตัวกับโปรตีนฮิสโทนแน่น ทำให้สีจิมซ่าไม่สามารถแทรกเข้าไประหว่างดีเอ็นเอและโปรตีนได้ โครโมโซมบริเวณนี้จึงติดสีจาง ส่วน ดีเอ็นเอบริเวณที่มีไนโตรจีนัสเบสชนิดอะดีนีนและไธมีนมาก จะจับตัวกับโปรตีนไม่แน่น ทำให้สีจิมซ่าสามารถแทรกเข้าไประหว่างดีเอ็นเอและโปรตีนได้ จึงติดสีเข้มของจิมซ่า สำหรับวิธีการของ Seabright จะใช้สารละลายทริปซิน (trypsin) ไปย่อยโปรตีนฮิสโทนชนิด H1 ทำให้เกิดการจัดเรียงตัวใหม่ระหว่างดีเอ็นเอกับโปรตีนฮิสโทนในนิวคลีโอโซมคอร์ ซึ่งบริเวณที่ดีเอ็นเอมีไนโตรจีนัสเบสชนิดกัวนีนและไซโทซีนมาก ก็จะจับตัวกับโปรตีนฮิสโทนแน่น ทำให้สีจิมซ่าไม่สามารถแทรกเข้าไประหว่างดีเอ็นเอและโปรตีนได้ จึงติดสีจาง ส่วนบริเวณที่ดีเอ็นเอมีไนโตรจีนัสเบสชนิดอะดีนีนและไธมีนมาก ก็จะจับตัวกับโปรตีนฮิสโทนไม่แน่น ทำให้สีจิมซ่าสามารถแทรกเข้าไประหว่างดีเอ็นเอและโปรตีนได้ จึงติดสีเข้มของจิมซ่า ในการย้อมแถบสีแบบจีทั้ง 2 วิธีนี้ให้ผลของแถบสีที่มีคุณภาพไม่แตกต่างกัน แต่โดยส่วนใหญ่นิยมใช้วิธีการของ Seabright มากกว่า เนื่องจากทำได้ง่ายและรวดเร็วกว่า (Sumner, 1990)

แถบสีแบบจี มีความสำคัญมากต่อการจัดจำแนกคู่ของโครโมโซม ซึ่งจะช่วยให้การจัดทำคาริโอไทป์ถูกต้องแม่นยำมากยิ่งขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีที่โครโมโซมมีขนาดและรูปร่างใกล้เคียงกันมาก และด้วยความสำคัญในการจำแนกโครโมโซม รวมทั้งจำแนกส่วนต่างๆ ของโครโมโซม จึงมีความสำคัญในการจัดทำแผนที่ยีนด้วย นอกจากนี้ยังสามารถใช้ตรวจสอบการเกิดมิวเทชันระดับโครโมโซม เช่น การเกิดทรานสโลเคชัน (translocation) หรือ อินเวอร์ชัน (inversion) เป็นต้น (Gosden, 1994)

2.2.2 การย้อมแถบสีแบบซี C-banding

แถบสีแบบซีจะย้อมติดสีเข้มบนโครโมโซมในบริเวณที่เป็นคอนสทิทิวทีฟ เฮเทอโรโครมาทิน ซึ่งเป็นบริเวณที่ดีเอ็นเอมีลำดับเบสซ้ำๆ มาเรียงต่อกันเป็นจำนวนมาก (highly repetitive sequence) และเป็นบริเวณที่ไม่มียีน (Clerk and Wall, 1996) โดยทั่วไปเราจะพบแถบสีเข้มบริเวณเซนโทรเมียร์ ทีโลเมียร์ และอาจพบบนแขนของโครโมโซมด้วย

สำหรับวิธีการทั่วไปที่นิยมใช้กันเป็นมาตรฐานในการย้อมสีแบบซี คือวิธี BSG (Barium hydroxide/Saline/Giemsa) เป็นวิธีการของ Sumner (1972) ซึ่งประกอบด้วย 3 ขั้นตอน โดยเริ่มจากการทำปฏิกิริยาด้วยไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.2 นอร์มอล (0.2 N HCl) จะทำให้เกิดดีเพียวรินเนชัน (depurination) คือการทำให้ไนโตรจีนัสเบสกลุ่มพิวรีนหลุดออกจากน้ำตาลดีออกซีไรโบสของสายดีเอ็นเอ โดยที่สายของดีเอ็นเอยังไม่ขาดออก

จากกัน จากนั้นก็ทำปฏิกิริยาด้วยสารละลายแบเรียมไฮดรอกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ (5 % barium hydroxide) จะไปทำให้ดีเอ็นเอบริเวณที่เกิดดีเพียวริเนชันหักออกเป็นท่อนสั้นๆ และในขั้นตอนสุดท้ายดีเอ็นเอท่อนสั้นๆ เหล่านี้จะถูกทำให้สลายไปโดยการอุ่นด้วยสารละลาย 2 X SSC ซึ่งดีเอ็นเอที่ถูกทำปฏิกิริยาด้วยกลไกของสารเคมีทั้ง 3 ขั้นตอนนี้จะไม่ติดสีของจิมซ่า และเนื่องจากบริเวณคอนสทิทิวทีฟ เฮเทอโรโครมาทิน เป็นบริเวณที่ดีเอ็นเอมีการขดตัวกันแน่น และมีโปรตีนอยู่มาก ช่วยป้องกันการเกิดดีเพียวริเนชันทำให้ดีเอ็นเอบริเวณนี้ไม่ถูกทำให้สลายไปจึงติดสีเข้มของจิมซ่า

การย้อมแถบสีแบบซี มีความสำคัญในการจัดจำแนกคู่ของโครโมโซม โดยเฉพาะในพืชและแมลง ซึ่งไม่สามารถย้อมแถบสีด้วยวิธีการอื่นได้ (Sumner, 1990) นอกจากนี้การกระจายตัวของแถบสีแบบซีจะผันแปรจากสิ่งมีชีวิตหนึ่งไปยังสิ่งมีชีวิตหนึ่ง จึงสามารถใช้ศึกษาวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตได้ (Clerk and Wall, 1996)

2.2.3 การย้อมเพื่อตรวจสอบตำแหน่งนิวคลีโอลาร์ออร์แกไนเซอร์

การย้อมเพื่อตรวจสอบตำแหน่งของนิวคลีโอลาร์ออร์แกไนเซอร์ (NOR) บนโครโมโซม มีอยู่ด้วยกันหลายวิธี ซึ่ง Ag-NOR staining เป็นวิธีการหนึ่งที่นิยมใช้ โดยการย้อมด้วยซิลเวอร์ (Ag) (Sumner, 1990)

นิวคลีโอลาร์ออร์แกไนเซอร์ คือส่วนประกอบของโครโมโซม เป็นที่ตั้งของนิวคลีโอลัส (nucleolus) ซึ่งประกอบไปด้วยยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างไรโบโซม (ribosome) ที่เรียกว่าไรโบโซมอลดีเอ็นเอ (ribosomal DNA) ในระยะอินเทอร์เฟส (interphase) จะสร้างไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ (ribosomal RNA) จำนวนมากเก็บไว้ในนิวคลีโอลัส เมื่อเกิดการแบ่งเซลล์แบบไมโทซีส (mitosis) นิวคลีโอลัสก็จะเริ่มสลายตัวในระยะโปรเฟส (prophase) เมื่อถึงระยะเมทาเฟส ไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ ซึ่งเป็นองค์ประกอบอยู่ในนิวคลีโอลัสยังสลายตัวไปไม่หมดสิ้น เมื่อย้อมด้วยซิลเวอร์ไนเตรต (silver nitrate) ไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอจะติดสีเข้ม ทำให้ทราบว่าตำแหน่งของนิวคลีโอลาร์ออร์แกไนเซอร์ อยู่บนโครโมโซมใด

2.2.4 การย้อมเพื่อตรวจสอบรูปแบบการจำลองตัวเองโดยใช้ BrdU (BrdU-replication banding)

การย้อมเพื่อตรวจสอบรูปแบบการจำลองตัวเองโดยใช้ BrdU เป็นการแสดงลำดับเวลาในการจำลองตัวเองของดีเอ็นเอส่วนต่างๆ บนโครโมโซม ซึ่งมีรูปแบบของแถบสี 2 รูปแบบหลัก คือ early replication banding และ late replication banding (Sumner, 1990;

Clerk and Wall, 1996) ทั้งสองรูปแบบของแถบสีจะเกิดขึ้นในลักษณะตรงกันข้าม กล่าวคือ ในรูปแบบ early replication banding นั้น ยูโครมาทินจะติดสีเข้มส่วนเฮเทอโรโครมาทินจะติดสีจาง ในทางตรงกันข้าม รูปแบบของ late replication banding นั้น ยูโครมาทินจะติดสีจางส่วนเฮเทอโรโครมาทินจะติดสีเข้ม

วิธีการที่ทำให้เกิดรูปแบบการจำลองตัวเองโดยใช้ BrdU (5-bromodeoxyuridine) มีอยู่ 2 ขั้นตอนหลัก คือ การแทนที่ BrdU เข้าไปในโครโมโซมและขั้นตอนการย้อมสีโครโมโซม ในขั้นตอนการแทนที่ BrdU เข้าไปในโครโมโซมทำได้โดยการเติม BrdU ลงในอาหารที่กำลังเลี้ยงเซลล์ เนื่องจาก BrdU เป็นไธมิดีนอะนาลอก (thymidine analouge) (Clerk and Wall, 1996) ดังนั้น BrdU จึงสามารถเข้าไปแทนที่ไธมิดีนในขณะที่โครโมโซมเกิดการจำลองตัวเองในระยะ S (systhesis phase) จากนั้นในขั้นตอนต่อมาก็ทำการย้อมสีโครโมโซม ซึ่งอาจย้อมด้วยสารเรืองแสงหรือย้อมด้วยสีจิมซ่า โดยการย้อมด้วยสารเรืองแสงนั้นจะต้องตรวจดูโครโมโซมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่ใช้แสงอัลตราไวโอเลต (UV) ซึ่งแสงนี้จะไปทำให้โครโมโซมบริเวณที่ถูกแทนที่ด้วย BrdU สลายตัวไป โครโมโซมบริเวณนี้จึงไม่เกิดการเรืองแสง สำหรับสารเรืองแสงที่นิยมใช้กันมีอยู่หลายชนิด เช่น acridine orange DAPI และ Hoechst 33258 เป็นต้น ส่วนการย้อมด้วยสีจิมซ่า โครโมโซมจะถูกฉายด้วยแสงอัลตราไวโอเลตหรืออุ่นในสารละลายฟอสเฟต pH 8.0 ที่ 87 – 89 องศาเซลเซียส เพื่อให้โครโมโซมบริเวณที่ถูกแทนที่ด้วย BrdU สลายตัวไป เมื่อย้อมด้วยสีจิมซ่าโครโมโซมบริเวณนี้ก็จะติดสีจาง ในการย้อมโครโมโซมทั้งสองแบบนั้น การเกิดเป็นรูปแบบของแถบสีขึ้นอยู่กับลำดับเวลาในการให้ BrdU เข้าไปแทนที่โครโมโซมในระยะ S โดยถ้าให้ BrdU เฉพาะในช่วงแรกของระยะ S ซึ่งเป็นช่วงที่ยูโครมาทินเกิดการจำลองตัวเอง จะทำให้ BrdU เข้าไปแทนที่ในบริเวณยูโครมาทิน เมื่อย้อมสีโครโมโซม บริเวณยูโครมาทินจะติดสีจาง จึงได้รูปแบบของแถบสีเป็น late replication banding แต่ถ้าให้ BrdU เฉพาะในช่วงปลายของระยะ S ซึ่งเป็นช่วงที่เฮเทอโรโครมาทินเกิดการจำลองตัวเอง จะทำให้ BrdU เข้าไปแทนที่ในบริเวณเฮเทอโรโครมาทิน เมื่อย้อมสีโครโมโซม บริเวณเฮเทอโรโครมาทินจะติดสีจาง จึงได้รูปแบบของแถบสีเป็น early replication banding (Sumner, 1990; Schmid and Klett, 1994; Clerk and Wall, 1996)

2.3 โครโมโซมเพศ

สิ่งมีชีวิตโดยทั่วไปมีโครโมโซมแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ โครโมโซมร่างกาย (autosome) และโครโมโซมเพศ (sex chromosome หรือ gonosome) โดยโครโมโซมร่างกายเป็นโครโมโซมที่มีเหมือนกันในทั้งสองเพศของสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกัน แต่ละคู่ของ

โครโมโซมจะมีขนาดและรูปร่างเหมือนกันเรียกว่า ฮอโมมอร์ฟิกโครโมโซม (homomorphic chromosome) ส่วนโครโมโซมเพศ จะมีความแตกต่างกันในแต่ละเพศของสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกัน และจะเกี่ยวข้องกับการกำหนดเพศ (Burns and Bottino, 1989) ซึ่งคู่ของโครโมโซมที่มีขนาดและรูปร่างต่างกันเรียกว่า เฮเทอโรมอร์ฟิกโครโมโซม (heteromorphic chromosome) (Solari, 1994)

โครโมโซมเพศที่พบในสิ่งมีชีวิตทั่วๆ ไปมีอยู่ด้วยกัน 3 ระบบ คือ

2.3.1 ระบบ XO

ในระบบนี้เพศเมียจะมีโครโมโซมเพศ 2 แท่ง เป็น XX เมื่อมีการแบ่งเซลล์แบบไมโอซีส (meiosis) เพื่อสร้างไข่ จะให้ไข่ที่มีโครโมโซมเพศเป็น X ทั้งหมด ส่วนเพศผู้จะมีโครโมโซมเพศเพียง 1 แท่ง เป็น XO เมื่อมีการแบ่งเซลล์แบบไมโอซีสเพื่อสร้างสเปิร์ม จะให้สเปิร์มที่มีโครโมโซมเพศเป็น X ครึ่งหนึ่ง และสเปิร์มอีกครึ่งหนึ่งไม่มีโครโมโซมเพศ ระบบการกำหนดเพศแบบนี้พบในแมลงในอันดับ Orthoptera และ Hemiptera (Burns and Bottino,1989)

2.3.2 ระบบ XY

ในระบบนี้เพศเมียจะมีโครโมโซมเพศ 2 แท่ง เป็น XX เมื่อมีการแบ่งเซลล์แบบไมโอซีส เพื่อสร้างไข่ จะให้ไข่ที่มีโครโมโซมเพศเป็น X ทั้งหมด ส่วนเพศผู้จะมีโครโมโซมเพศ 2 แท่ง แต่มีรูปร่างต่างกันจึงเรียกเป็น XY เมื่อมีการแบ่งเซลล์แบบไมโอซีส เพื่อสร้างสเปิร์ม จะให้สเปิร์มที่มีโครโมโซมเพศเป็น X ครึ่งหนึ่ง และสเปิร์มที่มีโครโมโซมเพศเป็น Y อีกครึ่งหนึ่ง ระบบการกำหนดเพศแบบนี้พบในคน และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Burns and Bottino, 1989)

2.3.3 ระบบ ZW

ระบบนี้มีลักษณะตรงกันข้ามกับระบบ XY คือ เพศผู้มีโครโมโซมเพศเป็นแบบ XX ส่วนเพศเมียมีโครโมโซมเพศเป็นแบบ XY แต่เพื่อไม่ให้เกิดความสับสนกับระบบ XY จึงใช้ ZZ และ ZW แทนตามลำดับ ดังนั้น เมื่อมีการแบ่งเซลล์แบบไมโอซีสในเพศเมียเพื่อสร้างไข่ก็จะได้ไข่ครึ่งหนึ่งมีโครโมโซมเพศเป็น Z และไข่อีกครึ่งหนึ่งมีโครโมโซมเพศเป็น W ส่วน

เพศผู้ จะให้สเปิร์มที่มีโครโมโซมเพศเป็น Z ทั้งหมด ระบบการกำหนดเพศแบบนี้พบในพวกนก ผีเสื้อ ผีเสื้อกลางคืน และพบในปลาบางชนิด (Burns and Bottino, 1989)

ในการกำหนดเพศมีศัพท์ 2 คำที่ใช้ในการเรียกรูปแบบของเพศ คือ เฮเทอโรแกมีทิกเซก (heterogametic sex) และฮอโมแกมีทิกเซก (homogametic sex) สำหรับเฮเทอโรแกมีทิกเซก จะใช้เรียกเพศที่สามารถสร้างเซลล์สืบพันธุ์ได้ 2 แบบ (Burns and Bottino, 1989) นั่นคือ เพศผู้ในระบบ XO และ XY และเพศเมียในระบบ ZW เป็นเฮเทอโรแกมีทิกเซก ส่วนฮอโมแกมีทิกเซก ใช้เรียกเพศที่สามารถสร้างเซลล์สืบพันธุ์ได้เพียงแบบเดียว (Burns and Bottino,1989) นั่นคือ เพศเมียในระบบ XO และ XY และเพศผู้ในระบบ ZW เป็น ฮอโมแกมีทิกเซก

2.4 โครโมโซมเพศในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก

จากการศึกษาเซลล์พันธุศาสตร์ในช่วงแรกของศตวรรษที่ 19 เป็นที่ยอมรับกันว่าในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกไม่มีโครโมโซมเพศ (Solari, 1994) ต่อมาพบว่าสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกบางชนิดมีโครโมโซมเพศที่มีรูปร่างแตกต่างกันอย่างชัดเจน และเมื่อมีการพัฒนาเทคนิคการย้อมแถบสีโครโมโซมขึ้น จึงได้นำมาประยุกต์ใช้ในการศึกษาโครโมโซมของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก ทำให้ได้ข้อมูลเพิ่มเติมเกี่ยวกับโครโมโซมเพศในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก โดยพบว่าโครโมโซมเพศในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกบางชนิดมีรูปร่างเหมือนกันแต่มีรูปแบบของแถบสีแตกต่างกัน ทำให้เชื่อว่าโครโมโซมเพศของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกอยู่ในขั้นเริ่มต้นของการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง คือมียีนที่เกี่ยวข้องกับการกำหนดเพศอยู่บนโครโมโซม แต่รูปร่างของโครโมโซมยังคงเหมือนกัน (Schmid et al., 1991; Solari, 1994) ดังนั้นการศึกษาโครโมโซมเพศจึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจ เนื่องจากในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกส่วนใหญ่ยังไม่สามารถแยกความแตกต่างของโครโมโซมเพศได้ และการศึกษาโครโมโซมเพศในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกจะช่วยให้ทราบลำดับวิวัฒนาการของโครโมโซมเพศได้

สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกแบ่งออกเป็น 3 อันดับ ซึ่งมีรายงานของรูปแบบโครโมโซมเพศดังนี้ (Schmid et al.,1991; Solari, 1994)

อันดับ Gymnophyona ได้แก่ พวกเขียดงู มีการศึกษาน้อยมากและไม่มีรายงานของโครโมโซมเพศ

อันดับ Caudata ได้แก่ พวกซาลามานเดอร์ มีรายงานรูปแบบของโครโมโซมเพศดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 รูปแบบโครโมโซมเพศในกลุ่มซาลามานเดอร์ (Schmid et al., 1991)

Species	รูปแบบโครโมโซมเพศ	*ความแตกต่างของโครโมโซมเพศ
Ambystoma laterale	ZW	รูปแบบของแถบสีแบบซีแตกต่างกัน
Aneides ferreus	ZW	รูปร่างของโครโมโซมแตกต่างกัน
Chiropterotriton dimidiatus	ZW	Pericentric inversion
Dendrotriton bromeliacea	XY	โครโมโซม X มีขนาดใหญ่กว่าโครโมโซม Y
D. cuchumatanus	XY	โครโมโซม X มีขนาดใหญ่กว่าโครโมโซม Y
D. rabbi	XY	โครโมโซม X มีขนาดใหญ่กว่าโครโมโซม Y
Hydromantes ambrosii	XY	รูปร่างของโครโมโซม และรูปแบบของแถบสีแบบซีแตกต่างกัน
H. flavus	XY	รูปร่างของโครโมโซม และรูปแบบของแถบสีแบบซีแตกต่างกัน
H. imperalis	XY	รูปร่างของโครโมโซม และรูปแบบของแถบสีแบบซีแตกต่างกัน
H. intalicus	XY	รูปร่างของโครโมโซม และรูปแบบของแถบสีแบบซีแตกต่างกัน
Necturus alabamensis	XY	โครโมโซม X มีขนาดใหญ่กว่าโครโมโซม Y
Ne. beyeri	XY	โครโมโซม X มีขนาดใหญ่กว่าโครโมโซม Y
Ne. lewisi	XY	โครโมโซม X มีขนาดใหญ่กว่าโครโมโซม Y
Ne. maculosus	XY	โครโมโซม X มีขนาดใหญ่กว่าโครโมโซม Y
Ne. punctatus	XY	โครโมโซม X มีขนาดใหญ่กว่าโครโมโซม Y

ตารางที่ 1 รูปแบบโครโมโซมเพศในกลุ่มซาลามานเดอร์ (Schmid et al., 1991) (ต่อ)

Species	รูปแบบโครโมโซมเพศ	ความแตกต่างของโครโมโซมเพศ
Nototriton picadoi	XY	โครโมโซม X มีขนาดใหญ่กว่าโครโมโซม Y
No. veraepacis	XY	โครโมโซม X มีขนาดใหญ่กว่าโครโมโซม Y
No. richardi	XY	โครโมโซม X มีขนาดใหญ่กว่าโครโมโซม Y
Oedipina poelzi	XY	โครโมโซม X มีขนาดใหญ่กว่าโครโมโซม Y
O. parvipes	XY	โครโมโซม X มีขนาดใหญ่กว่าโครโมโซม Y
O. uniformis	XY	โครโมโซม X มีขนาดใหญ่กว่าโครโมโซม Y
O. pseudouniformis	XY	โครโมโซม X มีขนาดใหญ่กว่าโครโมโซม Y
O. altura	XY	โครโมโซม X มีขนาดใหญ่กว่าโครโมโซม Y
O. ignea	XY	โครโมโซม X มีขนาดใหญ่กว่าโครโมโซม Y
Thorius pennatulus	XY	โครโมโซม X มีขนาดใหญ่กว่าโครโมโซม Y
Th. dubitus	XY	โครโมโซม X มีขนาดใหญ่กว่าโครโมโซม Y
Triturus alpestris	XY	รูปแบบของแถบสีแบบซีแตกต่างกัน
Tr. cristatus	XY	รูปแบบของแถบสีแบบซีแตกต่างกัน
Tr. helveticus	XY	รูปแบบของแถบสีแบบซีแตกต่างกัน
Tr. italicus	XY	รูปแบบของแถบสีแบบซีแตกต่างกัน
Tr. marmoratus	XY	รูปแบบของแถบสีแบบซีแตกต่างกัน
Tr. vulgaris	XY	รูปแบบของแถบสีแบบซีแตกต่างกัน

อันดับ Anura ได้แก่ พวกกลุ่มกบ เขียด อึ่งอ่าง คางคก ปาด มีรายงานรูปแบบของโครโมโซมเพศดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 รูปแบบโครโมโซมเพศในกลุ่มกบ เขียด อึ่งอ่าง คางคก ปาด

Species	รูปแบบโครโมโซมเพศ	ความแตกต่างของโครโมโซมเพศ	อ้างอิง
Buergeria buergeri	ZW	รูปแบบของแถบสีแบบซีและ NOR แตกต่างกัน	Schmid et al., 1993
Centrolenella antisthenesi	XY	รูปร่างของโครโมโซมและรูปแบบของแถบสีแบบซีแตกต่างกัน	Schmid, Steinlein and Feichtinger, 1989
Crinia bilingua	ZW	โครโมโซม W มีขนาดใหญ่กว่าโครโมโซม Z	Mahony, 1991
Eleutherodactylus maussi	XXA^{Y}	โครโมโซมเพศมีรูปแบบสลับซับซ้อน	Schmid, Steinlein and Feichtinger, 1992
Eupsophus roseus	XY	รูปแบบของแถบสีแบบซีแตกต่างกัน	Iturra, 1989
E. migueli	XY	รูปร่างของโครโมโซมแตกต่างกัน	Iturra, 1989
Gastrotheca ovifera	XY	โครโมโซม X มีขนาดใหญ่กว่าโครโมโซม Y	Schmid et al., 1988
G. pseustes	XY_b, XY_a	รูปแบบของแถบสีแบบซีแตกต่างกัน	Schmid et al., 1990
G. riobambae	XY	โครโมโซม Y มีขนาดใหญ่กว่าโครโมโซม X	Schmid et al., 1983
G. walkeri	XY	โครโมโซม X มีขนาดใหญ่กว่าโครโมโซม Y	Schmid et al., 1988
Leiopelma hochstetteri	WO	Supernumerary chromosome	Green, 1988
L. hamiltoni	ZW	รูปแบบของแถบสีแบบซีแตกต่างกัน	Schmid et al., 1991; Solari, 1994

ตารางที่ 2 รูปแบบโครโมโซมเพศในกลุ่มกบ เขียด อึ่งอ่าง คางคก ปาด

Species	รูปแบบโครโมโซมเพศ	ความแตกต่างของโครโมโซมเพศ	อ้างอิง
Pyxicephalus adspersus	ZW	โครโมโซม Z มีขนาดใหญ่กว่าโครโมโซม W	Schmid, 1980
Rana esculenta	XY	รูปแบบการจำลองตัวเองแตกต่างกัน	Schempp and Schmid, 1981
R. narina	XY	โครโมโซม Y มีขนาดใหญ่กว่าโครโมโซม X	Kuramoto, 1980
R. rugosa	ZW,XY	รูปแบบของแถบสีแบบซีและรูปแบบการจำลองตัวเองแตกต่างกัน	Nishioka et al., 1994
Tomopterna delalandi	ZW	รูปแบบของแถบสีแบบซีแตกต่างกัน	Schmid et al., 1991

จากตารางที่รายงานรูปแบบของโครโมโซมเพศ จะเห็นได้ว่า โครโมโซมเพศในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกไม่ได้เป็นรูปแบบเดียวกันทั้งหมด และความแตกต่างของโครโมโซมเพศในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกไม่ได้มีรูปร่างที่แตกต่างกันอย่างชัดเจนดังเช่นในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและสัตว์ปีก ซึ่งสามารถจำแนกรูปแบบความแตกต่างของโครโมโซมเพศในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกได้ดังนี้ (Solari, 1994)

2.4.1 <u>โครโมโซมเพศมีรูปร่างไม่แตกต่างกัน</u>

ในกลุ่มนี้พบมากที่สุดในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก เป็นกลุ่มที่ยังไม่ทราบแน่ชัดว่าโครโมโซมคู่ใดเป็นโครโมโซมเพศ เช่น

Schmid (1978a) ศึกษาโครโมโซมในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในวงศ์ Bufonidae และ Hylidea จำนวน 22 ชนิด พบว่า 15 ชนิด ได้แก่ *Bufo bufo, B. calamita, B. parvus, B. viridis, B. americanus, B. boreas, B. compactilis, B. fowleri, B. punctatus, B. terrestris, B. valliceps, B. arenarum, B. marinus, B. mauritanicus.* และ *Pedostibes hosii* มีจำนวนโครโมโซม 2n = 22 ส่วนในอีก 3 ชนิด ได้แก่ *B. garmani,*

B. poweri และ *B. regularis* มีจำนวนโครโมโซม 2n = 20 และในอีก 4 ชนิด ได้แก่ *Hyla arborea, H. cinerea, H. septentrionalis* และ *Pseudacris ornata* มีจำนวนโครโมโซม 2n = 24 ซึ่งทั้ง 22 ชนิดนี้ไม่สามารถแยกความแตกต่างของโครโมโซมเพศได้

Schmid (1978b) ศึกษาโครโมโซมในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก 12 ชนิด ได้แก่ *Rana sphenocephala, R. palustris, R. catesbeiana, R. ridibunda, R. erythrea, R. esculenta, Pyxicephalus delalandii* และ *Chiromantis xerampelina* พบว่ามีจำนวนโครโมโซม 2n = 26 ส่วนใน *R. temporaria* มีจำนวนโครโมโซม 2n = 26 และมีโครโมโซมซูเปอร์นิวเมอรารี (supernumerary chromosome) ใน *Kaloula pulchra* มีจำนวนโครโมโซม 2n = 28 ใน *Leptopelis bocagei* มีจำนวนโครโมโซม 2n = 22 และใน *Kassina wealii* มีจำนวนโครโมโซม 2n = 24 ซึ่งทั้ง 12 ชนิดนี้ไม่สามารถแยกความแตกต่างของโครโมโซมเพศได้

Kuramoto (1980) ได้ศึกษาคาริโอไทป์ของกบ *Rana amurensis coreana, R. plancyi choseinica, R. latouchii, Ooeidozyga laevis* พบว่ามีโครโมโซมจำนวน 2n = 26 และ *Kaloula picta* มีจำนวนโครโมโซม 2n = 28 แต่ไม่สามารถแยกความแตกต่างของโครโมโซมเพศได้

Nishioka, Okumoto และ Ryuzaki (1987) ศึกษาโครโมโซมของกบ *Rana nigromaculata, R. brevipoda, R. plancyi chosinica, R. plancyi fukienensis, R. lessonae* และ *R. pipines* พบว่าทั้ง 6 ชนิดมีจำนวนโครโมโซม 2n = 26 เท่ากันและไม่สามารถแยกความแตกต่างของโครโมโซมเพศได้

Nishioka และคณะ (1987) ศึกษาโครโมโซมของกบ *Rana japonica, R. tsushimensis, R. amurensis coreana, R. temporaria* และ *R. sylvatica* พบว่ามีจำนวนโครโมโซม 2n = 26 ทั้ง 5 ชนิด และศึกษาโครโมโซมของกบ *R. ornativentris, R. chensinensis* และ *R. dybowskii* พบว่ามีจำนวนโครโมโซม 2n = 24 ทั้ง 3 ชนิด ซึ่งทั้งหมด 8 ชนิดไม่สามารถแยกความแตกต่างของโครโมโซมเพศได้

Schmid และคณะ (1988) ได้ศึกษาคาริโอไทป์ของกบ *Gastrotheca fissipes* มีจำนวนโครโมโซม 2n = 26 และ *Flectonotus pygmaeus* มีจำนวนโครโมโซม 2n = 28 ทั้งสองชนิดนี้ไม่สามารถแยกความแตกต่างของโครโมโซมเพศได้

Melo, Recoo-Pimentel และ Giarettc (1995) ได้ศึกษาคาริโอไทป์ของกบ *Megaelosia massarti* มีจำนวนโครโมโซม 2n = 28 ไม่สามารถแยกความแตกต่างของโครโมโซมเพศได้

Ota และ Matsui (1995) ได้ศึกษาคาริโอไทป์ของกบ *Platymantis pelewensis* มีจำนวนโครโมโซม 2n = 22 ไม่สามารถแยกความแตกต่างของโครโมโซมเพศได้

แต่อย่างไรก็ตาม อาจพบความแตกต่างของโครโมโซมเพศในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกกลุ่มนี้ได้ หากนำเทคนิคการย้อมแถบสีโครโมโซมที่เหมาะสมมาใช้ในการศึกษา

2.4.2 โครโมโซมเพศมีขนาดและรูปร่างต่างกัน

ในกลุ่มนี้โครโมโซมเพศจะมีขนาด รูปร่างแตกต่างกัน คือโครโมโซมแท่งหนึ่งมีขนาดเล็กกว่าอีกแท่งหนึ่ง หรือโครโมโซมเพศทั้งสองแท่งมีขนาดเท่ากันแต่มีรูปร่างต่างกัน เช่น

Kuramoto (1980) ศึกษาโครโมโซมในกบ *Rana narina* มีจำนวนโครโมโซม 2n = 26 พบว่าโครโมโซมคู่ที่ 8 เป็นโครโมโซมเพศชนิด XY โดยโครโมโซม Y มีขนาดใหญ่กว่าโครโมโซม X

Schmid (1980) ศึกษาโครโมโซมในกบ *Pyxicephalus adspersus* มีจำนวนโครโมโซม 2n = 26 พบว่าโครโมโซมคู่ที่ 8 เป็นโครโมโซมเพศชนิด ZW โดยโครโมโซม W มีขนาดเล็กกว่าโครโมโซม Z

Schmid และคณะ (1983) ศึกษาโครโมโซมในกบ *Gastrotheca riobambae* มีจำนวนโครโมโซม 2n = 26 พบว่าโครโมโซมคู่ที่ 4 เป็นโครโมโซมเพศชนิด XY โดยโครโมโซม Y มีขนาดใหญ่กว่าโครโมโซม X

Nardi และคณะ (1986) ได้ศึกษาโครโมโซมของซาลามานเดอร์ *Hydromantes intalicus, H. ambrosii, H. imperialis, H. flavus* และ *H. specie nova* พบว่ามีจำนวนโครโมโซม 2n = 28 โครโมโซมคู่ที่ 14 เป็นโครโมโซมเพศชนิด XY โดยโครโมโซม X มีรูปร่างเป็น สับทีโลเซนทริก ส่วนโครโมโซม Y มีรูปร่างเป็นสับเมทาเซนทริก

Schmid และคณะ (1988) ศึกษาโครโมโซมในกบ *Gastrotheca walkeri* และ *G. ovifera* มีจำนวนโครโมโซม 2n = 26 พบว่าโครโมโซมคู่ที่ 2 และคู่ที่ 1 เป็นโครโมโซมเพศชนิด XY ตามลำดับ โดยใน *G. walkeri* โครโมโซม X มีรูปร่างเป็นเมทาเซนทริก โครโมโซม Y มีรูปร่างเป็นสับเมทาเซนทริก และมีขนาดเล็กกว่าโครโมโซม X และใน *G. ovifera* นั้น โครโมโซม Y ก็มีขนาดเล็กกว่าโครโมโซม X เช่นกัน

Schmid, Steinlein และ Feichtinger (1989) ศึกษาโครโมโซมในกบ *Centrolenella antisthenesi* มีจำนวนโครโมโซม 2n = 20 พบว่าโครโมโซมคู่ที่ 6 เป็นโครโมโซมเพศชนิด XY โดยโครโมโซม X และ Y มีความยาวเท่ากันแต่มีอัตราส่วนของแขน

โครโมโซม (arm ratio = แขนข้างยาว/แขนข้างสั้น) ต่างกัน คือ โครโมโซม Y มีแขนข้างสั้นสั้นกว่าโครโมโซม X

Iturra (1989) ศึกษาโครโมโซมของกบ *Eupsophus migueli* มีจำนวนโครโมโซม 2n = 30 พบว่าโครโมโซมคู่ที่ 14 เป็นโครโมโซมเพศชนิด XY โดยโครโมโซม X และ Y มีขนาดเท่ากัน แต่โครโมโซม X มีรูปร่างเป็นทีโลเซนทริก ส่วนโครโมโซม Y มีรูปร่างเป็น เมทาเซนทริก

Mahony (1991) ศึกษาคาริโอไทป์ของกบ *Crinia bilingua* มีจำนวนโครโมโซม 2n = 24 พบว่าโครโมโซมคู่ที่ 12 เป็นโครโมโซมเพศชนิด ZW โดยโครโมโซม W มีรูปร่างเป็นสับเมทาเซนทริก ส่วนโครโมโซม Z มีรูปร่างเป็นสับทีโลเซนทริก และมีขนาดเล็กกว่าโครโมโซม W

2.4.3 <u>โครโมโซมเพศมีรูปแบบของแถบสีแตกต่างกัน</u>

ในกลุ่มนี้จะใช้การย้อมแถบสีโครโมโซม เช่น รูปแบบการจำลองตัวเอง (replication banding pattern) แถบสีแบบซี (C-banding) เป็นต้น เพื่อตรวจสอบโครโมโซมเพศ ซึ่งโครโมโซมเพศจะมีรูปแบบของแถบสีแตกต่างกัน ดังตัวอย่างเช่น

Schmid, Olert และ Klett (1979) ศึกษาโครโมโซมในซาลามานเดอร์ *Triturus alpestris alpestris* และ *T. helveticus helveticus* พบว่ามีจำนวนโครโมโซม 2n = 24 เมื่อทำการย้อมแถบสีแบบซี พบว่าโครโมโซมคู่ที่ 4 ใน *T. alpestris alpestris* และโครโมโซมคู่ที่ 5 ใน *T. helveticus helveticus* เป็นโครโมโซมเพศชนิด XY โดยพบว่าบริเวณส่วนปลายแขนข้างยาวของโครโมโซม Y มีบริเวณของคอนสทิทิวทีฟ เฮเทอโรโครมาทิน

Schempp และ Schmid (1981) ทำการย้อมแถบสีแบบต่างๆ ในกบ *Rana esculenta* พบว่ามีจำนวนโครโมโซม 2n = 26 ไม่สามารถแยกความแตกต่างของโครโมโซมเพศจากการย้อมแถบสีโครโมโซมแบบต่างๆ ยกเว้นการย้อมเพื่อตรวจสอบรูปแบบของการจำลองตัวเองโดยใช้ BrdU (BrdU-replication banding pattern) จึงพบว่าโครโมโซมคู่ที่ 4 เป็นโครโมโซมเพศชนิด XY โดยช่วงกลางของโครโมโซม Y จะมีการจำลองตัวช้า ทำให้พบว่าโครโมโซม Y มีขนาดยาวกว่าโครโมโซม X

Iturra (1989) ศึกษาโครโมโซมของกบ *Eupsophus roseus* มีจำนวนโครโมโซม 2n = 30 ไม่สามารถแยกความแตกต่างของโครโมโซมเพศจากการย้อมสีแบบธรรมดา แต่เมื่อย้อมแถบสีแบบซี พบว่าโครโมโซมคู่ที่ 14 เป็นโครโมโซมเพศชนิด XY โดยทั้งโครโมโซม X และ Y มีรูปร่างเป็นเมทาเซนทริกแต่ในโครโมโซม Y ไม่มีคอนสทิทิวทีฟ

เฮเทอโรโครมาทินบริเวณเซนโทรเมียร์ ส่วนในโครโมโซม X มีคอนสทิทิวทีฟเฮเทอโรโครมาทินบริเวณเซนโทรเมียร์

Schmid และคณะ (1993) ศึกษาคาริโอไทป์ของกบ *Buergeria buergeria* มีจำนวนโครโมโซม 2n = 26 พบโครโมโซมเพศจากการย้อมสีแบบซีและ Ag-NOR staining โดยโครโมโซมคู่ที่ 7 เป็นโครโมโซมเพศชนิด ZW ซึ่งทั้งโครโมโซม Z และ W มีรูปร่างเป็นสับทีโลเซนทริก แต่พบว่าโครโมโซม W จะมีนิวคลีโอลาร์ออร์แกไนเซอร์รีเจียน (nucleolar organizer region : NOR) และบริเวณนี้เป็นคอนสทิทิวทีฟ เฮเทอโรโครมาทิน ซึ่งทั้งสองลักษณะนี้ไม่พบในโครโมโซม Z

2.4.4 โครโมโซมเพศชนิดซูเปอร์นิวเมอรารี

รูปแบบโครโมโซมเพศนี้เป็นลักษณะพิเศษที่พบเฉพาะในกบ *Leiopelma hochstetteri* (Green, 1988) ซึ่งจากการศึกษาคาริโอไทป์ พบว่ามีโครโมโซมปกติ (regular cromosome) จำนวน 22 แท่ง และมีโครโมโซมซูเปอร์นิวเมอรารี (supernumerary chromosome) 0 – 26 แท่ง แตกต่างกันไปในแต่ละประชากรและในแต่ละเพศ โดยเพศเมียจะมีโครโมโซมซูเปอร์นิวเมอรารีมากกว่าเพศผู้เสมอ *L. hochstetteri* มีโครโมโซมเพศเป็นชนิด WO คือ เพศเมียมีโครโมโซมเพศ 1 แท่ง เรียกว่าโครโมโซม W แต่เพศผู้ไม่มีโครโมโซมเพศ และโครโมโซม W เป็นโครโมโซมซูเปอร์นิวเมอรารีที่มีขนาดใหญ่ มองเห็นรูปร่างได้ชัดกว่า โครโมโซมซูเปอร์นิวเมอรารีอื่น ๆ

2.4.5 โครโมโซมเพศแบบสลับซับซ้อน

รูปแบบโครโมโซมนี้พบในกบ *Eleutherodactylus maussi* (Schmid, Steinlein and Feichtinger, 1992) ซึ่งจากการศึกษาโครโมโซม พบว่าเพศเมียทั้งหมดมีจำนวนโครโมโซม 2n = 36 มีโครโมโซมเพศเป็นชนิด XXAA ส่วนเพศผู้เกือบทั้งหมดมีจำนวนโครโมโซม 2n = 35 มีโครโมโซมเพศเป็น XXA^{Y} โดยโครโมโซม A^{Y} เกิดขึ้นจากเซนทริกฟิวชัน (centric fusion) ระหว่างโครโมโซม Y และโครโมโซมร่างกาย ซึ่งในการศึกษานี้ยังพบว่า มีเพศผู้ 1 ตัว มีจำนวนโครโมโซม 2n = 36 เหมือนกับในเพศเมีย มีโครโมโซมเพศเป็นชนิด XYAA เนื่องจาก โครโมโซม Y ไม่เกิดเซนทริกฟิวชันกับโครโมโซมร่างกาย เป็นลักษณะของบรรพบุรุษของเพศผู้ที่มีโครโมโซมเพศเป็นชนิด XXA^{Y}

2.4.6 โครโมโซมเพศหลายรูปแบบ

รูปแบบโครโมโซมเพศนี้จะพบว่าในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกบางชนิดจะมีโครโมโซมเพศมากกว่า 1 รูปแบบ ซึ่งมีตัวอย่างในการศึกษาดังนี้

Schmid และคณะ (1990) ได้ศึกษาโครโมโซมในกบ *Gastrotheca pseustes* พบว่ามีจำนวนโครโมโซม 2n = 26 และจากการศึกษาด้วยการย้อมแถบสีแบบซีพบว่า โครโมโซมคู่ที่ 5 เป็นโครโมโซมเพศชนิด XY ซึ่งโครโมโซม Y มี 2 รูปแบบ เป็น Y_A และ Y_B โดยมีความแตกต่างกันที่บริเวณแขนข้างยาวของ Y_B จะมีส่วนของคอนสทิทิวทีฟ เฮเทอโรโครมาทินยื่นยาวออกมา ส่วนบริเวณแขนข้างยาวของ Y_A ไม่มีส่วนของคอนสทิทิวทีฟ เฮเทอโรโครมาทิน ซึ่งเป็นรูปแบบเดียวกับโครโมโซม X

Nishioka และคณะ (1994) ศึกษาโครโมโซมในกบ *Rana rugosa* มีจำนวนโครโมโซม 2n = 26 เมื่อตรวจสอบด้วยการย้อมแถบสีแบบซี และรูปแบบการจำลองตัวเอง พบว่ามีโครโมโซมคู่ที่ 7 เป็นโครโมโซมเพศ โดยในแต่ละประชากรมีรูปแบบของโครโมโซมเพศต่างกัน สามารถแบ่งโครโมโซมเพศออกเป็น 4 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 มีโครโมโซมเพศเป็นชนิด ZW กลุ่มที่ 2 มีโครโมโซมเพศเป็นชนิด XY กลุ่มที่ 3 ไม่สามารถแยกความแตกต่างของโครโมโซมเพศได้ และไม่ทราบว่าระบบการกำหนดเพศเป็นแบบใด ส่วนกลุ่มที่ 4 ไม่สามารถแยกความแตกต่างของโครโมโซมเพศได้ แต่จากการตรวจสอบโดยการกลับเพศ (sex reversed) พบว่ามีระบบการกำหนดเพศเป็นชนิด XY

จากรายงานเกี่ยวกับโครโมโซมเพศของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกพบว่าสามารถตรวจสอบได้โดยใช้ความรู้ทางด้านเซลล์พันธุศาสตร์ และจะสามารถทำให้เข้าใจถึงวิวัฒนาการของโครโมโซมเพศในสัตว์มีกระดูกสันหลัง (Schmid et al, 1988) ซึ่งนักวิทยาศาสตร์เชื่อว่าสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกนั้น มีโครโมโซมเพศที่อยู่ในขั้นระหว่างกึ่งกลางของกระบวนการวิวัฒนาการ และมีสมมุติฐานเกี่ยวกับวิวัฒนาการของโครโมโซมเพศที่เสนอโดย Ohno (อ้างโดย Schmid et al, 1991) กล่าวว่า โครโมโซมเพศจะเริ่มต้นจากโครโมโซมที่มีขนาดและรูปร่างเหมือนกัน จากนั้นก็จะมีกลไกป้องกันการเกิดครอสซิงโอเวอร์ (crossing over) ของโครโมโซมคู่นี้บางส่วนหรือทั้งแท่งของโครโมโซมแล้วจึงมีการสะสม รีพิทีทีฟ ดีเอ็นเอ (repetitive DNA) ซึ่งเป็นองค์ประกอบของเฮเทอโรโครมาทินบนโครโมโซม Y หรือ W จากนั้นจึงเกิดอินเวอร์ชันบนโครโมโซม Y หรือ W และในขั้นสุดท้ายก็จะส่งผลให้โครโมโซม Y และ W มีขนาดเล็กลง เกิดเป็นโครโมโซมเพศที่มีขนาดและรูปร่างแตกต่างกันอย่างชัดเจน

2.5 การศึกษาโครโมโซมของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในประเทศไทย

การศึกษาเซลล์พันธุศาสตร์ของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในประเทศไทย พบรายงานดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 รายงานจำนวนโครโมโซมของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในประเทศไทย

ชนิด	จำนวนโครโมโซม (2n)	อ้างอิง
กบจุก (*Rana pileata*)	26	ถาวร สุภาพรม และคณะ, 2537
กบนา (*Rana rugulosa*)	26	สุดสนอง ผาตินาวิน และผุสตี ปริยานนท์, 2531
กบอกหนาม (*Rana fasciculispina*)	26	ถาวร สุภาพรม และคณะ, 2543
เขียดจิก (*R. erythraea*)	26	ถาวร สุภาพรม, นงเยาว์ ฉาไธสง และนิยะดา ห่อนาค, 2534
เขียดเหลือง (*R. laterlis*)	26	ถาวร สุภาพรม, อริยาภรณ์ พงษ์รัตน์ และอุไรวรรณ นิลเพ็ชร, 2535
เขียดอีโม่ (*R. limnocharis*)	26	นงลักษณ์ นาคเกษม (2518) และ ถาวร สุภาพรม, นงเยาว์ ฉาไธสง และนิยะดา ห่อนาค (2534
เขียดหลังปุ่ม (*Phrynoglossus martensi*)	26	ถาวร สุภาพรม และคณะ, 2543
คางคกบ้าน (*Bufo melanostictus*)	22	นงลักษณ์ นาคเกษม, 2518; ถาวร สุภาพรม และประภาพร กัลยาประสิทธิ์, 2533
ปาดบ้าน (*Rhacophorus leucomystay*)	26	ถาวร สุภาพรม, วาริณี อรุณมงคลผล และแก้ว อุดมศิริชาคร, 2535
อึ่งกรายเอวจุด (*Kalophrynus pleurostigma*)	26	ถาวร สุภาพรม และประจักษ์ จันทร์ตรี, 2542
อึ่งขาคำ (*Microhyla pulchra*)	24	ถาวร สุภาพรม, วาริณี พละสาร และปทุมทิพย์ บุญจูง, 2537

ตารางที่ 3 รายงานจำนวนโครโมโซมของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในประเทศไทย(ต่อ)

ชนิด	จำนวน โครโมโซม (2n)	อ้างอิง
อึ่งปากขวด (*Glypholossus molossus*)	26	ถาวร สุภาพรม, วาริณี อรุณมงคลผล และแก้ว อุดมศิริชาคร, 2535
อึ่งแว่น (*Calluella guttulata*)	26	ถาวร สุภาพรม, อริยาภรณ์ พงษ์รัตน์ และอุไรวรรณ นิลเพ็ชร, 2535
อึ่งอ่าง (*Microhyla ornata*)	24	นงลักษณ์ นาคเกษม, 2518
อึ่งอ่างก้นขีด (*Kaloula mediolineata*)	28	ถาวร สุภาพรม, วาริณี พละสาร และ ปทุมทิพย์ บุญจูง, 2537; Warawut Chulalaksananukul, Achara Suwannakerd and Putsatee Pariyanonth, 1998
อึ่งอ่างบ้าน (*Kaloula pulchra*)	28	ถาวร สุภาพรม และประภาพร กัลยาประสิทธิ์, 2533

จะเห็นได้ว่าการศึกษาโครโมโซมในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกของประเทศไทยนั้นมีอยู่น้อยมาก และยังไม่มีการนำเทคนิคการย้อมแถบสีโครโมโซมมาใช้ในการศึกษา รวมทั้งยังไม่พบรายงานเกี่ยวกับการศึกษาโครโมโซมเพศของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก ดังนั้นจึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจที่จะนำเทคนิคการย้อมแถบสีโครโมโซมมาใช้กับสัตว์ในกลุ่มนี้ เพื่อตรวจสอบว่าโครโมโซมเพศของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกแต่ละชนิดในประเทศไทยอยู่ในขั้นใดของวิวัฒนาการ

ในการศึกษาครั้งนี้ สนใจศึกษาโครโมโซมเพศในกบนา (*Rana rugulosa*) เนื่องจากเป็นกบพื้นเมืองของไทยที่มีการเพาะเลี้ยงเพื่อนำมาเป็นอาหาร และยังไม่มีรายงานเกี่ยวกับโครโมโซมเพศ

2.6 วัตถุประสงค์

เพื่อตรวจสอบระบบการกำหนดเพศด้วยโครโมโซมของกบนา ด้วยเทคนิคการย้อมแถบสีโครโมโซม

บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการศึกษา

3.1 ตัวอย่างสัตว์ทดลอง

1. กบนา (*Rana rugulosa*) เพศผู้ตัวเต็มวัย 12 ตัว
2. กบนา (*Rana rugulosa*) เพศเมียตัวเต็มวัย 12 ตัว

3.2 สารเคมี

1. RPMI 1640 (Seromed)
2. Pennicillin-Streptromycin
3. fetal bovine serum
4. phytohemaglutinin (PHA) M form (Gibco)
5. potassium chloride (KCl)
6. colchicine
7. acetic acid glacial
8. methanol
9. ether
10. ethanol
11. potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)
12. disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4)
13. giemsa
14. 0.25 % trypsin (Gibco)
15. hydrochloric acid (HCl)
16. barium hydroxide octahydrate ($Ba(OH)_2 8H_2O$)
17. sodium chloride (NaCl)
18. trisodium citrate
19. silver nitrate ($AgNO_3$)
20. gelatin
21. formic acid

22. bromodeoxyuridine (BrdU)
23. sodium hydrogen carbonate ($NaHCO_3$)
24. sodium hydroxide (NaOH)

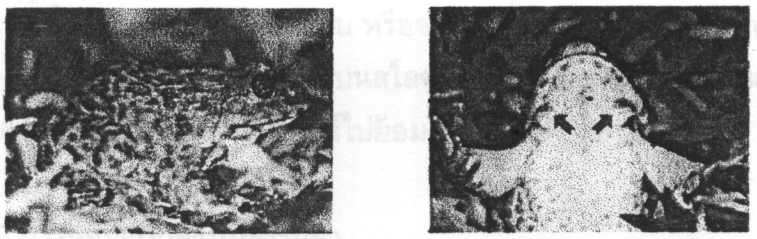
3.3 อุปกรณ์

1. centrifuge
2. laminar flow
3. hot plate
4. water bath
5. กล้องจุลทรรศน์
6. เครื่องมือผ่าตัด
7. เข็มเจาะเลือด
8. หลอดหยด (pasture pipette)
9. ขวดเลี้ยงเลือด
10. หลอด centrifuge
11. micropipette
12. JAR สำหรับย้อมสไลด์
13. สไลด์และแผ่นแก้วปิดสไลด์
14. sterile membrane filter 0.45 μm

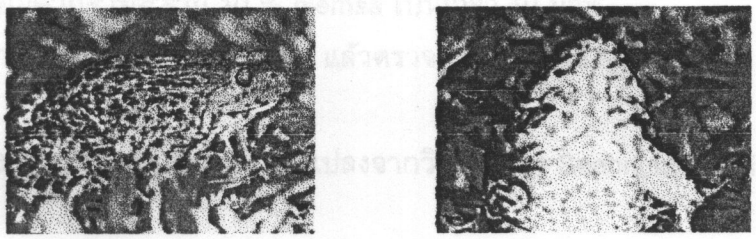
3.4 วิธีดำเนินการศึกษา

กบนาที่นำมาศึกษาได้มาจากศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยทรายอันเนื่องมาจากพระราชดำริ

ในการแยกความแตกต่างของกบนาเพศผู้และเพศเมีย ดูจากถุงเสียง (vocal sac) สีดำใต้คาง ซึ่งในกบนาเพศผู้จะมีถุงเสียง 2 ข้าง (ภาพที่ 3) ส่วนเพศเมียไม่มี (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 3 กบนาเพศผู้ มีถุงเสียง 2 ข้างใต้คาง (ศรชี้)



ภาพที่ 4 กบนาเพศเมีย

3.4.1 การเตรียมโครโมโซมจากการเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาว ดัดแปลงจากวิธีการของ Nishioka และคณะ (1994)

1. เติมเลือดกบ 0.1 - 0.2 มิลลิลิตร ลงในอาหารสำหรับเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาว 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

2. เลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิ 26 – 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 73 – 75 ชั่วโมง

3. เติมสารละลาย colchicine 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร แล้วเลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิ 26 – 28 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาที

4. นำสารละลายไปปั่นที่ 1300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วดูดเอาสารละลายส่วนใสทิ้ง

5. เติมสารละลาย 0.075 M KCl ปริมาณ 5 มิลลิลิตร แล้วตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที

6. นำสารละลายไปปั่นที่ 1300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วดูดเอาสารละลายส่วนใสทิ้ง

7. เติมสารละลาย fixative ที่เตรียมใหม่และแช่เย็นทีละหยดและเขย่าตลอดเวลาจนกระทั่งครบ 5 มิลลิลิตร

8. นำสารละลายไปปั่นที่ 1300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วดูดเอาสารละลายส่วนใสทิ้ง

9. ทำซ้ำในข้อ 7 และ 8 อีก 4 รอบ หรือจนกระทั่งได้ตะกอนเซลล์สีขาว

10. หยดสารละลายเซลล์ที่ได้ลงบนสไลด์ ด้วยความสูงประมาณ 30 เซนติเมตร เพื่อให้โครโมโซมกระจายตัว แล้วนำสไลด์ไปย้อมแถบสีแบบต่างๆ ต่อไป

3.4.2 การย้อมแถบสีแบบธรรมดา

ใช้สไลด์ที่หยดเซลล์ไว้แล้วเป็นเวลา 1 – 3 วัน

1. ย้อมด้วยสารละลาย 10 % giemsa เป็นเวลา 10 นาที

2. ล้างออกด้วยน้ำ ทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3.4.3 การย้อมแถบสีแบบจี ดัดแปลงจากวิธีการของ Seabright (1971)

ใช้สไลด์ที่หยดเซลล์ไว้แล้วเป็นเวลา 10 – 12 วัน

1. แช่สไลด์ในสารละลาย 0.025 % trypsin ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 – 60 วินาที

2. ล้างด้วย sorensen phosphate buffer

3. ย้อมด้วยสารละลาย 10 % giemsa เป็นเวลา 10 นาที

4. ล้างออกด้วยน้ำ ทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3.4.4 การย้อมแถบสีแบบซี ดัดแปลงจากวิธีการของ Sumner (1972)

ใช้สไลด์ที่หยดเซลล์ไว้แล้วเป็นเวลา 1 - 7 วัน

1. แช่สไลด์ลงในสารละลาย 0.2 N HCl ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 40 - 60 นาที

2. ล้างด้วยน้ำกลั่น

3. แช่สไลด์ลงในสารละลาย 5 % $Ba(OH)_2$ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 – 10 นาที

4. ล้างออกด้วยน้ำกลั่น

5. แช่สไลด์ลงในสารละลาย 2 X SSC ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 - 60 นาที

6. ล้างออกด้วยน้ำกลั่น

7. ย้อมด้วยสารละลาย 10 % giemsa เป็นเวลา 60 นาที

8. ล้างออกด้วยน้ำ ทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3.4.5 การย้อมเพื่อตรวจสอบตำแหน่งนิวคลีโอลาร์ออร์แกไนเซอร์ด้วยวิธี Ag-NOR staining ดัดแปลงจากวิธีการของ Hus (1981 อ้างโดย Green, 1988)

ใช้สไลด์ที่หยดเซลล์ไว้แล้วเป็นเวลา 1 – 3 วัน

1. ผสมสารละลาย colloidal developer 20 ไมโครลิตร และสารละลาย silver nitrate 40 ไมโครลิตร เข้าด้วยกันแล้วหยดลงบนสไลด์และปิดด้วยแผ่นแก้วปิดสไลด์

2. นำสไลด์ไปวางบน hot plate 70 องศาเซลเซียส ในที่มืดเป็นเวลา 45 – 60 วินาที หรือจนกระทั่งสไลด์เปลี่ยนเป็นสีเหลืองทอง

3. ล้างด้วยน้ำกลั่น

4. ย้อมด้วยสารละลาย 10 % giemsa เป็นเวลา 10 นาที

5. ล้างออกด้วยน้ำ ทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3.4.6 การเตรียมโครโมโซมจากการเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวเพื่อการย้อมเพื่อตรวจสอบรูปแบบการจำลองตัวเองโดยใช้ BrdU ดัดแปลงจากวิธีการของ Takayama, Taniguchi และ Iwashita (1981 อ้างโดย Nishioka et al., 1994)

1. เติมเลือดกบ 0.1 - 0.2 มิลลิลิตร ลงในอาหารสำหรับเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาว 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

2. เลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิ 26 – 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 67 - 69 ชั่วโมง

3. เติมสารละลาย 3 x 10^{-3} M bromodeoxyuridine (BrdU) ปริมาณ 1 มิลลิลิตร แล้วเลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิ 26 – 28 องศาเซลเซียสในที่มืด เป็นเวลา 3 - 7 ชั่วโมง

4. เติมสารละลาย colchicine 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร แล้วเลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิ 26 – 28 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาที

5. นำสารละลายไปปั่นที่ 1300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วดูดเอาสารละลายส่วนใสทิ้ง

6. เติมสารละลาย 0.075 M KCl ปริมาณ 5 มิลลิลิตร แล้วตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที

7. นำสารละลายไปปั่นที่ 1300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วดูดเอาสารละลายส่วนใสทิ้ง

8. เติมสารละลาย fixative ที่เตรียมใหม่และแช่เย็นทีละหยดและเขย่าตลอดเวลาจนกระทั่งครบ 5 มิลลิลิตร

9. นำสารละลายไปปั่นที่ 1300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วดูดเอาสารละลายส่วนใสทิ้ง

10. ทำซ้ำในข้อ 8 และ 9 อีก 4 รอบ หรือจนกระทั่งได้ตะกอนเซลล์สีขาว

11. หยดสารละลายเซลล์ที่ได้ลงบนสไลด์ ด้วยความสูงประมาณ 30 เซนติเมตร เพื่อให้โครโมโซมกระจายตัว ทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 – 3 วัน

12. นำสไลด์ไปอุ่นในสารละลาย sorensen phosphate buffer ที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

13. ย้อมด้วยสารละลาย 10 % giemsa เป็นเวลา 10 นาที

14. ล้างออกด้วยน้ำ ทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3.4.7 การวิเคราะห์โครโมโซม

ในการย้อมแถบสีแบบต่างๆ เมื่อตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แล้ว เลือกเซลล์ที่มีการกระจายตัวของโครโมโซมดี ทำการถ่ายภาพด้วยฟิล์มขาว-ดำ Kodak TMax100 แล้วอัดขยายภาพเพื่อนำมาจัดทำคาริโอไทป์

ในการจัดทำคาริโอไทป์ของโครโมโซมที่ได้จากการย้อมแถบสีแบบธรรมดาทำโดยวัดความยาวแขนข้างสั้น (Ls) และแขนข้างยาว (Ll) ของโครโมโซมจากภาพถ่าย แล้วนำมาคำนวณค่า relative length (RL) และ numerical value of centromere (NVC) ตามวิธีการของ Nishioka, Okumoto และ Ryuzaki (1987) ดังนี้

$$NVC = \frac{\text{ความยาวแขนข้างสั้นของโครโมโซม (Ls)}}{\text{ความยาวของโครโมโซมแต่ละแท่ง (LT)}} \times 100$$

$$RL = \frac{\text{ความยาวของโครโมโซมแต่ละแท่ง (LT=Ls+Ll)}}{\text{ความยาวของโครโมโซมทั้งหมด } (\Sigma LT)} \times 100$$

ค่า RL จะช่วยในการจัดคู่ของโครโมโซม โดยโครโมโซมที่เป็นคู่กันจะมีค่า RL เท่ากันหรือใกล้เคียงกันมาก ส่วนค่า NVC ช่วยในการบอกรูปร่างของโครโมโซมตามวิธีการของ Nishioka , Okumoto และ Ryuzaki (1987) ดังนี้

NVC	รูปร่างของโครโมโซม
50.0 – 37.5	โครโมโซมเมทาเซนทริก
37.4 – 25.0	โครโมโซมสับเมทาเซนทริก
24.9 – 12.5	โครโมโซมสับทีโลเซนทริก
12.4 – 0	โครโมโซมทีโลเซนทริก

และจากค่าความยาวของโครโมโซม นำมาจัดจำแนกขนาดของโครโมโซมตามวิธีการของ Turpin และLejeune (1965, อ้างโดย กันยารัตน์ ไชยสุต, 2532) ดังนี้

$$A = \frac{\text{ความยาวของโครโมโซมคู่ที่ยาวที่สุด + ความยาวของโครโมโซมคู่ที่สั้นที่สุด}}{2}$$

$$B = \frac{\text{ความยาวของโครโมโซมคู่ที่ยาวที่สุด}}{2}$$

โครโมโซมขนาดใหญ่ (large: L) มีขนาดใหญ่กว่าค่า A
โครโมโซมขนาดกลาง (medium: M) มีขนาดอยู่ระหว่างค่า A และค่า B
โครโมโซมขนาดเล็ก (small: S) มีขนาดเล็กกว่าค่า B

หลังจากคำนวณค่าต่างๆ แล้วจัดเรียงคาริโอไทป์โดยเรียงลำดับโครโมโซมจากขนาดใหญ่ที่สุดไปยังขนาดเล็กที่สุด รูปแบบการจัดเรียงคาริโอไทป์ของโครโมโซมจากการย้อมสีแบบธรรมดาที่ได้จะใช้เป็นรูปแบบในการจัดเรียงโครโมโซมที่ได้จากย้อมสีโครโมโซมแบบอื่นๆ

บทที่ 4

ผลการศึกษา

4.1 การย้อมสีแบบธรรมดา

การย้อมสีแบบธรรมดาได้ผลจากโครโมโซมระยะเมทาเฟสจำนวน 118 เซลล์ โดย 45 เซลล์ได้จากเพศเมีย 4 ตัว และอีก 73 เซลล์ได้จากเพศผู้ 6 ตัว ซึ่งพบว่า กบนามีโครโมโซมจำนวน 13 คู่ (2n = 26) มีค่า RL และ NVC เฉลี่ยดังตารางที่ 4 และสามารถจัดเป็นคาริโอไทป์ได้ดังภาพที่ 5 และ 6 โครโมโซมทั้ง 13 คู่ ประกอบด้วยโครโมโซมขนาดใหญ่ 5 คู่ โดยคู่ที่ 1, 2, 3 และ 5 มีรูปร่างเป็นโครโมโซมเมทาเซนทริก ส่วนคู่ที่ 4 มีรูปร่างเป็นโครโมโซมสับเมทาเซนทริก และโครโมโซมขนาดเล็กอีก 8 คู่ โดยคู่ที่ 6, 7, 10 และ 13 มีรูปร่างเป็นโครโมโซมเมทาเซนทริก และคู่ที่ 8, 9, 11 และ 12 มีรูปร่างเป็นโครโมโซมสับเมทาเซนทริก และยังพบเซคันดารีคอนสทริกชันบนแขนข้างยาวของโครโมโซมคู่ที่ 8 ซึ่งโครโมโซมทั้ง 13 คู่สามารถเขียนเป็นอิดิโอแกรม (idiogram) ได้ดังภาพที่ 15 ซึ่งจากการย้อมสีแบบธรรมดาพบว่าโครโมโซมทั้ง 13 คู่เป็นฮอโมมอร์ฟิกโครโมโซม จึงยังไม่สามารถบอกได้ว่าโครโมโซมคู่ใดเป็นโครโมโซมเพศ

4.2 การย้อมแถบสีแบบจี

การย้อมแถบสีแบบจีได้ผลจาก 39 เซลล์ โดย 11 เซลล์ได้จากเพศเมีย 2 ตัว และอีก 28 เซลล์ได้จากเพศผู้ 2 ตัว รูปแบบของแถบสีแบบจีของกบนาเพศเมียและเพศผู้ จัดเป็นคาริโอไทป์ได้ดังภาพที่ 7 และ 8 ตามลำดับ สามารถเขียนเป็นอิดิโอแกรมดังภาพที่ 16 ซึ่งรูปแบบของแถบสีแบบจีในเพศเมียและเพศผู้ไม่แตกต่างกันจึงไม่สามารถบอกได้ว่าโครโมโซมคู่ใดเป็นโครโมโซมเพศ

4.3 การย้อมแถบสีแบบซี

การย้อมแถบสีแบบซีได้ผลจาก 25 เซลล์ โดย 10 เซลล์ได้จากเพศเมีย 1 ตัว และอีก 15 เซลล์ได้จากเพศผู้ 2 ตัว รูปแบบของแถบสีแบบซีของกบนาเพศเมียและเพศผู้ จัดเป็นคาริโอไทป์ดังภาพที่ 9 และ 10 ตามลำดับ และสามารถเขียนเป็นอิดิโอแกรมดังภาพที่

17 ซึ่งพบว่ามีเฮเทอโรโครมาทินบริเวณเซนโทรเมียร์ของโครโมโซมทั้ง 13 คู่ และพบเฮเทอโรโครมาทินบริเวณทีโลเมียร์ของโครโมโซมเกือบทุกคู่ แต่ยังไม่พบว่ามีโครโมโซมคู่ใดในเพศเมียหรือเพศผู้มีรูปแบบของแถบสีแตกต่างกัน นั่นคือไม่สามารถบอกได้ว่าโครโมโซมคู่ใดเป็นโครโมโซมเพศ

4.4 การย้อมเพื่อตรวจสอบตำแหน่งนิวคลีโอลาร์ออร์แกไนเซอร์ ด้วยวิธี Ag-NOR staining

การย้อมเพื่อตรวจสอบตำแหน่งนิวคลีโอลาร์ออร์แกไนเซอร์ ด้วยวิธี Ag-NOR staining ได้ผลจาก 47 เซลล์ โดย 28 เซลล์ได้จากเพศเมีย 2 ตัว และอีก 19 เซลล์ได้จากเพศผู้ 3 ตัว ซึ่งพบว่า โครโมโซมคู่ที่ 8 ติดสีเข้มบนแขนข้างยาวบริเวณที่เป็นเซคันดารีคอนสทริกชันทั้ง 2 แท่ง เหมือนกันทั้งในเพศเมียและเพศผู้ ดังภาพที่ 11 และ 12 ซึ่งสามารถเขียนเป็นอิดิโอแกรมได้ดังภาพที่ 18 ดังนั้นจากการย้อมแถบสีแบบนี้ไม่สามารถบอกได้ว่า โครโมโซมคู่ใดเป็นโครโมโซมเพศ

4.5 การย้อมเพื่อตรวจสอบรูปแบบการจำลองตัวเองโดยใช้ BrdU

การย้อมเพื่อตรวจสอบรูปแบบการจำลองตัวเองโดยใช้ BrdU ได้ผลจาก 14 เซลล์ โดย 5 เซลล์ได้จากเพศเมีย 2 ตัว และอีก 9 เซลล์จากเพศผู้ 2 ตัว รูปแบบการย้อมเพื่อตรวจสอบรูปแบบการจำลองตัวเองโดยใช้ BrdU ของกบนาเพศเมียและเพศผู้ จัดเป็นคาริโอไทป์ดังภาพที่ 13 และ 14 ตามลำดับ สามารถเขียนเป็นอิดิโอแกรมดังภาพที่ 19 ซึ่งพบว่าโครโมโซมแต่ละคู่มีรูปแบบของแถบสีเหมือนกันทั้งในเพศเมียและเพศผู้ จึงไม่สามารถบอกได้ว่า โครโมโซมคู่ใดเป็นโครโมโซมเพศ

ตารางที่ 4 แสดงค่า RL, NVC ขนาดและรูปร่างของโครโมโซมกบนา

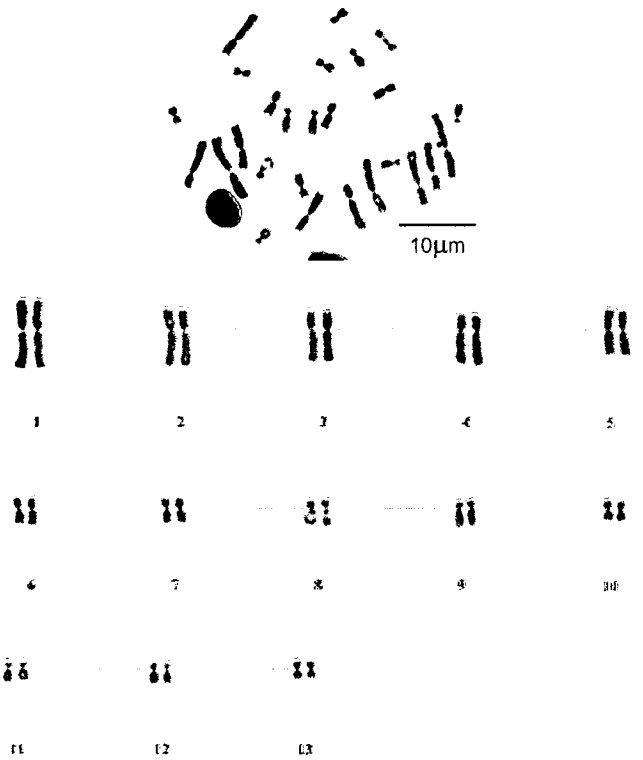
คู่ที่	RL ± SD	NVC ± SD	ขนาดและรูปร่าง
1	8.02 ± 0.68	44.72 ± 0.56	L^{m}
2	6.49 ± 0.63	39.15 ± 0.97	L^{m}
3	5.75 ± 0.46	38.31 ± 1.12	L^{m}
4	5.76 ± 0.57	32.05 ± 1.32	L^{sm}
5	5.21 ± 0.51.	44.01 ± 0.88	L^{m}
6	3.08 ± 0.33	43.90 ± 2.12	S^{m}
7	2.87 ± 0.30	43.94 ± 1.68	S^{m}
8	2.63 ± 0.40	36.43 ± 1.83	S^{sm}
9	2.85 ± 0.30	28.92 ± 1.01	S^{sm}
10	2.40 ± 0.30	47.87 ± 1.74	S^{m}
11	2.36 ± 0.30	33.72 ± 0.99	S^{sm}
12	2.22 ± 0.31	33.92 ± 1.11	S^{sm}
13	2.03 ± 0.29	48.15 ± 1.12	S^{m}

L^{m} หมายถึง โครโมโซมขนาดใหญ่ มีรูปร่างเป็นเมทาเซนทริก

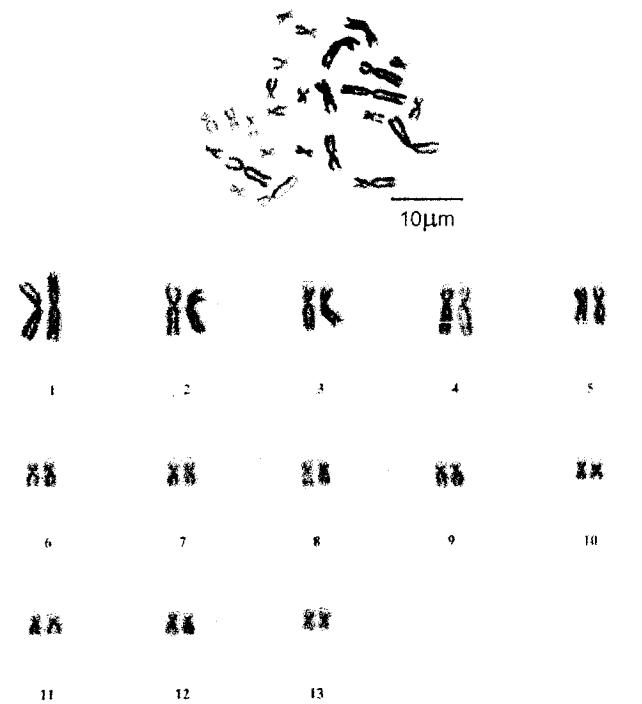
L^{sm} หมายถึง โครโมโซมขนาดใหญ่ มีรูปร่างเป็นสับเมทาเซนทริก

S^{m} หมายถึง โครโมโซมขนาดเล็ก มีรูปร่างเป็นเมทาเซนทริก

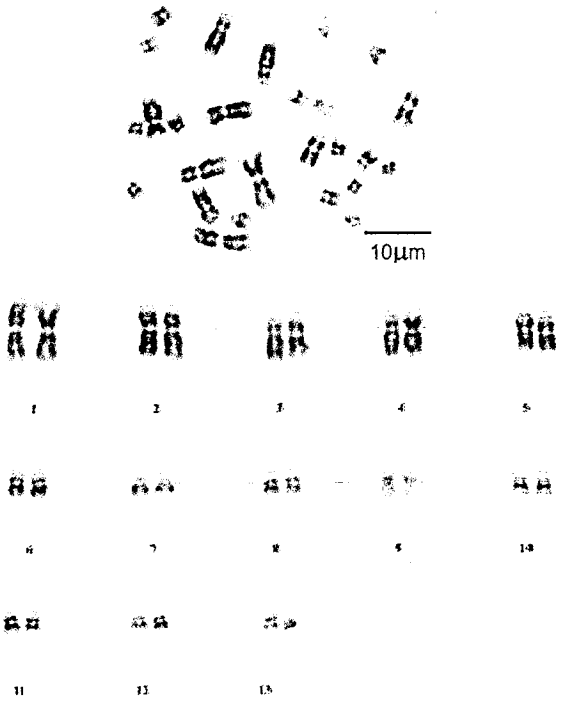
S^{sm} หมายถึง โครโมโซมขนาดเล็ก มีรูปร่างเป็นสับเมทาเซนทริก



ภาพที่ 5 โครโมโซมระยะเมทาเฟสและคาริโอไทป์ของกบนาเพศเมีย

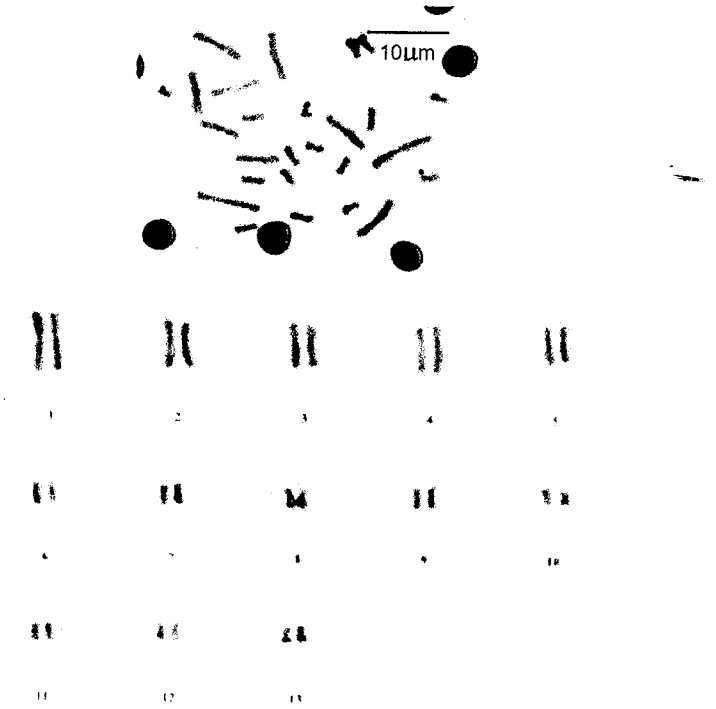


ภาพที่ 6 โครโมโซมระยะเมทาเฟสและคาริโอไทป์ของกบนาเพศผู้

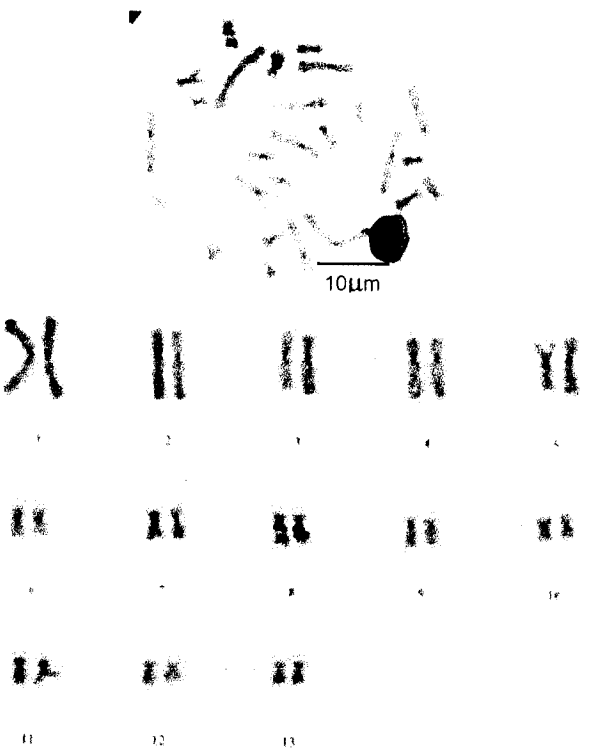


ภาพที่ 7 โครโมโซมระยะเมทาเฟสและคาริโอไทป์
จากการย้อมแถบสีแบบจีของกบนาเพศเมีย

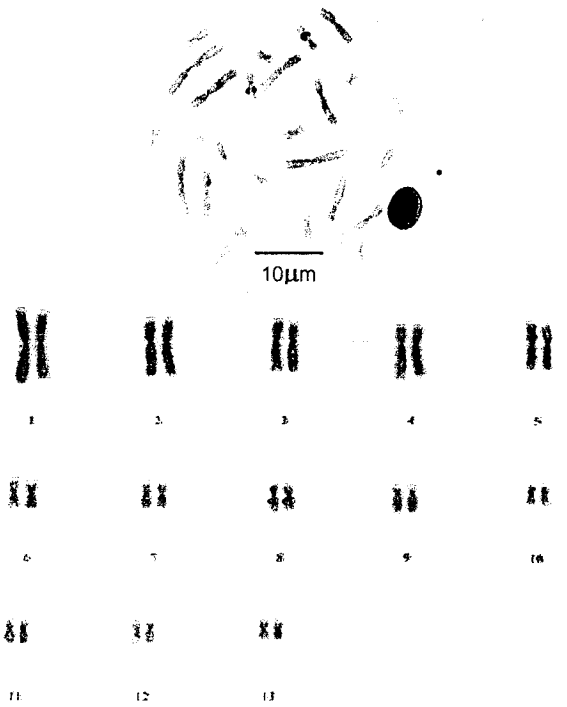
ภาพที่ 8 โครโมโซมระยะเมทาเฟสและคาริโอไทป์
จากการย้อมแถบสีแบบจีของกบนาเพศผู้



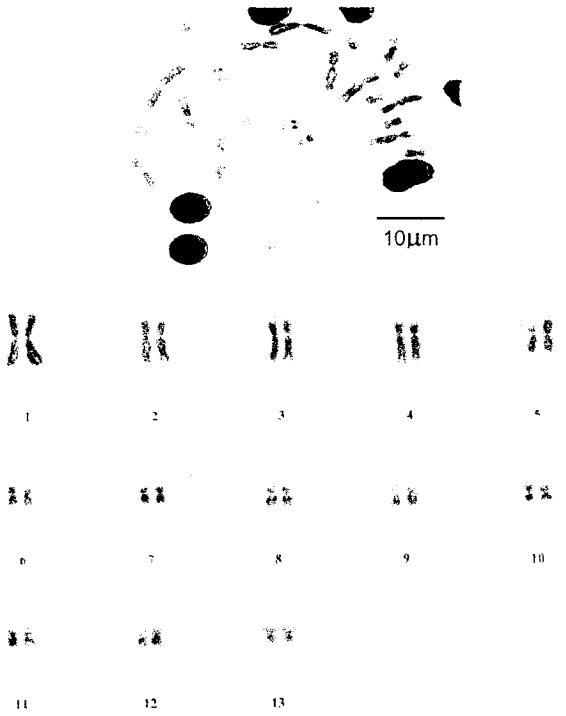
ภาพที่ 9 โครโมโซมระยะเมทาเฟสและคาริโอไทป์
จากการย้อมแถบสีแบบซีของกบนาเพศเมีย



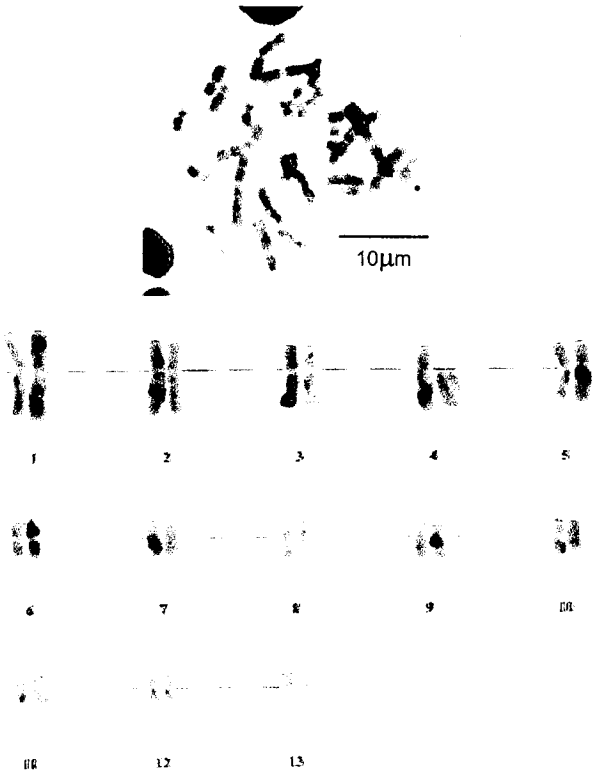
ภาพที่ 10 โครโมโซมระยะเมทาเฟสและคาริโอไทป์
จากการย้อมแถบสีแบบซีของกบนาเพศผู้



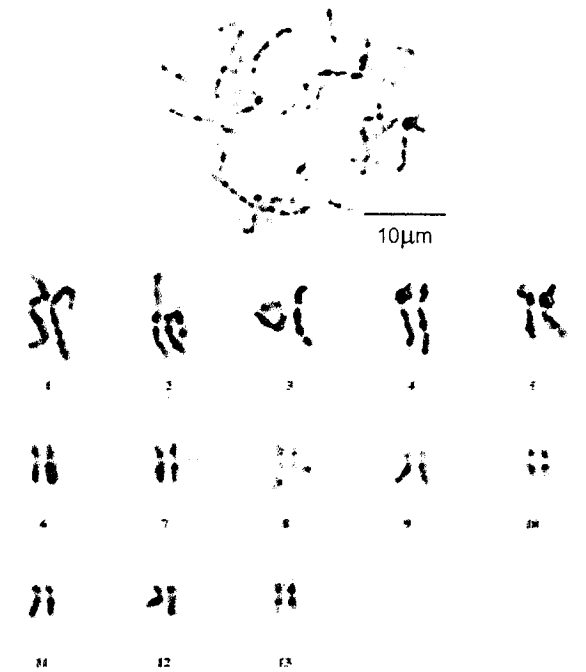
ภาพที่ 11 โครโมโซมระยะเมทาเฟสและคาริโอไทป์ จากการย้อมเพื่อตรวจสอบตำแหน่งนิวคลีโอลาร์ออร์แกไนเซอร์ด้วยวิธี Ag-NOR staining ของกบนาเพศเมีย



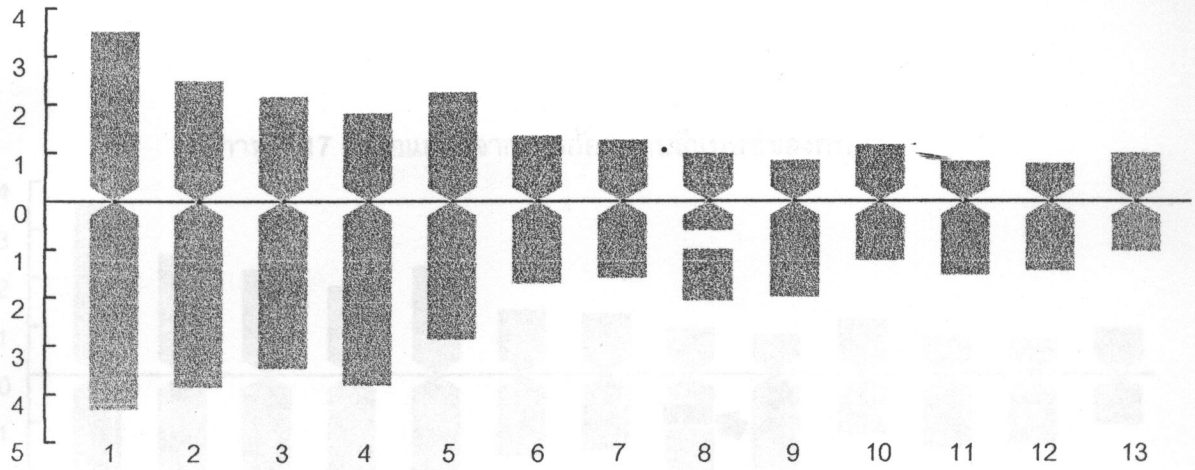
ภาพที่ 12 โครโมโซมระยะเมทาเฟสและคาริโอไทป์ จากการย้อมเพื่อตรวจสอบตำแหน่งนิวคลีโอลาร์ออร์แกไนเซอร์ด้วยวิธี Ag-NOR staining ของกบนาเพศผู้



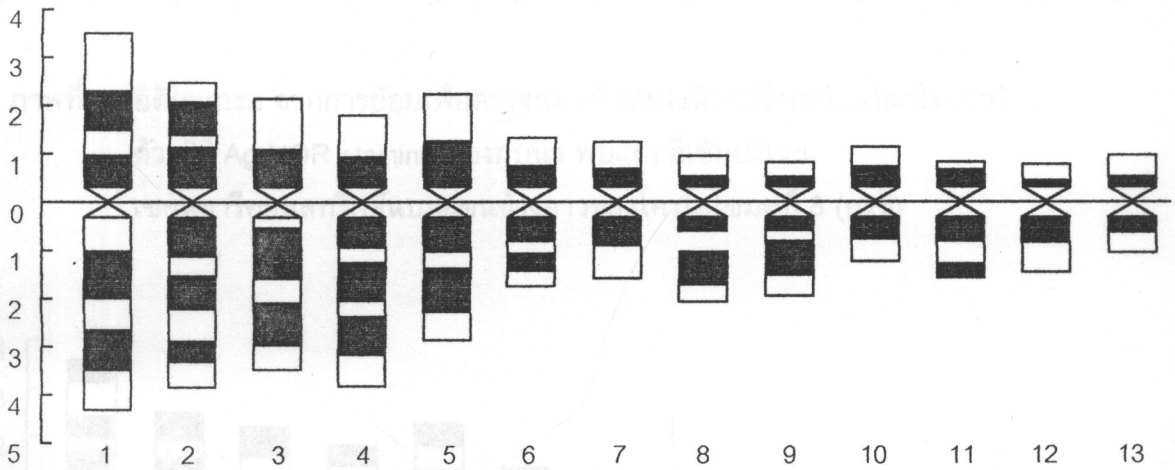
ภาพที่ 13 โครโมโซมระยะเมทาเฟสและคาริโอไทป์ จากการย้อมเพื่อตรวจสอบรูปแบบการจำลองตัวเองโดยใช้ BrdU ของกบนาเพศเมีย



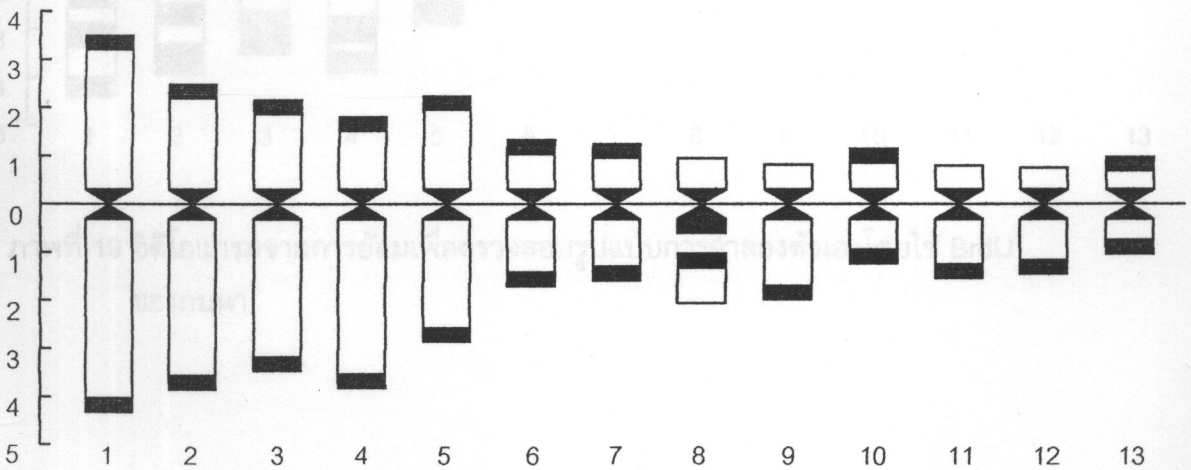
ภาพที่ 14 โครโมโซมระยะเมทาเฟสและคาริโอไทป์ จากการย้อมเพื่อตรวจสอบรูปแบบการจำลองตัวเองโดยใช้ BrdU ของกบนาเพศผู้



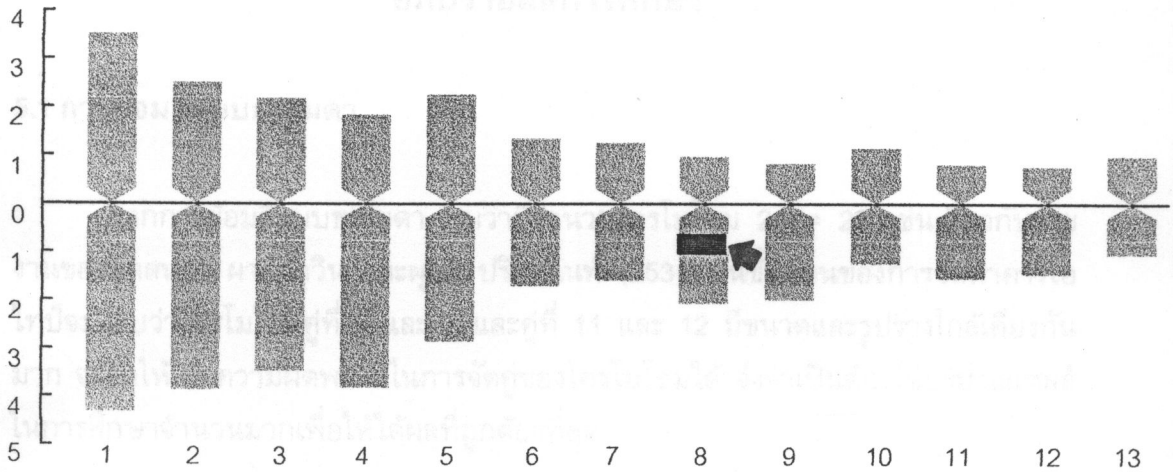
ภาพที่ 15 อิดิโอแกรมของกบนา



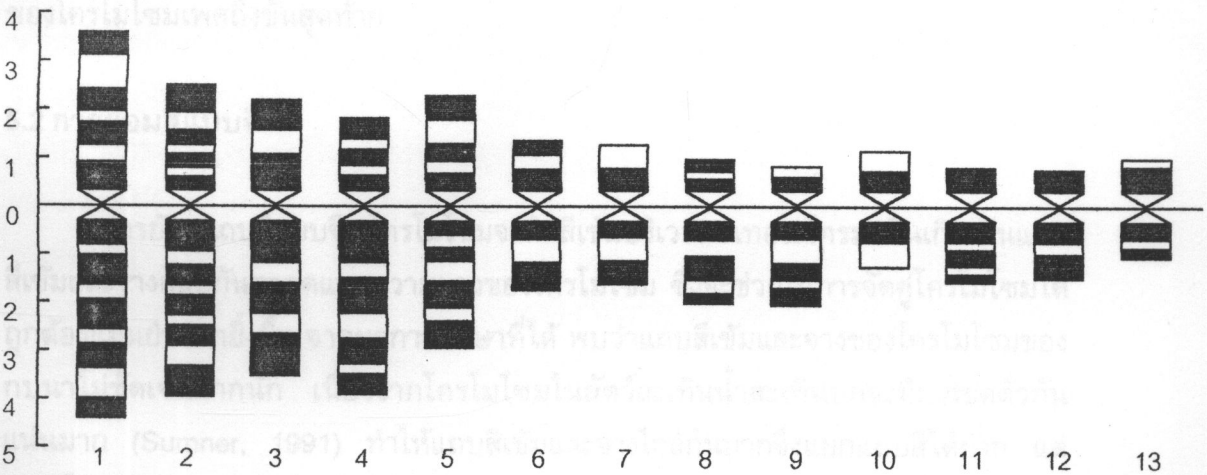
ภาพที่ 16 อิดิโอแกรมจากการย้อมแถบสีแบบจีของกบนา



ภาพที่ 17 อิดิโอแกรมจากการย้อมแถบสีแบบซีของกบนา



ภาพที่ 18 อิดิโอแกรม จากการย้อมเพื่อตรวจสอบตำแหน่งนิวคลีโอลาร์ออร์แกไนเซอร์ ด้วยวิธี Ag-NOR staining ของกบนา พบแถบสีเข้มบริเวณเซคันดารีคอนสทริกชันบนแขนข้างยาวของโครโมโซมคู่ที่ 8 (ศรชี้)



ภาพที่ 19 อิดิโอแกรมจากการย้อมเพื่อตรวจสอบรูปแบบการจำลองตัวเองโดยใช้ BrdU ของกบนา

บทที่ 5

อภิปรายผลการศึกษา

5.1 การย้อมสีแบบธรรมดา

จากการย้อมสีแบบธรรมดา พบว่ามีจำนวนโครโมโซม 2n = 26 เช่นเดียวกับรายงานของสุดสนอง ผาตินาวิน และผุสตี ปริยานนท์ (2531) ในขั้นตอนของการจัดทำคาริโอไทป์จะ พบว่าโครโมโซมคู่ที่ 6 และ 7 และคู่ที่ 11 และ 12 มีขนาดและรูปร่างใกล้เคียงกันมาก จะทำให้เกิดความผิดพลาดในการจัดคู่ของโครโมโซมได้ จึงจำเป็นต้องใช้ปริมาณเซลล์ในการศึกษาจำนวนมากเพื่อให้ได้ผลที่ถูกต้องที่สุด

ในการย้อมสีแบบธรรมดาจะสามารถตรวจสอบว่าโครโมโซมเพศนั้นมีวิวัฒนาการจนถึงขั้นสุดท้ายตามสมมุติฐานเกี่ยวกับวิวัฒนาการของโครโมโซมเพศที่เสนอโดย Ohno (1967 อ้างโดย Schmid et al, 1991) ในขั้นนี้โครโมโซมเพศจะมีขนาดและรูปร่างแตกต่างกันอย่างชัดเจน ผลจากการย้อมสีแบบธรรมดาในกบนา พบว่าโครโมโซมทั้ง 13 คู่ เป็นฮอร์โมมอร์ฟิกโครโมโซม คือ มีขนาดและรูปร่างเหมือนกัน แสดงว่าในกบนายังไม่มีวิวัฒนาการของโครโมโซมเพศถึงขั้นสุดท้าย

5.2 การย้อมสีแบบจี

การย้อมแถบสีแบบจี โครโมโซมจะติดสีเข้มบริเวณเฮเทอโรโครมาทินเกิดเป็นแถบสีเข้มและจางสลับกันตลอดแนวความยาวของโครโมโซม ซึ่งจะช่วยในการจัดคู่โครโมโซมได้ถูกต้องแม่นยำมากยิ่งขึ้น จากผลการศึกษาที่ได้ พบว่าแถบสีเข้มและจางของโครโมโซมของกบนาไม่ชัดเจนมากนัก เนื่องจากโครโมโซมในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกจะมีการขดตัวกันแน่นมาก (Sumner, 1991) ทำให้แถบสีเข้มและจางใกล้กันมากจึงแยกแถบสีได้ยาก แต่อย่างไรก็ตาม พบว่า โครโมโซมแต่ละคู่มีรูปแบบของแถบสีแตกต่างกันอย่างชัดเจน จึงสามารถใช้ช่วยในการจัดคู่ของโครโมโซมให้ถูกต้องมากยิ่งขึ้น และยังช่วยแก้ปัญหาที่เกิดจากการย้อมสีแบบธรรมดา คือสามารถจัดคู่ของโครโมโซมคู่ที่ 6, 7, 11 และ 12 ได้ถูกต้องแม่นยำมากยิ่งขึ้น

การย้อมแถบสีแบบจีจะช่วยตรวจสอบว่าโครโมโซมมีการเกิดอินเวอร์ชันหรือไม่ ซึ่งการเกิดอินเวอร์ชันนี้เป็นขั้นตอนหนึ่งของวิวัฒนาการของโครโมโซมเพศตามสมมุติฐานเกี่ยวกับวิวัฒนาการของโครโมโซมเพศที่เสนอโดย Ohno (1967 อ้างโดย Schmid et al, 1991) จากรูปแบบของแถบสีแบบจีในกบนา พบว่าโครโมโซมทั้ง 13 คู่ ไม่แตกต่างกันระหว่างเพศผู้และเพศเมีย แสดงว่าโครโมโซมเพศในกบนายังไม่มีวิวัฒนาการถึงขั้นที่มีการเกิดอินเวอร์ชัน

5.3 การย้อมแถบสีแบบซี

การย้อมแถบสีแบบซีสีเข้มจะติดที่บริเวณคอนสทิทิวทีฟ เฮเทอโรโครมาทิน ซึ่งจะพบบริเวณเซนโทรเมียร์ และที่บางส่วนบนแขนของโครโมโซม จากผลการศึกษาที่ได้ พบแถบสีเข้มบริเวณเซนโทรเมียร์ของโครโมโซมทุกคู่ และพบแถบสีเข้มบริเวณปลายแขนของโครโมโซมเกือบทุกคู่ แสดงว่าบริเวณเซนโทรเมียร์ของโครโมโซมทุกคู่เป็นคอนสทิทิวทีฟเฮเทอโรโครมาทิน

เมื่อเปรียบเทียบรูปแบบของแถบสีระหว่างแถบสีแบบซีและแถบสีแบบจี น่าจะให้รูปแบบของแถบสีที่สอดคล้องกัน เนื่องจากการย้อมแถบสีแบบจีจะติดสีเข้มบริเวณเฮเทอโรโครมาทิน และการย้อมแถบสีแบบซีจะติดสีเข้มบริเวณ คอนสทิทิวทีฟ เฮเทอโรโครมาทิน จากผลการศึกษาที่ได้พบว่า บริเวณเซนโทรเมียร์และทีโลเมียร์ติดสีเข้มเมื่อทำการย้อมแถบสีแบบซี แต่ติดสีจางเมื่อทำการย้อมแถบสีแบบจี เนื่องจากการย้อมแถบสีแบบจีจะติดสีเข้มบริเวเฮเทอโรโครมาทินที่มีไนโตรจินัสเบสชนิดอะดินีน และไธมีนมาก แต่ในกบนาบริเวณเซนโทรเมียร์ ซึ่งเป็น คอนสทิทิวทีฟ เฮเทอโรโครมาทิน ไม่ได้ประกอบด้วยไนโตรจินัสเบสชนิดอะดินีน และไธมีน ดังเช่นที่เคยมีการศึกษา พบว่าบริเวณเซนโทรเมียร์อาจไม่ได้ประกอบด้วยไนโตรจินัสเบสชนิด อะดินีน และไธมีนมาก แต่อาจประกอบด้วยเบสชนิดกัวนีน และไซโทซีนมาก หรือมีไนโตรจีนัสเบสทั้ง 4 ชนิด ในปริมาณเท่าๆ กัน (Halan, 1989)

การย้อมแถบสีแบบซี จะช่วยตรวจสอบว่ามีวิวัฒนาการถึงขั้นที่มีการสะสมเฮเทอโรโครมาทินหรือไม่ ดังเช่นสมมุติฐานเกี่ยวกับวิวัฒนาการของโครโมโซมเพศที่เสนอโดย Ohno (1967 อ้างโดย Schmid et al, 1991) จากรูปแบบของแถบสีแบบซีในกบนาพบว่าโครโมโซมแต่ละคู่มีรูปแบบของแถบสีเหมือนกัน คือเป็นฮอโมโลกัสโครโมโซมทั้ง 13 คู่ แสดงว่าในกบนายังไม่มีวิวัฒนาการของโครโมโซมเพศถึงขั้นที่มีการสะสมเฮเทอโรโครมาทิน

5.4 การย้อมเพื่อตรวจสอบตำแหน่งนิวคลีโอลาร์ออร์แกไนเซอร์ด้วยวิธี Ag-NOR staining

การย้อมเพื่อตรวจสอบตำแหน่งนิวคลีโอลาร์ออร์แกไนเซอร์ด้วยวิธี Ag-NOR staining เพื่อตรวจสอบว่านิวคลีโอลัสมีที่ตั้งอยู่บนตำแหน่งใดของโครโมโซมคู่ใดบ้าง บริเวณที่ติดสีเข้มคือตำแหน่งที่ตั้งของนิวคลีโอลัส

จากการย้อมสีแบบธรรมดาในกบนาพบ เซคันดารี คอนสทริกชันบนแขนข้างยาวของโครโมโซมคู่ที่ 8 แล้วนิวคลีโอลัสยังมีที่ตั้งอยู่บนโครโมโซมแท่งอื่นอีกหรือไม่ ซึ่งผลจากการย้อมแถบสีนี้ก็พบแถบสีเข้มเฉพาะบนแขนข้างยาวของโครโมโซมคู่ที่ 8 แสดงว่าในกบนามีนิวคลีโอลัส 2 ตำแหน่ง คือบนแขนข้างยาวของโครโมโซมคู่ที่ 8 ทั้งสองแท่ง

ในการตรวจสอบตำแหน่งที่ตั้งของนิวคลีโอลัสถ้าหากพบว่าในโครโมโซมคู่ใดคู่หนึ่งในเพศใดเพศหนึ่งมีตำแหน่งที่ตั้งของนิวคลีโอลัสเพียง 1 แท่ง แสดงว่าโครโมโซมคู่นั้นเป็นโครโมโซมเพศ ดังเช่นในกบ *Buergeria buergeria* (Schmic et al., 1993) พบว่าโครโมโซม Z มีตำแหน่งที่ตั้งของนิวคลีโอลัส แต่ในโครโมโซม W ไม่มีตำแหน่งที่ตั้งของนิวคลีโอลัส จากผลการศึกษาที่ได้ พบแถบสีเข้มบนแขนข้างยาวของโครโมโซมคู่ที่ 8 ทั้งสองแท่ง ทั้งในเพศผู้และเพศเมีย แสดงว่าโครโมโซมคู่ที่ 8 ในกบนาไม่ใช่โครโมโซมเพศ

5.5 การย้อมเพื่อตรวจสอบรูปแบบการจำลองตัวเองโดยใช้ BrdU

การย้อมเพื่อตรวจสอบรูปแบบการจำลองตัวเองโดยใช้ BrdU ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ เติม BrdU ในช่วงปลายของระยะ S จะทำให้ได้รูปแบบของแถบสีเป็น early replication banding ซึ่งรูปแบบของแถบสีที่ได้ พบว่ามีรายละเอียดมากกว่ารูปแบบของแถบสีแบบจี เนื่องการย้อมเพื่อตรวจสอบรูปแบบการจำลองตัวเองโดยใช้ BrdU นั้น BrdU จะไปช่วยยับยั้งการขดตัวของโครโมโซม ทำให้โครโมโซมไม่ขดตัวแน่นมากเกินไป รูปแบบของแถบสีที่ได้จึงมีรายละเอียดเพิ่มขึ้น

ในการย้อมเพื่อตรวจสอบรูปแบบการจำลองตัวเอง เป็นวิธีการหนึ่งที่ใช้ตรวจสอบว่ามีกลไกการป้องกันการเกิดครอสซิงโอเวอร์หรือไม่ ดังเช่นในการศึกษาโครโมโซมเพศในกบ *Rana esculenta* (Shempp and Schmid, 1981) พบว่าบริเวณปลายแขนข้างยาวของโครโมโซม Y จะเกิดการจำลองตัวเองช้ากว่าโครโมโซม X ซึ่งการจำลองตัวเองช้าเป็นกลไก

หนึ่งที่ป้องกันการเกิดครอสซิงโอเวอร์ ซึ่งเป็นขั้นตอนหนึ่งของวิวัฒนาการของโครโมโซมเพศตามสมมุติฐานเกี่ยวกับวิวัฒนาการของโครโมโซมเพศที่เสนอโดย Ohno (1967 อ้างโดย Schmid et al, 1991) จากผลการศึกษาที่ได้ พบว่ารูปแบบของแถบสีในกบนาเพศผู้และเพศเมียไม่แตกต่างกัน แสดงว่าไม่มีวิวัฒนาการของโครโมโซมเพศถึงขั้นที่มีการป้องกันการเกิดครอสซิงโอเวอร์

บทที่ 6

สรุปผลการศึกษา

1. ศึกษาโครโมโซมของกบนาโดยใช้การย้อมสีแบบธรรมดา พบว่ามีจำนวนโครโมโซม 2n = 26 เป็นโครโมโซมขนาดใหญ่ 5 คู่ มีรูปร่างเป็นโครโมโซมเมทาเซนทริก 4 คู่ และโครโมโซมสับเมทาเซนทริก 1 คู่ และเป็นโครโมโซมขนาดเล็ก 8 คู่ มีรูปร่างเป็นโครโมโซมเมทาเซนทริก และโครโมโซมสับเมทาเซนทริกอย่างละ 4 คู่ และพบเซคันดารีคอนสทริกชัน บนแขนข้างยาวของโครโมโซมคู่ที่ 8

2. ศึกษาโครโมโซมของกบนาโดยใช้การย้อมสีแบบธรรมดา พบว่าไม่มีโครโมโซมเพศ แสดงว่าในกบนายังไม่มีวิวัฒนาการของโครโมโซมเพศถึงขั้นที่มีขนาดและรูปร่างแตกต่างกันอย่างชัดเจน

3. ศึกษาโครโมโซมของกบนาโดยใช้การย้อมแถบสีแบบจี พบว่าไม่มีโครโมโซมเพศ แสดงว่าในกบนายังไม่มีวิวัฒนาการของโครโมโซมเพศถึงขั้นที่เกิดอินเวอร์ชัน

4. ศึกษาโครโมโซมของกบนาโดยใช้การย้อมแถบสีแบบซี พบว่าไม่มีโครโมโซมเพศ แสดงว่าในกบนายังไม่มีวิวัฒนาการของโครโมโซมเพศถึงขั้นที่มีการสะสมเฮเทอโรโครมาทิน

5. ศึกษาโครโมโซมของกบนาโดยใช้เทคนิคการย้อมเพื่อตรวจสอบตำแหน่งที่ตั้งของนิวคลีโอลาร์ออร์แกไนเซอร์ด้วยวิธี Ag-NOR staining พบตำแหน่งที่ตั้งของนิวคลีโอลัสบนแขนข้างยาวของโครโมโซมคู่ที่ 8 ทั้งสองแท่ง ทั้งในเพศผู้และเพศเมีย แสดงว่าโครโมโซมเพศไม่ได้ขึ้นอยู่กับตำแหน่งที่ตั้งของนิวคลีโอลัส

6. ศึกษาโครโมโซมของกบนาโดยใช้เทคนิคการย้อมเพื่อตรวจสอบรูปแบบการจำลองตัวเองโดยใช้ BrdU พบว่าไม่มีโครโมโซมเพศ แสดงว่าในกบนายังไม่มีวิวัฒนาการของโครโมโซมเพศถึงขั้นที่มีการป้องกันการเกิดครอสซิงโอเวอร์

7. จากการศึกษาโครโมโซมของกบนาด้วยเทคนิคการย้อมสีแบบธรรมดา การย้อมแถบสีแบบจี การย้อมแถบสีแบบซี การย้อมเพื่อตรวจสอบตำแหน่งนิวคลีโอลาร์ออร์แกไน

เซอร์ด้วยวิธี Ag-NOR staining และการย้อมเพื่อตรวจสอบรูปแบบการจำลองตัวเองโดยใช้ BrdU ไม่พบโครโมโซมเพศในกบนา จึงสามารถสรุปได้ว่าในกบนายังไม่มีวิวัฒนาการของโครโมโซมไปจนถึงขั้นที่มีโครโมโซมเพศ

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

กันยารัตน์ ไชยสุต. 2532. **เซลล์พันธุศาสตร์และเซลล์อนุกรมวิธานของพืชสกุล Zephyranthes**. กรุงเทพฯ: ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ถาวร สุภาพรม, ขนิษฐา ทุมมากรณ์, ประจักษ์ จันทร์ตรี และวิสุทธิ์ ใบไม้. 2543. การศึกษาจำนวนโครโมโซมและคาริโอไทป์ของกบอกหนามและเขียดหลังปุ่ม. **บทคัดย่อการประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 26**, 395.

ถาวร สุภาพรม, นงเยาว์ ฉาไธสง และนิยะดา ห่อนาค. 2534. การศึกษาจำนวนโครโมโซมและคาริโอไทป์ของเขียดจิกและเขียดอีโม่. **บทคัดย่อการประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 17**, B-060.

ถาวร สุภาพรม, บุษกร อารยางกูร, แก้ว อุดมศิริชาคร และวาริณี อรุณมงคลผล. 2537. การศึกษาคาริโอไทป์และการย้อมแถบโครโมโซมแบบซีของกบจุก (*Rana pileata* Boulenger). **รวมผลงานสัมมนาวิชาการพันธุศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ครั้งที่ 8**, 212-220.

ถาวร สุภาพรม และประจักษ์ จันทร์ตรี. 2542. การศึกษาจำนวนโครโมโซมและคาริโอไทป์ของเขียดจิกปากแหลม และอึ่งกรายเอวจุด. **บทคัดย่อการประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 25**, 614-615.

ถาวร สุภาพรม และประภาพร กัลยาประสิทธิ์. 2533. การศึกษาโครโมโซมของอึ่งอ่างบ้านและคางคกบ้าน. **บทคัดย่อการสัมมนาวิชาการพันธุศาสตร์ ครั้งที่ 7**, 107-109.

ถาวร สุภาพรม, วาริณี พละสาร และปทุมทิพย์ บุญจูง. 2537. รายงานครั้งแรกเกี่ยวกับจำนวนโครโมโซมและคาริโอไทป์ของอึ่งขาคำ (*Microhyla pulcha* Hollowell) และอึ่งอ่างก้นขีด (*Kaloula mediolineata* Smith). **บทคัดย่อการประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 20**, 326-327.

ถาวร สุภาพรม, วาริณี อรุณมงคลผล และแก้ว อุดมศิริชาคร. 2535. การศึกษาจำนวนโครโมโซมและคาริโอไทป์ของอึ่งปากขวดและปาดบ้าน. **บทคัดย่อการประชุมวิชาการ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 30**.

ถาวร สุภาพรม, อริยาภรณ์ พงษ์รัตน์ และอุไรวรรณ นิลเพ็ชร. 2535. การศึกษาจำนวนโครโมโซมและคาริโอไทป์ของเขียดเหลืองและอึ่งแว่น. **บทคัดย่อการประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 18**, 400-401.

นงลักษณ์ นาคเกษม. 2518. **การศึกษาการเจริญเติบโตและคาริโอไทป์ของกบ อึ่งอ่าง และคางคกไทย**. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สุดสนอง ผาตินาริน และผุสดี ปริยานนท์. 2531. **การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 14**, 434-435.

ภาษาอังกฤษ

Burns, G. W. and Bottino, P. J. 1989. **The science of genetics**. 6th ed. New York: Macmillan.

Chulalaksananukul, W., Suwannakerd, A. and Pariyanonth, P. 1998. Karyotypic study of *Kaloula mediolineata*. (Amphibia: Microhylidae). **J. Sci. Res. Chula Univ**. 23(2): 129-134.

Clerk, M. S. and Wall, W. J. 1996. **Chromosomes the complex code**. London: Chapman & Hall.

Gosden, J. R. 1994. **Chromosome analysis protocols**. Totowa: Humana Press.

Green, D. M. 1988. Cytogenetics of the endemic New Zealand frog, *Leiopelma hochstetteri* :extraordinary supernumerary chromosome variation and a unique sex-chromosome system. **Chromosoma**. 97: 55-70.

Halnan, C. R. E. 1989. **Cytogenetics of animals**. UK: Cambrian Printer.

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

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

Mahony, M. J. 1991. Heteromorphic sex chromosomes in the Australian frog *Crinia bilingua* (Anura: Myobatrachidae). **Genome**. 34: 334-337.

Melo, A. S., Recco-Pimentel, S. M. and Giaretta, A. A. 1995. The karyotype of the stream dwelling frog *Megaelosia massarti* (Anura, Leptodactylidae, Hylodinae). **Cytologia**. 60: 49-52.

Nardi, I., Andronico, F., De Lucchini, S. and Batistoni, R. 1986. Cytogenetics of the European plethodontid salamanders of the genus *Hydromantes* (Amphibia, Urodela). **Chromosoma**. 94: 377-388.

Nishioka, M., Hanada, H., Miura, I. and Ryuzaki, M. 1994. Four kinds of sex chromosomes in *Rana rugosa.* **Sci.Rep.Lab.Amphibian Biol., Hiroshima Univ**. 13: 1–34.

Nishioka, M., Okumoto, H. and Ryuzaki, M. 1987. A comparative study on the karyotypes of pond frogs distributed in Japan, Korea, Taiwan, Europe and North America. **Sci. Rep. Lab. Amphibian Biol., Hiroshima Univ**. 9: 135-163.

Nishioka, M., Okumoto, H., Ueda, H. and Ryuzaki, M. 1987. Karyotypes of brown frogs distributed in Japan, Korea, Europe and North America. **Sci. Rep. Lab. Amphibian Biol., Hiroshima Univ**. 9: 165-212.

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

Sambamurty, A. V. S. S. 1999. **Genetics**. New Delhi: Narosa Publshing House.

Schempp, W. and Schmid, M. 1981. Chromosome banding in amphibia VI. BrdU-replication patterns in Anura and demonstration of XX/XY sex chromosomes in *Rana esculenta*. **Chromosoma**. 83:697-710.

Schmid, M. 1978a. Chromosome banding in amphibia I. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in Bufo and Hyla. **Chromosoma**. 66: 361-388.

Schmid, M. 1978b. Chromosome banding in amphibia II. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in Ranidae, Microhylidae and Rhacophoridae. **Chromosoma**. 68: 131-148.

Schmid, M. 1980. Chromosome banding in amphibia V. Highly differentiated ZW/ZZ sex chromosomes and exceptional genome size in *Pyxicephalus adspersus* (Anura, Ranidae). **Chromosoma**. 80: 69-96.

Schmid, M., et al. 1990. Chromosome banding in amphibia XV. Two types of Y chromosomes and heterochromatin hypervariability in *Gastrotheca pseustes* (Anura, Hylidae). **Chromosoma**. 99: 413-423.

Schmid, M., et al. 1991. Sex-determining mechanisms and sex chromosomes in amphibia. In Green, D. M. and Sessions, S. K., **Amphibian cytogenetics and evolution**, pp. 393-430. California: Academic Press.

Schmid, M., Haaf, T., Geile, B. and Sims, S. 1983. Chromosome banding in amphibia VIII. An unusual XY/XX-sex chromosome system in *Gastrotheca riobambae* (Anura, Hylidae). **Crhomosoma**. 88: 69-82.

Schmid, M. and Klett, R. 1994.Chromosome banding in amphibia XX. DNA replication patterns in *Gastrotheca riobambae* (Anura, Hylidae) **Cytogenet Cell Genet**. 65: 122-126.

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

Schmid, M., Olert, J. and Klett, C. 1979. Chromosome banding in amphibia III. Sex chromosomes in *Triturus*. **Chromosoma**. 71: 29-55.

Schmid, M., Steinlein, C. and Feichtinger, W. 1989. Chromosome banding in amphibia XIV. The karyotype of *Centrolenella antisthenesi* (Anura, Centrolenidae). **Chromosoma**. 97: 434-438.

Schmid, M., Steinlein, C. and Feichtinger, W. 1992. Chromosome banding in amphibia XVII. First demonstration of multiple sex chromosomes in amphibians: *Eleutherodactylus maussi* (Anura, Leptodactylidae). **Chromosoma**. 101: 284-292.

Schmid, M., Steintein, C., Feichtinger, W., de Almeida, C. G. and Duellman, W. E. 1988. Chromosome banding in amphibia XIII. Sex chromosomes, heterochromatin and meiosis in marsupial frogs (Anura, Hylidae). **Chromosoma**. 97: 33-42.

Seabright, M. 1971. A rapid banding technique for human chromosomes. **The Lencet**. 30: 971-972.

Solari, A. J. 1994. **Sex chromosome and sex determination in vertebrates**. USA: CRC Press.

Sumner, A. T. 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Exptl Cell Res.** 75: 304-306.

Sumner, A. T. 1990. **Chromosome banding.** London: Unwin Hyman.

Weaver, H. 1997. **Genetics.** 3rd ed. USA: McGraw-Hill Companies.

ภาคผนวก

<u>วิธีการเตรียมสารเคมี</u>

- RPMI 1640
  1. ละลาย RPMI 1640 ชนิดผง (Seromed: Cat.No.T121-01) ในน้ำที่อบฆ่าเชื้อแล้ว 1000มิลลิลิตร
  2. เติม $NaHCO_3$ 2 กรัม
  3. ปรับ pH ให้ได้ 6.8 โดยใช้ 1 HCl และ 1 N NaOH
  4. กรองด้วย sterile membrane filters ขนาด 0.45 ไมโครเมตร

  เก็บที่ 2 – 8 องศาเซลเซียส

- อาหารสำหรับเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวประกอบด้วย

1. RPMI 1640	60 มิลลิลิตร
2. foetal bovine serum	20 มิลลิลิตร
3. น้ำกลั่นที่อบฆ่าเชื้อแล้ว	20 มิลลิลิตร
4. phytohemaglutinin (PHA) M Form (Gibco)	3 มิลลิลิตร
5. pennicillin-Streptromycin	1 มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากันโดยวิธีปลอดเชื้อ เก็บที่ –20 องศาเซลเซียส

- 0.075 M KCl

  ชั่ง KCl 0.5588 กรัม ละลายในน้ำ 100 มิลลิลิตร

  เก็บที่อุณหภูมิห้อง

- 0.2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร colchicine

  ชั่ง colchicine 0.002 กรัม ละลายในน้ำ 10 มิลลิลิตร

  เก็บที่ 2 – 8 องศาเซลเซียส

- fixative

  ผสม acetic acid glacial 1 ส่วนและ methanol 3 ส่วนให้เข้ากัน

  เตรียมใหม่และแช่เย็นทุกครั้ง ใช้ภายใน 24 ชั่วโมง

- sorensen phosphate buffer
  - solution A : KH_2PO_4 9.1 กรัม ละลายน้ำ 1000 มิลลิลิตร
  - solution B : Na_2HPO_4 9.5 กรัม ละลายน้ำ 1000 มิลลิลิตร

  walking solution : solution A 50.8 มิลลิลิตร + solution B 49.2 มิลลิลิตร
  เก็บที่อุณหภูมิห้อง

- giemsa 10 %

  giemsa 5 มิลลิลิตร ผสมกับ sorensen phosphate buffer 45 มิลลิลิตร
  ใช้ภายในวันเดียวกัน

- 0.025 % trypsin

  0.25 % trypsin (Gibco) 5 มิลลิลิตร ละลายน้ำ 45 มิลลิลิตร
  ใช้ภายในวันเดียวกัน

- 0.2 N HCl

  conc.HCl 17.2 มิลลิลิตร เติมลงในน้ำ 982.8 มิลลิลิตร
  เติมกรดลงน้ำ เก็บที่อุณหภูมิห้อง

- 5 % barium hydroxide (5% $Ba(OH)_2$)

  ตั้งน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร ใน water bath ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส
  เมื่อต้องการใช้ เติม $Ba(OH)_2 8H_2O$ 2 กรัม เขย่าให้เข้ากัน อาจเกิดเป็นฝ้าขึ้นที่ผิว ช้อนฝ้าที่ผิวทิ้งได้ถ้าจำเป็น
  ต้องเตรียมใหม่และกำจัดทิ้งภายใน 1 ชั่วโมง

- silver nitrate solution

  ชั่ง $AgNO_3$ 4 กรัม ละลายในน้ำ 8 มิลลิลิตร
  เก็บในที่มืด ทิ้งเมื่อเปลี่ยนเป็นสีดำ

- colloidal developer

  ชั่ง gelatin 2 กรัม ละลายน้ำ 100 มิลลิลิตร อาจอุ่นเล็กน้อยเพื่อให้ละลาย แล้วเติม formic acid 1 มิลลิลิตร
  ใช้ภายใน 2 สัปดาห์

- 3×10^{-3} M BrdU (bromodeoxyuridine)
  ชั่ง BrdU 0.0092 กรัม ละลายน้ำ 10 มิลลิลิตร
  เก็บในที่มืด ที่ 2 – 8 องศาเซลเซียส

- 2 x SSC
  ชั่ง NaCl 17.53 กรัม และ trisodium citrate 8.82 กรัม ละลายในน้ำ 1000 มิลลิลิตร
  ใช้ภายใน 1-2 ชั่วโมง

ประวัติผู้วิจัย

นางสาวเพลินพิศ โชคชัยชำนาญกิจ เกิดวันที่ 23 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2518 ที่อำเภอหนองใหญ่ จังหวัดชลบุรี สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2539 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ที่จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยเมื่อ พ.ศ. 2540 โดยได้รับทุนอุดหนุนการศึกษาเพื่อทำหน้าที่ผู้ช่วยสอนและ/หรือวิจัย ประจำปีการศึกษา 2541 จากบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และได้รับทุนสนับสนุนการทำวิทยานิพนธ์จากโครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย