



รายงานการวิจัย

การกระจายของเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์
บนโครโมโซมสัตว์เลื้อยคลาน (*Cyrtodactylus jarujini* และ
C. doisuthep) โดยใช้เทคนิคฟลูออเรสเซนซ์อินซิทูไฮบริไดเซชัน

Microsatellite DNA Dispersions on Chromosomes of
Reptiles (*Cyrtodactylus jarujini* and *C. doisuthep*) by
Fluorescence in situ Hybridization technique

สุมาลี พิมพันธุ์

สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์

ประจำปีงบประมาณ 2563

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การกระจายของเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์
บนโครโมโซมสัตว์เลื้อยคลาน (*Cyrtodactylus jarujini* และ
C. doisuthep) โดยใช้เทคนิคฟลูออเรสเซนซ์อินซิทูไฮบริไดเซชัน

Microsatellite DNA Dispersions on Chromosomes of
Reptiles (*Cyrtodactylus jarujini* and *C. doisuthep*) by
Fluorescence in situ Hybridization technique

สุมาลี พิมพันธุ์

สาขาวิชาชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

ทุนอุดหนุนงานวิจัยงบประมาณส่วนตัว มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2563

(ก)

ชื่อโครงการวิจัย	การกระจายของเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลต์บนโครโมโซมสัตว์เลื้อยคลาน (<i>Cyrtodactylus jarujini</i> และ <i>C. doisuethep</i>) โดยใช้เทคนิคฟลูออเรสเซนซ์อินซิทูไฮบริไดเซชัน
ผู้วิจัย	สุมาลี พิมพ์พันธุ์
สาขาวิชา	ชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ 2563

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาโครโมโซมของตุ๊กแกป่าจำนวน 1 สกุล 2 ชนิด ได้แก่ *Cyrtodactylus jarujini* และ *C. doisuethep* โดยแต่ละชนิดมีชื่อสามัญ ได้แก่ ตุ๊กแกป่าจาร์จินต์ และ ตุ๊กแกป่าดอยสุเทพ ตามลำดับ การจัดแคโรไทป์ของตุ๊กแกป่าได้จากการย้อมสีโครโมโซมแบบดั้งเดิม (conventional staining technique) พบว่าตุ๊กแกป่าชนิด *C. jarujini* และ *C. doisuethep* มีจำนวนโครโมโซมเท่ากับ 40 และ 34 แท่ง ตามลำดับ และมีจำนวนโครโมโซมพื้นฐาน (Fundamental number, NF) เท่ากับ 66 และ 61 ตามลำดับ ผลจากวัดความยาวเฉลี่ยของโครโมโซมจากภาพเซลล์ระยะเมทาเฟสจำนวน 20 เมทาเฟสในแต่ละชนิด เพื่อระบุขนาดและชนิดของโครโมโซม สามารถเขียนสูตรแคโรไทป์ของตุ๊กแกป่าแต่ละชนิดได้เป็น $2n$ (diploid) $40 = L^{sm}_1 + L^{sm}_2 + L^t_3 + M^m_1 + M^t_4 + S^m_2 + S^a_2 + S^t_5$ และ $2n$ (diploid) $34 = L^{sm}_3 + L^m_2 + L^t_3 + M^m_1 + M^t_2 + S^m_4 + S^a_1 + S^t_1$ ตามลำดับ การย้อมสีโครโมโซมของตุ๊กแกป่าด้วยซิลเวอร์ไนเตรตเพื่อระบุตำแหน่ง Nucleolar Organized Regions หรือ NORs บนโครโมโซมของตุ๊กแกป่าในระยะเมทาเฟส พบว่าตุ๊กแกป่า 2 ชนิดนี้มีตำแหน่ง NORs อยู่บนโครโมโซมต่างแท่งกัน โดย *C. jarujini* อยู่บนแขนข้างสั้นของโครโมโซมคู่ที่ 13 และ 14 ทั้งในเพศผู้และเพศเมีย ส่วน *C. doisuethep* อยู่บนปลายแขนข้างสั้นและแขนข้างยาวของโครโมโซมแท่งที่ 9 และอยู่บนแขนข้างยาวของโครโมโซมคู่ที่ 13 ทั้งในเพศผู้และเพศเมีย

การศึกษากการกระจายของลำดับเบสไมโครแซทเทลไลต์บนโครโมโซมของตุ๊กแกป่าโดยใช้เทคนิค Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH) ใช้โพรบไมโครแซทเทลไลต์ 4 ประเภท เป็นเครื่องหมายทางพันธุกรรม ได้แก่ mono-, di-, tri- และ oligonucleotides หลายชนิด ได้แก่ A_{20} TA_{15} CGG_{10} GAA_{10} และ telomeres ที่มีลำดับเบส $TTAGGG_n$ ตามลำดับ พบว่ามีรูปแบบการกระจายของดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลต์ที่แตกต่างกัน ตามแต่ละชนิดของโพรบ แต่ละโพรบปรากฏสัญญาณ และมีรูปแบบการกระจายของไมโครแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอที่หลากหลาย ทั้งในรูปแบบที่มีการสะสมมากบริเวณเซนโตรเมียร์และเทโลเมียร์ กระจายทั่วทั้งจีโนม หรือสะสมมากปรากฏเป็นจุดหนาแน่นในโครโมโซมบางแท่ง ความสัมพันธ์และวิวัฒนาการของโครโมโซมของตุ๊กแกป่า 2 ชนิด ในการศึกษาครั้งนี้ยังไม่ชัดเจน อย่างไรก็ตามจากสัญญาณโพรบบางชนิดแสดงให้เห็นถึงบริเวณที่มีลำดับ

เบสซ้ำสะสมมากที่มีความเชื่อมโยงกันระหว่างโครโมโซมของตุ๊กแกป่าทั้ง 2 ชนิด ซึ่งจำเป็นจะต้องมีการศึกษาเพื่อยืนยันสมมติฐานดังกล่าวในการศึกษาครั้งต่อไปในอนาคต

คำสำคัญ: FISH (Fluorescence in situ Hybridization), ดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์, โพรบประเภท momo-, di-, tri-, oligonucleotide, แคริโอไทป์, การย้อมสีโครโมโซมแบบธรรมดา (conventional staining), NORs (Nucleolar Organized Regions)

Title Microsatellite DNA Dispersions on Chromosomes of Reptiles
 (*Cyrtodactylus jarujini* and *C. doisuthep*) by Fluorescence in situ
 Hybridization technique

Author Sumalee Phimphan

Department Biology program, Department of Science and Technology, Phetchabun
 Rajabhat University.

Date 2019

ABSTRACT

The purpose of this study is to study chromosomes of reptiles that classified in order Squamata, family Gekkonidae, 1 genus, 2 species including of *Cyrtodactylus jarujini* and *C. doisuthep*. The common names are Jarujin bent-toed gecko and Doi Suthep bent-toed gecko respectively. Each species have a species distribution on the different part of Thailand. Reptile in Thailand has rich of species and widely distribution. The karyological typing from a conventional staining technique of the Gekkonid in this study found that *C. jarujini* and *C. doisuthep* have the diploid numbers equal to 40 and 34 respectively. The fundamental numbers (NF) including of 66 and 61 respectively. All of data measured from the chromosome at metaphase stage 20 pictures to describe the sizes, shapes, and numbers of chromosome. In addition, we created the chromosome formula of the chromosome in each species showed that $2n$ (diploid) $40 = L^{sm}_1 + L^{sm}_2 + L^t_3 + M^m_1 + M^t_4 + S^m_2 + S^a_2 + S^t_5$ และ $2n$ (diploid) $34 = L^{sm}_3 + L^m_2 + L^t_3 + M^m_1 + M^t_2 + S^m_4 + S^a_1 + S^t_1$ respectively. Moreover, we stained the chromosome with silver nitrate to identify the NORs bearing on the chromosomes and we found that they have different NORs positions on the chromosome of the Gekkonids.

The study of chromosome has been only studied in the level of number, shape and sizes that karyological typing from conventional staining of chromosomes. This study focus in the level of molecular by using FISH (Fluorescence *in situ* Hybridization) technique, microsatellites probes were used to labeled from Nick translation. Here we used 4 types of microsatellite probes compose of mono-, di-, tri- and oligotides each probe including of A_{20} TA_{15} CGG_{10} GAA_{10} and telomere ($TTAGGG_n$). Each probe was

hybridized with each chromosome of the Gekkonid chromosomes. The distribution pattern is expected to find the relation and evolution of chromosomes. The signals from probes showed the different pattern in each chromosome of the Gekkonids depend on probe types. Some probe shown high distribution on centromere and telomere regions, another bearing dispersed on whole genomes including chromosomes, and some has strong signal on only a pair of homologous chromosomes. The relation of microsatellite DNA on chromosomes can be the evidence of chromosomal evolution, in this study still not has microsatellites result information enough by limitations of short times and techniques. By the way we could proof the hypothesis from this study to confirm the relation between Gekkonids' chromosomes in the future study.

Keywords: FISH (Fluorescence *in situ* Hybridization), microsatellite DNA, momo-, di-, tri-, oligonucleotide probes, karyotype, conventional staining, NORs (Nucleolar Organized Regions)

(จ)

กิตติกรรมประกาศ

วิจัยฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยความช่วยเหลือ ความกรุณา และคำปรึกษาจากบุคคลหลายฝ่าย
ดังต่อไปนี้คือ ขอกราบขอบพระคุณ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์
ที่เอื้อเฟื้อวัสดุ อุปกรณ์ เครื่องมือวิทยาศาสตร์ ตลอดจนอำนวยความสะดวกในการดำเนินงานวิจัยใน
ครั้งนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สุมาลี พิมพันธุ์

10 พฤศจิกายน 2564

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	(ก)
บทคัดย่อ	(ข)
ภาษาอังกฤษ	(ค)
กิตติกรรมประกาศ	(จ)
บทที่ 1	บทนำ
	1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1
	2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย 2
	3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2
	4. ขอบเขตของการวิจัย 2
	5. ขอบเขตระยะเวลา 3
บทที่ 2	เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 4
	1. พันธุศาสตร์เซลล์ 4
	2. พันธุศาสตร์เซลล์ของตุ๊กแก 5
	3. การเตรียมโครโมโซม 6
	4. การย้อมสีโครโมโซม 7
บทที่ 3	วิธีดำเนินการวิจัย 9
	1. การเตรียมโครโมโซมจากไขกระดูก 9
	2. การเตรียมสไลด์โครโมโซม และการย้อมสีโครโมโซม 9
	3. การตรวจสอบโครโมโซม การจัดแคริโอไทป์ 10
	4. การทำอิดิโอแกรมมาตรฐาน 12
บทที่ 4	ผลการวิจัย 15
	1. ผลการศึกษาการกระจายพันธุ์ของตุ๊กแกป่าจารุจินต์ (<i>Cyrtodactylus jarujini</i>) และตุ๊กแกป่าดอยสุเทพ (<i>C. doisuthep</i>) ในประเทศไทย 15
	2. ผลการศึกษาการศึกษาโครโมโซมของตุ๊กแกป่าจารุจินต์ (<i>C. jarujini</i>) และตุ๊กแกป่าดอยสุเทพ (<i>C. doisuthep</i>) 17

(จ)

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 5	
วิจารณ์ผลการวิจัย	28
เอกสารอ้างอิง	30
ภาคผนวก	33
ภาคผนวก ก	
วัสดุอุปกรณ์ สารเคมี และการเตรียมสารต่าง ๆ	33
ภาคผนวก ข	
ผลงานวิจัยที่เผยแพร่	39
ประวัตินักวิจัย	53

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 4.1	ข้อมูลทั่วไปของตุ๊กแกป่าจารุจินต์ (<i>C. Jarujini</i>) และ ตุ๊กแกป่าดอยสุเทพ (<i>C. doisuthep</i>)	15
ตารางที่ 4.2	การวัดความยาวแขนของโครโมโซมตุ๊กแกป่าจารุจินต์ (<i>C. jarujini</i>) Mean length of short arm chromosome (Ls), length of long arm chromosome (Ll), length of total chromosomes (LT), relative length (RL), centromeric index (CI) และ standart deviation (SD) $2n = (\text{diploid}) 40$	18
ตารางที่ 4.3	การวัดความยาวแขนของโครโมโซมตุ๊กแกป่าดอยสุเทพ (<i>C. doisuthep</i>) Mean length of short arm chromosome (Ls), length of long arm chromosome (Ll), length of total chromosomes (LT), relative length (RL), centromeric index (CI) และ standart deviation (SD) $2n(\text{diploid}) = 34$	19

สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพที่ 4.1	ลักษณะทั่วไปทางสัณฐานวิทยาของ (ก) ตั๊กแกป่าจารุจินต์ (<i>C. jarujini</i>) และ (ข) ตั๊กแกป่าดอยสุเทพ (<i>C. doisuthep</i>)	16
ภาพที่ 4.2	แผนที่แสดงการค้นพบตั๊กแกป่าจารุจินต์ (<i>C. jarujini</i>) และตั๊กแกป่าดอยสุเทพ (<i>C. doisuthep</i>) ในประเทศไทย	16
ภาพที่ 4.3	โครโมโซมระยะเมทาเฟสและแคริโอไทป์ของโครโมโซมตั๊กแกป่าจารุจินต์เพศผู้ (<i>C. jarujini</i>) จำนวนโครโมโซม $2n=34$ จากการย้อมสีแบบธรรมดา	20
ภาพที่ 4.4	โครโมโซมระยะเมทาเฟสและแคริโอไทป์ของโครโมโซมตั๊กแกป่าจารุจินต์เพศเมีย (<i>C. jarujini</i>) จำนวนโครโมโซม $2n=34$ จากการย้อมสีแบบธรรมดา	20
ภาพที่ 4.5	โครโมโซมระยะเมทาเฟสและแคริโอไทป์ของโครโมโซมตั๊กแกป่าดอยสุเทพเพศผู้ (<i>C. doisuthep</i>) จำนวนโครโมโซม $2n=34$ จากการย้อมสีแบบดั้งเดิม	20
ภาพที่ 4.6	โครโมโซมระยะเมทาเฟสและแคริโอไทป์ของโครโมโซมตั๊กแกป่าดอยสุเทพเพศเมีย (<i>C. doisuthep</i>) จำนวนโครโมโซม $2n=34$ จากการย้อมสีแบบธรรมดา	21
ภาพที่ 4.7	โครโมโซมระยะเมทาเฟสและแคริโอไทป์ของโครโมโซมตั๊กแกป่าจารุจินต์เพศผู้ (<i>C. jarujini</i>) จำนวนโครโมโซม $2n=40$ แสดงตำแหน่ง NOR บนโครโมโซมแท่งที่ 13 และ 14 จากการย้อมสีแบบ Ag-NORs หรือ Silver staining	21
ภาพที่ 4.8	โครโมโซมระยะเมทาเฟสและแคริโอไทป์ของโครโมโซมตั๊กแกป่าจารุจินต์เพศเมีย (<i>C. jarujini</i>) จำนวนโครโมโซม $2n=40$ แสดงตำแหน่ง NOR บนโครโมโซมแท่งที่ 13 และ 14 จากการย้อมสีแบบ Ag-NORs หรือ Silver staining	22
ภาพที่ 4.9	โครโมโซมระยะเมทาเฟสและแคริโอไทป์ของโครโมโซมตั๊กแกป่าดอยสุเทพเพศเมีย (<i>C. doisuthep</i>) จำนวนโครโมโซม $2n=34$ แสดงตำแหน่ง NOR บนโครโมโซมแท่งที่ 9 และ 13 จากการย้อมสีแบบ Ag-NOR หรือ Silver staining	22
ภาพที่ 4.10	โครโมโซมระยะเมทาเฟสและแคริโอไทป์ของโครโมโซมตั๊กแกป่าดอยสุเทพเพศเมีย (<i>C. doisuthep</i>) จำนวนโครโมโซม $2n=34$ แสดงตำแหน่ง NOR บนโครโมโซมแท่งที่ 9 และ 13 จากการย้อมสีแบบ Ag-NOR หรือ Silver staining	22

(ซ)

สารบัญภาพ (ต่อ)

	หน้า
ภาพที่ 4.11 โครโมโซมในระยะเมทาเฟส หลังจากการ hybridization ด้วยโพรบไมโครแซทเทลไลท์ประเภทโมโนนิวคลีโอไทด์ ชนิด A ₂₀ แสดงการสะสมของลำดับเบสซ้ำ A บนโครโมโซมของ (ก) ตั๊กแกป่าจารูจินต์ (<i>C. jarujini</i>) และ (ข) ตั๊กแกป่าดอยสุเทพ (<i>C. doisuthei</i>)	23
ภาพที่ 4.12 โครโมโซมในระยะเมทาเฟส หลังจากการ hybridization ด้วยโพรบไมโครแซทเทลไลท์ประเภทไดนิวคลีโอไทด์ ชนิด GA ₁₅ แสดงการสะสมของลำดับเบสซ้ำ GA บนโครโมโซมของ (ก) ตั๊กแกป่าจารูจินต์ (<i>C. jarujini</i>) และ (ข) ตั๊กแกป่าดอยสุเทพ (<i>C. doisuthei</i>)	24
ภาพที่ 4.13 โครโมโซมในระยะเมทาเฟส หลังจากการ hybridization ด้วยโพรบไมโครแซทเทลไลท์ประเภทไตรนิวคลีโอไทด์ ชนิด CGG ₁₀ แสดงการสะสมของลำดับเบสไมโครแซทเทลไลท์บนโครโมโซมของ (ก) ตั๊กแกป่าจารูจินต์ (<i>C. jarujini</i>) และ (ข) ตั๊กแกป่าดอยสุเทพ (<i>C. doisuthei</i>)	25
ภาพที่ 4.14 โครโมโซมในระยะเมทาเฟส หลังจากการ hybridization ด้วยโพรบไมโครแซทเทลไลท์ประเภทไตรนิวคลีโอไทด์โพรบ CAG ₁₀ แสดงการสะสมของลำดับเบสไมโครแซทเทลไลท์บนโครโมโซมของ (ก) ตั๊กแกป่าจารูจินต์ (<i>C. jarujini</i>) และ (ข) ตั๊กแกป่าดอยสุเทพ (<i>C. doisuthei</i>)	26
ภาพที่ 4.15 โครโมโซมในระยะเมทาเฟส หลังจากการ hybridization ด้วยโพรบไมโครแซทเทลไลท์ประเภทโอลิโกนิวคลีโอไทด์โพรบ TTAGGG _n แสดงการสะสมของลำดับเบสซ้ำ TTAGGG บริเวณ telomeres บนโครโมโซมของ (ก) ตั๊กแกป่าจารูจินต์ (<i>C. jarujini</i>) และ (ข) ตั๊กแกป่าดอยสุเทพ (<i>C. doisuthei</i>)	27

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา

สัตว์เลื้อยคลานในอันดับ Squamata มีความหลากหลายทางชนิดสูง มีการกระจายพันธุ์ทั่วประเทศไทย การค้นพบสัตว์เลื้อยคลานชนิดใหม่ในกลุ่มนี้เกิดขึ้นอย่างต่อเนื่อง รวมทั้งสัตว์เลื้อยคลานในวงศ์ Gekkonidae สกุล *Cyrtodactylus* (Bauer และคณะ 2002) ซึ่งมีชื่อสามัญภาษาไทยคือตุ๊กแกป่า และมีชื่อสามัญภาษาอังกฤษคือ bent-toed gecko จากการสำรวจโดย Zheng และ Weins (2016) สัตว์เลื้อยคลานใน วงศ์ Gekkonidae มีความหลากหลายทางชนิดสูงกว่า 1,078 ชนิดทั่วโลก มีรายงานการค้นพบสัตว์เลื้อยคลานในสกุล *Cyrtodactylus* ในประเทศไทยและประเทศอื่นๆในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น ประเทศลาว กัมพูชา เวียดนาม (Davit และคณะ 2011) การสำรวจโดย Ellis และ Puawels (2012) พบว่ามีตุ๊กแกป่าสกุล *Cyrtodactylus* มากกว่า 20 ชนิด การศึกษาครั้งนี้ศึกษาโครโมโซมของตุ๊กแกป่า 2 ชนิด ได้แก่ *C. jarujini* และ *C. doisuthep* ซึ่งมีชื่อสามัญภาษาไทย ได้แก่ ตุ๊กแกป่าจาร์จินต์และตุ๊กแกป่าดอยสุเทพ ตามลำดับ และมีชื่อสามัญภาษาอังกฤษ ได้แก่ Jarujin bent-toed gecko และ Doi Suthep bent-toed gecko โดย *C. jarujini* ค้นพบและตั้งชื่อโดย Ulber และคณะ (1993) ณ เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูวัว จังหวัดบึงกาฬ ส่วน *C. doisuthep* ค้นพบและตั้งชื่อโดย Kunya และคณะ (2014) ณ ดอยสุเทพ จังหวัดเชียงใหม่ ทั้งสองชนิดมีเขตการกระจายพันธุ์ที่แตกต่างกันในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคเหนือของประเทศไทย ตามลำดับ

การศึกษาโครโมโซมของสัตว์เลื้อยคลานในประเทศไทยส่วนใหญ่เน้นศึกษาแคริโอไทป์ จากการย้อมสีแบบดั้งเดิม (conventional staining) การศึกษาโครโมโซมในระดับโมเลกุลของสิ่งมีชีวิต ซึ่งเป็นการศึกษายีนหรือลำดับเบสที่สนใจบนโครโมโซมยังคงมีน้อย (Trifonova และคณะ 2011) สัตว์เลื้อยคลานในวงศ์ Gekkonidae เป็นกลุ่มของสัตว์เลื้อยคลานขนาดใหญ่ มีสัตว์ที่ถูกจัดอยู่ในกลุ่มนี้กว่า 1000 ชนิด มีการค้นพบโครโมโซมเพศในสัตว์กลุ่มนี้กว่า 200 ชนิด บางชนิดมีการศึกษาโครโมโซมแล้ว ส่วนใหญ่เป็นการศึกษาโครโมโซมแบบดั้งเดิม มุ่งเน้นการศึกษาจำนวน รูปร่างของโครโมโซม และทำแคริโอไทป์จากการย้อมสีแบบธรรมดา

การศึกษานี้เป็นการศึกษาโครโมโซมของตุ๊กแกป่าจำนวน 1 สกุล 2 ชนิด ได้แก่ *C. jarujini* และ *C. doisuthep* เป็นครั้งแรก ประกอบไปด้วยการศึกษาแคริโอไทป์จากการย้อมสีโครโมโซมแบบดั้งเดิม (conventional staining) การหาตำแหน่ง nucleolar organized region (NOR) จากการย้อมด้วยซิลเวอร์ไนเตรต (silver staining) และการศึกษาโครโมโซมในระดับโมเลกุล มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาคำแหน่งของลำดับเบสไมโครแซทเทลไลต์ซึ่งเป็นเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่สนใจ บนโครโมโซมของตุ๊กแกป่าทั้ง 2 ชนิด ดังกล่าว โดยใช้เทคนิค Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH) ใช้โพรบ

ประเภทโมโน- ไค- ไตร- และ โอลิโกนิวคลีโอไทด์ ได้แก่ $A_{20}GA_{15}CGG_{10}CAG_{10}$ และ telomeres ที่มีลำดับเบส TTAGGG_n ไมโครแซทเทลไลท์ (Microsatellite DNA) หรือ short tandem repeats (STR) เป็นลำดับเบสซ้ำที่พบในจีโนมของสิ่งมีชีวิต มีภาวะทวิลักษณ์ (polymorphism) หน่วยซ้ำมีจำนวนเบสตั้งแต่ 2-7 เบส จำนวนซ้ำแตกต่างกันออกไป และมีความผันแปร รูปแบบการกระจายของไมโครแซทเทลไลท์สามารถบอกความสัมพันธ์และวิวัฒนาการระหว่างสิ่งมีชีวิตได้ นอกจากนั้นยังสามารถใช้เป็นเครื่องมือบ่งบอกการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นภายในจีโนมที่เกิดขึ้นระหว่างการวิวัฒนาการตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน (Abdulle-Muneer, 2014)

1.2 วัตถุประสงค์หลักของโครงการวิจัย

1. เพื่อศึกษาโครโมโซมของตุ๊กแกป่า 1 สกุล 2 ชนิด ได้แก่ ตุ๊กแกป่าจาร์จินี (*Cyrtodactylus kunyai*) และตุ๊กแกป่าดอยสุเทพ (*C. doisuethep*) ทำแคโรไทป์จากการย้อมสีโครโมโซมแบบดั้งเดิม (conventional staining technique)
2. เพื่อระบุตำแหน่ง Nucleolar Organize Region (NOR) บนโครโมโซมของตุ๊กแกป่าจาร์จินี (*C. kunyai*) และตุ๊กแกป่าดอยสุเทพ (*C. doisuethep*) จากการย้อมโครโมโซมด้วยซิลเวอร์ไนเตรต
3. เพื่อศึกษาตำแหน่งไมโครแซทเทลไลท์ และรูปแบบการกระจายของดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์บนโครโมโซมของตุ๊กแกป่า โดยใช้เทคนิค Fluorescence *in situ* Hybridization หรือ FISH วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างโครโมโซมของตุ๊กแกป่าทั้ง 2 ชนิด

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบลักษณะทั่วไปของโครโมโซมพื้นฐานของตุ๊กแกป่า 2 ชนิด ได้แก่ *C. jarujini* และ *C. doisuethep* ทราบตำแหน่ง NOR บนโครโมโซมของตุ๊กแกป่าทั้ง 2 ชนิด
2. ทราบรูปแบบการกระจายของดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์ต่างๆบนโครโมโซมของตุ๊กแกทั้งสองชนิดดังกล่าว สามารถวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างโครโมโซมของตุ๊กแกป่าทั้ง 2 ชนิด ความสัมพันธ์วิวัฒนาการของโครโมโซม จากรูปแบบการกระจายของไมโครแซทเทลไลท์
3. ทราบตำแหน่งไมโครแซทเทลไลท์ และรูปแบบการกระจายของดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์ บนโครโมโซมของตุ๊กแกป่า โดยใช้เทคนิค Fluorescence *in situ* Hybridization

1.4 ขอบเขตของโครงการวิจัย

การศึกษานี้ศึกษาลักษณะพื้นฐานของโครโมโซมตุ๊กแกป่าในลำดับ Squamata วงศ์ Gekkonodae จำนวน 1 สกุล 2 ชนิด ได้แก่ *Cyrtodactylus jarujini* และ *C. doisuethep* การศึกษาแคโรไทป์จากการย้อมสีแบบดั้งเดิม (conventional staining) การหาตำแหน่ง nucleolar organized regions (NORs) บนโครโมโซมของตุ๊กแกป่าทั้ง 2 ชนิด จากการย้อมด้วยซิลเวอร์ไนเตรต (silver staining)

และศึกษาตำแหน่งของดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์บนโครโมโซมของตุ๊กแกป่าโดยใช้เทคนิคการศึกษาโครโมโซมในระดับโมเลกุล คือเทคนิค Fluorescence *in situ* Hybridization หรือเทคนิค FISH โดยใช้โพรบไมโครแซทเทลไลท์ประเภท โมโน-, ได-, ไตร และ โอลิโกนิวคลีโอไทด์ ได้แก่ A₂₀ GA₂₀ CGG₁₀ CAG₁₀ และ telomere ที่มีลำดับเบสเป็น TTAGGG_n และวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างโครโมโซมของตุ๊กแกป่าทั้ง 2 ชนิด จากสัญญาณโพรบที่ปรากฏ

1.5 ขอบเขตระยะเวลา

ระยะเวลาในการทำงานวิจัย เริ่มทำการศึกษาดังแต่เดือน กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2563 ถึง เดือน สิงหาคม พ.ศ. 2564

บทที่ 2

วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 พันธุศาสตร์เซลล์

โครโมโซมถูกค้นพบโดย Nägeli ในปี ค.ศ. 1842 และถูกเรียกว่าโครโมโซมครั้งแรกโดย W. Waldeyer ในปี ค.ศ. 1888 ซึ่งมีความหมายว่า ส่วนที่มีสี (Robert, 1989) โครโมโซมเป็นศูนย์กลางที่สำคัญสำหรับการถ่ายทอดพันธุกรรม เนื่องจากโครโมโซมเป็นสารพันธุกรรมหรือ DNA ที่อัดแน่นรวมกัน ซึ่งจะอัดแน่นรวมกันเมื่อเกิดการแบ่งเซลล์ทั้งแบบไมโทซิสและไมโอซิส

การย้อมสีแบบดั้งเดิมหรือแบบธรรมดา (conventional staining) เป็นการย้อมสีโครโมโซมโดยใช้สี Giemsa's โดยสีจะติดโครโมโซมทั้งแท่ง ทำให้สามารถศึกษารูปร่างและจำนวนของสิ่งมีชีวิตได้ (อลงกลด, 2554)

Colchicine เป็นสารเคมีที่ใช้กับการศึกษาด้านพันธุศาสตร์เซลล์ครั้งแรกในปี ค.ศ. 1950 สารโคลชิซินมีผลทำให้เซลล์ยับยั้งการสร้างเส้นใยสปินเดิล ที่มีความสำคัญในการแบ่งโครโมโซมในการแบ่งเซลล์ เมื่อเซลล์ได้รับสารนี้ เซลล์ที่กำลังแบ่งเซลล์ จึงหยุดอยู่ที่ระยะเมทาเฟสซึ่งเป็นระยะที่โครโมโซมมีการอัดแน่นมากที่สุดใน และเป็นโครโมโซมที่ใช้ในการจัดแคโรไทป์

ไมโครแซทเทลไลต์หรือ STR (short tandem repeats) คือลำดับเบสซ้ำที่มีความผันแปร (polymorphism) หน่วยซ้ำมีความยาวตั้งแต่ 2 ถึง 7 เบส ความยาวของลำดับเบสตามตำแหน่งของลำดับเบสบนดีเอ็นเอ การวิเคราะห์ลำดับไมโครแซทเทลไลต์สามารถใช้ในการศึกษาด้านความสัมพันธ์และวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตได้ พบในจีโนมสิ่งมีชีวิตทั่วไป รวมถึงในจีโนมของมนุษย์

Microsatellites เป็นเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่สามารถใช้ในการศึกษาพันธุศาสตร์ประชากร (Population genetics) Conservation Biology และ Evolutionary Biology รูปแบบของการกระจายของลำดับเบสดีเอ็นเอ (arrays) ประกอบด้วยลำดับเบสซ้ำ (tandem repeats) ซึ่งมีหน่วยย่อยขนาดแตกต่างกัน ได้แก่ mono- di- tri และ Tetranucleotides กระจายอยู่ทั่วทั้งจีโนมของสิ่งมีชีวิต โดยเฉพาะสิ่งมีชีวิตจำพวกยูแคริโอต microsatellites DNA มีรูปแบบการถ่ายทอดแบบ Codominant มีความผันแปร (Polymorphism) จึงมีความสำคัญในการศึกษาพันธุศาสตร์ประชากรในแง่ของความสัมพันธ์ระหว่างสิ่งมีชีวิตชนิด ส่วนใหญ่เป็น non-coding regions ดังนั้นความหลากหลายของลำดับเบสดังกล่าวจึงขึ้นอยู่กับคัดเลือกทางธรรมชาติ (natural selection) (Abdullah-Muneer, 2014) นอกจากนั้นยังพบว่าบริเวณไมโครแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอเป็นบริเวณที่ไม่เกิดการถอดรหัส (transcription) ยังไม่ทราบหน้าที่ชัดเจน (Alberts, 2002)

FISH เป็นวิธีการศึกษาพันธุศาสตร์ของเซลล์ในระดับโมเลกุล เพื่อตรวจสอบตำแหน่งของลำดับเบสที่จำเพาะบนโครโมโซม การศึกษาโดยใช้เทคนิค FISH นำมาใช้ศึกษาครั้งแรกโดย Gall และ Pardue

(1969) หลังจากนั้นมีการปรับเปลี่ยนวิธีการศึกษาเรื่อยมา จนกระทั่งได้เทคนิคที่สามารถนำมาใช้ได้จริงในปัจจุบันและให้ชื่อว่า FISH ที่ย่อมาจาก Fluorescence in situ Hybridization ปัจจุบันใช้ในการตรวจสอบลำดับเบสหรือยีนบนโครโมโซมของผู้ป่วย เพื่อวินิจฉัยโรคทางพันธุกรรม (O'Connor, 2008) เทคนิค FISH มีหลักการพื้นฐาน 3 ประการ คือ Denaturation Hybridization และ Visualization คือ การทำให้ดีเอ็นเอที่ศึกษาเสียสภาพจากดีเอ็นเอสายคู่เป็นสายเดี่ยว โดยอาศัยความร้อน จากนั้นทำการบ่ม DNA probes ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ และเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวบ่มร่วมกับดีเอ็นเอที่ศึกษา เพื่อให้เกิดการสร้างพันธะไฮโดรเจนระหว่างเบสคู่สม เรียกกระบวนการนี้ว่า Hybridization เกิดจากกระบวนการ renaturation จากนั้นทำการตรวจสอบสัญญาณของ DNA probes โดยส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์

2.2 พันธุศาสตร์เซลล์ของตุ๊กแก

Shibaika และคณะ (2009) ศึกษาโครโมโซมของสัตว์เลื้อยคลานในสกุล *Gekko* มีการกระจายพันธุ์ในเขตเอเชียและ Oceania ซึ่งแต่ละชนิดมีแคโรไทป์ที่แตกต่างกัน จำนวนโครโมโซม $2n=38$ บางชนิดในสกุลนี้มีจำนวนโครโมโซมที่แตกต่างออกไป เช่น *G. siamensis* $2n=40$ *G. lionotum* $2n=42$ แต่สัตว์เลื้อยคลานส่วนใหญ่ในสกุลนี้ส่วนใหญ่มีจำนวนโครโมโซม $2n=38$ อย่างไรก็ตามการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้แสดงให้เห็นถึงความแปรผันทางด้านจำนวนของโครโมโซมในสัตว์เลื้อยคลานสกุล *Gekko*

Kawia และคณะ (2009) ศึกษาวิวัฒนาการของโครโมโซมของสัตว์เลื้อยคลานในประเทศบราซิล (Brazilian Lizards) ในสกุล *Leposoma* ในระดับโมเลกุล โดยเทคนิค FISH (Fluorescence in situ Hybridization) เพื่อศึกษาดำแหน่งเทโลเมียร์บนโครโมโซม

Gray (1827) บรรยายลักษณะพื้นฐาน (basic character) ของสัตว์เลื้อยคลาน ในวงศ์ Gekkonidae สกุล *Cyrtodactylus* หรือตุ๊กแกป่า

Trifonov และคณะ (2011) ศึกษาวิวัฒนาการของแคโรไทป์ ในบริเวณ Homologous regions โดยใช้เทคนิค Flow-sorted Chromosome-specific painting ทำให้ทราบลำดับความเป็นมาของโครโมโซม จากการเชื่อมรวมกันของโครโมโซม (fusion) และการหักของโครโมโซม (fission)

Hidetoshi และคณะ (2014) ศึกษาแคโรไทป์ของสัตว์เลื้อยคลานในวงศ์ Gekkonidae สกุล *Cyrtodactylus* หรือสกุลตุ๊กแกป่า จำนวน 2 ชนิด ได้แก่ *C. consobrinus* และ *C. pubisulcus* พบว่ามีจำนวนโครโมโซมเท่ากับ $2n=48$ และ $2n=42$ ตามลำดับ และยังพบโครโมโซมเพศในสัตว์เลื้อยคลานทั้ง 2 ชนิด ซึ่งเป็นโครโมโซมเพศระบบ ZW และจัดเป็น heteromorphic sex chromosome ลำดับเบส GATA tetranucleotide ซึ่งจัดเป็น Microsatellites DNA พบว่าเป็นลำดับเบสที่มีการสะสมมากบนโครโมโซม W ซึ่งเป็นโครโมโซมเพศ ซึ่งส่วนใหญ่พบในสัตว์เลื้อยคลานจำพวกงู

Ezaz และคณะ (2010) ระบบการจำแนกเพศของสัตว์เลื้อยคลานยังไม่ชัดเจน เนื่องจากสิ่งมีชีวิตในกลุ่มนี้มีความหลากหลายด้านกลไกการจัดจำแนกเพศ (sex determining mechanism) ซึ่งแบ่งออกเป็น

2 ระบบ ได้แก่ 1. TSD หรือ Temperature-dependent sex determination ซึ่งเป็นการกำหนดเพศที่เกิดขึ้นจากปัจจัยของสิ่งแวดล้อม (environmental influence) GSD หรือ genotypic sex determination ซึ่งเป็นการกำหนดเพศที่เกิดขึ้นจากปัจจัยของสารพันธุกรรม (genetics factor)

2.3 การเตรียมโครโมโซม

การศึกษาโครโมโซมเพื่อตรวจสอบจำนวน และรูปร่างของโครโมโซมมีหลายวิธี แต่ละวิธีจะเลือกเอาเซลล์ระยะเมทาเฟส (metaphase) เนื่องจากเป็นระยะที่มีโครโมโซมหดสั้นมากที่สุดเห็นรูปร่างได้ชัดเจน ในการเก็บเกี่ยวเซลล์ในระยะเมทาเฟส ได้ใช้สารโคลชิซิน (colchicine) ซึ่งเป็นสารสกัดจากพืชสกุล *Colchicum* มาใช้เพื่อยับยั้งการสร้างสายใยสปินเดิล (spindle fiber) ทำให้เซลล์ที่มีการแบ่งตัวไม่สามารถเข้าสู่ระยะแอนาเฟส (anaphase) ได้ วิธีการเตรียมโครโมโซมแบ่งได้เป็น 2 วิธี คือ วิธีโดยตรง (direct chromosome preparation) เป็นวิธีที่เลือกเอาเซลล์ในร่างกายที่กำลังมีการแบ่งตัวมาศึกษาโครโมโซม เป็นเซลล์ที่ยังอ่อนและยังมีการแบ่งตัวอยู่ตลอดเวลา เช่น เซลล์เม็ดเลือดจากไขกระดูก (bone marrow) อีกวิธี คือ วิธีโดยอ้อม (indirect chromosome preparation) จะเลือกเซลล์ในร่างกายชนิดที่สามารถนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ภายนอกร่างกาย (*in vitro*) ให้เซลล์มีการแบ่งตัว หรือใช้สารกระตุ้นการแบ่งเซลล์

การเพาะเลี้ยงเซลล์ยังแบ่งได้เป็น 2 แบบ แบบที่หนึ่งเป็นการเพาะเลี้ยงเซลล์ใช้เวลานาน (long term culture) เป็นการนำเซลล์ร่างกาย เช่น เซลล์ผิวหนัง ปอด ตับ เซลล์ที่นำมาเพาะเลี้ยงจะมีเฉพาะเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (fibroblast) ที่เจริญแบ่งเซลล์มากมาย แบบที่สอง เป็นการเพาะเลี้ยงเซลล์ใช้ระยะเวลาสั้น (short term culture) ได้แก่ การเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาว (lymphocyte) โดยนำเลือด (whole blood) ที่มีเซลล์เม็ดเลือดขาวซึ่งเป็นเซลล์ที่แก่หรือหยุดแบ่งตัวแล้วมากระตุ้นให้เซลล์กลับสู่วัฏจักรการแบ่งเซลล์ (cell cycle) แบบไมโทซิส (mitosis) ในปี ค.ศ. 1949-1955 Osgood ได้พัฒนาเทคนิคเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวโดยเติมสารกระตุ้นการแบ่งเซลล์ คือ phytohemagglutinin (PHA) เป็นสารประเภท mitotic stimulating agent ช่วยเหนี่ยวนำให้เซลล์เม็ดเลือดขาวมีพฤติกรรมการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสได้ ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเซลล์ 3 วัน จะได้เซลล์เมทาเฟสมากเพียงพอในการศึกษา ซึ่งเป็นข้อดี ได้ผลรวดเร็ว เทคนิคการทำงาน ไม่ค่อยมีปัญหาด้าน ติดเชื้อ และค่าใช้จ่ายน้อย นอกจาก PHA ที่ใช้ได้กับสัตว์ กินเนื้อแล้ว ต่อมา มีการค้นพบและใช้สารกระตุ้นการแบ่งเซลล์เพิ่มขึ้นอีกหลายชนิด เช่น pokeweed (PW) และ concanavalin A (Con A) ที่สามารถกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดบี (B-lymphocyte) ได้ดี และเหมาะสมกับสัตว์กินพืชมากกว่า แต่การศึกษาในขณะนั้นยังนับจำนวนโครโมโซมได้ไม่แน่นอนภายหลังได้ใช้สาร hypotonic solution ให้กับเซลล์ช่วยทำให้เซลล์พองตัวมากขึ้น มีการกระจายตัวของโครโมโซมดี ทำให้การตรวจนับจำนวนและรูปร่างชัดเจนยิ่งขึ้น (อมรา คัมภีรานนท์, 2546)

2.4 การย้อมสีโครโมโซม

การเตรียมโครโมโซมโดยการเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาว เก็บเกี่ยวเซลล์และหยดเซลล์ลงบนสไลด์ ทำการย้อมสีโดยเลือกวิธีตามวัตถุประสงค์ของการศึกษา (Halnan, 1989) ดังนี้

2.4.1 การย้อมสีโครโมโซมแบบธรรมดา

จะใช้สีย้อมที่ติดโปรตีนฮิสโตน (histone) บนโครโมโซม โดยสีที่นิยมใช้ได้แก่ ออร์ซีน (orcein) คาร์มิน (carmine) และจิมซ่า (Giemsa's) ภาพโครโมโซมจะติดสีตลอดทั้งสามารถบอกจำนวนและชนิดของโครโมโซมประจำสิ่งมีชีวิตนั้น ๆ ได้ และอาจบอกลักษณะบางอย่างของโครโมโซม เช่น รอยคอดที่หนึ่ง (primary constriction) รอยคอดที่สอง (secondary constriction) และ แซทเทลไลท์ (satellite)

2.4.2 การย้อมแถบสีแบบคิว (Q-banding)

วิธีนี้ย้อมโครโมโซมให้เกิดแถบมืด และสว่างเป็นช่วง ๆ ตลอดความยาวแท่งโครโมโซมได้ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence microscope) โดยใช้สีย้อมชนิด Quinacrine mustard ทำให้สามารถจำแนกความแตกต่างของโครโมโซมทุกแท่งได้

2.4.3 การย้อมแถบสีแบบซี (C- banding)

เป็นเทคนิคที่ทำให้แถบสีเข้มบริเวณที่โครโมโซมหดตัวกันแน่น (constitutive heterochromatin) มีคุณสมบัติเป็นลำดับเบสที่ซ้ำกันมากๆ (highly repetitive DNA sequence) ซึ่งได้แก่ บริเวณเซนโทรเมียร์ (centromere) ของเกือบทุก ๆ โครโมโซม นอกจากนี้ยังพบที่บริเวณเทโลเมียร์ (telomere) ของโครโมโซมบางแท่งอีกด้วย

2.4.4 การย้อมแถบสีแบบจี (G-banding)

เทคนิคนี้เหนี่ยวนำให้เกิดแถบโดยใช้สารเคมีที่สามารถย่อยโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของโครโมโซม สารเคมีที่นิยมใช้ คือ เอนไซม์ทริปซิน (trypsin) แล้วจึงย้อมด้วยสีจิมซ่าตามปกติ จะทำให้เกิดแถบสีเข้มสลับกับจางเนื่องจากคุณสมบัติที่ต่างกันในแต่ละบริเวณบนแท่งโครโมโซมเป็นเทคนิคที่นิยมทำกันมากที่สุด เพราะเป็นเทคนิคที่ทำได้ง่าย ลักษณะของแถบมีความคงตัว

2.4.5 การย้อมแถบสีแบบอาร์ (R-banding)

เป็นเทคนิคที่เกิดแถบสีเข้ม และจางสลับกันเช่นเดียวกับแถบสีแบบคิว และแถบสีแบบจี แต่แถบสีที่เกิดขึ้นจะตรงข้ามกับแถบสีแบบคิว และแถบสีแบบจี คือ แถบที่ติดสีเข้มในแถบสีแบบคิว และแถบสีแบบจีจะติดสีจางแทนในแถบสีแบบอาร์

2.4.6 การย้อมแถบสีแบบนอร์

เป็นเทคนิคที่ทำให้ส่วน nucleolar organizer regions (NORs) ติดสีเข้ม โดยการใช้สารละลายซิลเวอร์ไนเตรต (silver nitrate) ในสัตว์มีกระดูกสันหลังส่วนนี้มีถิ่นสำหรับสังเคราะห์ ribosomal RNA ชนิด 18s และ 28s อยู่ ปฏิบัติการย้อมด้วยซิลเวอร์จะจำเพาะกับตำแหน่งนี้ เนื่องจากบริเวณดังกล่าวมีการแสดงออกของยีนเป็นอย่างมาก และบริเวณนั้นจะมีโปรตีนเป็นองค์ประกอบที่ไม่ใช่

โปรตีนฮิสโตนมากกว่าบริเวณอื่นของโครโมโซม โปรตีนเหล่านี้จึงทำให้เกิดแถบสีที่จำเพาะเนื่องจากจะไปรีดิวซ์ (reduce) ซิลเวอร์ในรูปไอออนิก (ionic) ทำให้ซิลเวอร์เปลี่ยนเป็นสีดำ ตำแหน่งนอร์ส่วนใหญ่จะพบบนบริเวณรอยคอดที่ 2 ทำให้แขนส่วนที่เหลือเป็นกระเปาะเล็ก ๆ โครโมโซมที่มีรอยคอดที่สองนี้เรียกว่าแซทเทลไลต์โครโมโซม (satellite chromosome หรือ SAT-chromosome) ซึ่งใช้เป็นโครโมโซมเครื่องหมาย (marker chromosome) ได้

2.4.7 การย้อมสีบนโครโมโซมด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์อินซิทูไฮบริไดเซชัน (fluorescence *in situ* hybridization หรือ FISH)

เทคนิค FISH นี้เป็นเทคนิคที่ทำให้เกิดการเข้าคู่หรือไฮบริไดซ์ (hybridize) ระหว่างโพรบ (probe) และ ดีเอ็นเอเป้าหมาย (target DNA) ซึ่งอยู่ภายในโครโมโซม โพรบที่ใช้มักเป็นดีเอ็นเอ หรืออาร์เอ็นเอ (DNA probe หรือ RNA probe) ซึ่งติดฉลาก (label) ด้วยสารเรืองแสง (fluorocetin หรือ fluorophore) มีหลายสี การตรวจสอบจะทำให้เห็นสีหลายสีบนแท่งโครโมโซมทำให้ดูเหมือนการระบายสีบนโครโมโซม จึงนิยมเรียกเทคนิค FISH อีกอย่างหนึ่งว่า “chromosome painting”

การย้อมแถบสีโครโมโซมแบบต่าง ๆ นี้มีประโยชน์ช่วยในการจับคู่โครโมโซมคู่เหมือน (homologous chromosome) ช่วยตรวจสอบเอกลักษณ์ของโครโมโซม ความผิดปกติของโครโมโซม พฤติกรรมของโครโมโซม และช่วยในการจำแนกสิ่งมีชีวิตได้ถูกต้องยิ่งขึ้น การเปรียบเทียบทางพันธุศาสตร์เซลล์ (comparative cytogenetics) ยังเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สามารถช่วยอธิบายวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตได้ (Rooney, 2001; อมรา คัมภีรานนท์, 2546)

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 การเตรียมโครโมโซมจากไขกระดูก

1. ฉีดสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.1 mg/mL ปริมาณ 5% ของน้ำหนักตัวของสัตว์ตัวอย่าง ฉีดเข้าบริเวณช่องท้อง ปลอ่ยสัตว์ตัวอย่างทิ้งไว้ 1-2 ชั่วโมง เพื่อให้สารละลายทำงาน
2. ทำการการุณยฆาตสัตว์ตัวอย่าง โดยใช้ปลายเข็มเขี่ยกดลงบริเวณรอยต่อระหว่างหัวและลำตัว จากนั้นทำการผ่าตัดเอาเฉพาะส่วนกระดูกท่อนยาวบริเวณแขนและขาของสัตว์ตัวอย่าง
3. สับกระดูกให้เป็นชิ้นเล็กที่สุดเท่าที่จะทำได้ โดยใช้กรรไกรผ่าตัด ระหว่างการสับกระดูกต้องอยู่ในสารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1% จนกระทั่งกระดูกละลายสารละลายมีลักษณะคล้ายคอลลอยด์
4. ย้ายสารผสมระหว่างกระดูกและสารละลายลงในหลอดเซนตริฟิวซ์ขนาด 15 มิลลิลิตร เติมสารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.01%จนกระทั่งได้ปริมาตร 7 มิลลิลิตร บ่มทิ้งไว้ ณ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์เกิดกระบวนการออสโมติกช็อค
5. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3000 rpm นาน 6 นาที จากนั้นดูดส่วนใสออก แล้วค่อยๆเติมน้ำยาตรึงเซลล์ลงไปจนกระทั่งได้ปริมาตร 7 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบเท่าเดิม กระทำเช่นเดียวกันนี้อีก 2 รอบ
6. สารผสมที่ได้สามารถเติมน้ำยาตรึงเซลล์ และรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ได้เป็นระยะเวลานาน

3.2 การเตรียมสไลด์เพื่อศึกษาโครโมโซม

1. หยดน้ำยาตรึงเซลล์ลงบนสไลด์ 1-2 หยด เช็ดด้วยกระดาษไรเอื่อ เพื่อทำความสะอาดสไลด์
2. นำสารผสมเซลล์และน้ำยาตรึงเซลล์ที่เก็บไว้ มาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3000 rpm นาน 6 นาที จากนั้นดูดส่วนใสออก เหลือส่วนที่เป็นชั้นของเซลล์ไว้แล้วทำการผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน
3. หยดเซลล์ลงบนสไลด์ 1-2 หยด ให้ระยะการหยดอยู่สูงจากแผ่นสไลด์ประมาณ 2 นิ้ว เพื่อให้โครโมโซมกระจายตัวดีและง่ายต่อการศึกษา หยดน้ำยาตรึงเซลล์ตามอย่างรวดเร็ว 1-2 หยด
4. ทำให้แห้งโดยนำแผ่นสไลด์วางบนฮอตเพลตที่คลุมด้วยผ้าขาวชุ่มน้ำ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส
5. ปลอ่ยสไลด์ให้แห้ง ณ อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 1-2 วัน เพื่อให้โครโมโซมมีความคงตัวมากพอที่จะนำเข้าสู่การทดลองในขั้นตอนต่อไป

หมายเหตุ: การเตรียมสไลด์เพื่อศึกษาโครโมโซมปรับปรุงจากวิธีการของแทนอมทอง (2554)

3.3 การย้อมสีโครโมโซม

3.3.1 การย้อมแบบธรรมดา

1. แอสไลด์ที่ผ่านการหยดเซลล์ลงในสี Giemsa's ประมาณ 15-20 นาที
2. ล้างสีส่วนเกินออกโดยจุ่มสไลด์ลงในภาชนะที่เปิดให้น้ำไหลผ่านตลอดเวลา ปล่อยสไลด์ให้แห้ง
3. ตรวจสอบโครโมโซมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงธรรมดา ใช้กำลังขยายรวม 400X เพื่อค้นหาเซลล์ในระยะเมทาเฟส และใช้กำลังขยายรวม 1000X เพื่อถ่ายภาพโครโมโซม ถ่ายภาพโครโมโซมจำนวน 20 เมทาเฟส
4. ใช้โปรแกรม Adobe Photoshop (CS3) ตัดโครโมโซม แล้วทำแคโรไทป์ เรียงโครโมโซมตามขนาดจากขนาดเล็ก ขนาดกลาง และขนาดใหญ่ตามลำดับ จากนั้นเรียงโครโมโซมตามรูปร่างของโครโมโซมจากโครโมโซมแบบเมทาเซนทริก โครโมโซมแบบซันเมทาเซนทริก โครโมโซมแบบเทโลเซนทริก และโครโมโซมแบบอะโครเซนทริก ตามลำดับ
5. วัดขนาดของแขนแต่ละข้างของโครโมโซมแต่ละแท่ง โดยใช้เครื่องมือ ruler โปรแกรม Adobe Photoshop (CS3) หาค่าเฉลี่ยของค่าต่าง ๆ จากโครโมโซมในระยะเมทาเฟส 20 รูป โดยใช้โปรแกรม Microsoft Excel (2010)

3.3.2 การย้อมแถบสีแบบบอร์

- ดัดแปลงจากวิธีการ Howell and Black (1980) ดังนี้
1. หยดเจลาตินความเข้มข้น 50% ลงบนสไลด์ที่ผ่านการหยดเซลล์ 1-2 หยดต่อหนึ่งหยดเซลล์
 2. หยดสารละลายซิลเวอร์ไนเตรดความเข้มข้น 50% ลงบนหยดเจลาติน
 3. บ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 60-65°C เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง
 4. ล้างสไลด์ลงในภาชนะที่เปิดให้น้ำไหลผ่านตลอดเวลา ปล่อยสไลด์ให้แห้ง
 3. ตรวจสอบโครโมโซมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงธรรมดา ใช้กำลังขยายรวม 400X เพื่อค้นหาเซลล์ในระยะเมทาเฟส และใช้กำลังขยายรวม 1000X เพื่อถ่ายภาพโครโมโซม ถ่ายภาพโครโมโซมที่ปรากฏ NORs ชัดเจน

3.3.3 ขั้นตอนการทำ FISH

Denaturation ดีเอ็นเอที่ศึกษา และโพรบ และ Hybridization

1. นำสไลด์ที่เตรียมไว้ก่อนหน้านี้ ตั้งน้ำออกด้วยการแช่ในแอลกอฮอล์ 70% 95% และ 100% ขั้นตอนละ 3 นาที ปล่อยสไลด์ให้แห้ง ณ อุณหภูมิห้อง
2. นำสไลด์ไปบ่มที่ อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง
3. แอสไลด์ใน coupling jar ที่มีส่วนผสมของ สารละลายเปปซิน น้ำ DI 95 มิลลิลิตร และ สารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.2 M ปริมาตร 5 มิลลิลิตร อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (วาง

coupling jar ลงใน water bath จนกระทั่งได้อุณหภูมิที่ต้องการ แล้วค่อยเติมสารละลายเปปซิน) เป็นระยะเวลา 3 นาที

4. เทสารละลายที่มีส่วนผสมของเปปซินออก เทสารละลาย PBS ความเข้มข้น 1X แทนที่ปล่อยทิ้งไว้ 5 นาที

5. หยดสาร Post-Fixation ปริมาณ 100 ไมโครลิตร ลงบนสไลด์ขนาด 32x60 มิลลิเมตร จากนั้นนำแผ่นสไลด์โครโมโซมด้านที่มีเซลล์ปิดทับลงไป แล้วหงายแผ่นสไลด์ด้านที่มีแผ่นปิดสไลด์ขึ้น ปล่อยทิ้งไว้ 10 นาที

6. เอาแผ่นปิดสไลด์ออก จากนั้นนำสไลด์ลงแช่ใน coupling jar ที่มีสารละลาย PBS ความเข้มข้น 1X นาน 5 นาที

7. ดึงน้ำออกด้วยการแช่ในแอลกอฮอล์ 70% 95% และ 100% ขึ้นตอนละ 3 นาที ปล่อยสไลด์ให้แห้ง ณ อุณหภูมิห้อง

8. หยดสารละลาย Formamide ปริมาณ 100 ไมโครลิตร ลงบนสไลด์ขนาด 32x60 มิลลิเมตร จากนั้นนำแผ่นสไลด์โครโมโซมด้านที่มีเซลล์ปิดทับลงไป แล้วหงายแผ่นสไลด์ด้านที่มีแผ่นปิดสไลด์ขึ้น แล้ววางสไลด์บนฮอตเพลตอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที

9. นำแผ่นปิดสไลด์ออก แล้วจุ่มสไลด์ลงในเอทานอล 70% เย็น -20 องศาเซลเซียสทันที ทิ้งไว้ 3 นาที จากนั้นดึงน้ำออกด้วยการแช่ในแอลกอฮอล์ 95% และ 100% ขึ้นตอนละ 3 นาที ปล่อยสไลด์ให้แห้ง ณ อุณหภูมิห้อง ขณะที่ดึงน้ำออก ทำการ Denaturation Probe โดยนำ โพรบปริมาณ 2 ไมโครลิตร ผสมกับ Denaturing solution ปริมาณ 18 ไมโครลิตร ต่อหนึ่งสไลด์ เรียกสารผสมนี้ว่า Hyb-mix โดยใช้เครื่อง thermocycler ตั้งอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 8 นาที

10. หยด Hyb-mix ลงบนสไลด์ที่แห้งสนิท ลงบนบริเวณที่มีเซลล์อยู่หนาแน่น ปิดด้วยแผ่นปิดสไลด์ ในกรณีที่เปปซินติดที่ยากต่อการ Hybridization ควรปิดขอบแผ่นปิดสไลด์ด้วย semen rubber

11. นำไปไว้ในตู้อบอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ให้สภาวะชื้นโดย นำสไลด์ใส่ในกล่องปิดที่มีกระดาษเปียกน้ำ ทิ้งไว้ข้ามคืน เพื่อให้ Probe และ ดีเอ็นเอที่ศึกษา Hybridization

ล้างโพรบส่วนเกิน และย้อมด้วย DAPI

1. นำแผ่นปิดสไลด์ออกจากสไลด์ แล้วจุ่มลงใน coupling jar ที่มีสารละลาย SSC ความเข้มข้น 1X ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส โดย water bath นาน 5 นาที

2. เทสารละลายใน coupling jar เดิมทิ้ง แล้วเติมสารละลาย SSC ความเข้มข้น 4X ที่ผสม Tween ลงแทนที่ เขย่า coupling jar โดยใช้เครื่องเขย่าสาร นาน 5 นาที

เทสารละลายเดิมทิ้งอีกครั้ง แล้วแทนที่ด้วยสารละลาย PBS ความเข้มข้น 1x นาน 1 นาที พร้อมเขย่า

3. ดึงน้ำออกด้วยการแช่ในแอลกอฮอล์ 70% 95% และ 100% ขึ้นตอนละ 3 นาที ปล่อยให้แห้ง ณ อุณหภูมิห้อง
4. หยด DAPI ลงบนสไลด์แต่ละแผ่น ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์
5. ตรวจสอบผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์ Fluorescence

3.4 การตรวจสอบโครโมโซม การจัดทำแคริโอไทป์ และการทำอิดิโอแกรมมาตรฐาน

การตรวจสอบโครโมโซม จัดทำแคริโอไทป์ และอิดิโอแกรมมาตรฐาน ดัดแปลงจากวิธีการของ Turpin and Lejeune (1965)

3.4.1 การตรวจสอบโครโมโซม

เลือกเซลล์ที่มีโครโมโซมระยะเมทาเฟสกระจายตัวดีไม่ซ้อนทับกัน นำมาถ่ายภาพโครโมโซมโดยใช้เลนส์วัตถุกำลังขยาย 100X โดยใช้ชุดถ่ายภาพที่ต่อกับกล้องจุลทรรศน์ หรือใช้กล้องดิจิทัล เพื่อตรวจนับจำนวนโครโมโซมจากภาพถ่ายโครโมโซม จำนวน 100 เซลล์ ความถี่ของจำนวนโครโมโซมที่พบมากที่สุด จะเป็นค่าของจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ของสิ่งมีชีวิตนั้น ๆ จากนั้นจับคู่โครโมโซมที่เหมือนกัน (homologous chromosome) และศึกษาโครโมโซมโดยการหาความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาว (long arm; LL) ความยาวของแขนโครโมโซมข้างสั้น (short arm; Ls) และคำนวณหาความยาวของโครโมโซมแต่ละแท่ง (total length; LT, $LT = LL + Ls$) คำนวณค่า relative length (RL) และ centromeric index (CI) เพื่อระบุชนิดของโครโมโซม และนำค่าที่ได้ไปใช้ประกอบในการจัดทำแคริโอไทป์ และอิดิโอแกรม

3.4.2 การจัดทำแคริโอไทป์

ใช้รูปถ่ายที่ได้ในการจับคู่โครโมโซมที่เหมือนกัน โดยการกำหนดตำแหน่งเซนโทรเมียร์ของโครโมโซมแต่ละแท่งในเซลล์ วัดค่าความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาว ค่าความยาวของแขนโครโมโซมข้างสั้น นำค่าที่ได้มาคำนวณหาความยาวของโครโมโซมแต่ละแท่ง จัดเรียงแคริโอไทป์ ให้เรียงตามความยาวของโครโมโซมแต่ละคู่จากมากไปหาน้อย ยกเว้นโครโมโซมเพศจะวางเป็นคู่สุดท้ายมุมล่างซ้ายเสมอ ต้องบอกหมายเลขของโครโมโซมแต่ละคู่ด้านล่าง วางแท่งโครโมโซมให้แขนข้างสั้นอยู่ด้านบน แขนข้างยาวอยู่ด้านล่าง

ขั้นตอนการจัดทำแคริโอไทป์

1. เลือกเซลล์ในระยะเมทาเฟส ที่มีขนาดของโครโมโซมไม่ยาวหรือสั้นเกินไป มีการกระจายที่ดีไม่ซ้อนทับกัน และนับจำนวนโครโมโซมได้ครบเท่ากับจำนวนโครโมโซมของสิ่งมีชีวิตชนิดนั้น ถ่ายภาพเซลล์ที่เลือกไว้โดยใช้เลนส์วัตถุกำลังขยาย 100X เลือกมาจัดจำนวน 20 เซลล์
2. ใช้รูปถ่ายที่ได้ในการจับคู่โครโมโซมที่เหมือนกัน โดยการกำหนดตำแหน่งของเซนโทรเมียร์ของโครโมโซมแต่ละแท่งในเซลล์ จากนั้นวัดค่าความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาว ค่าความยาวของแขน

โครโมโซมข้างสั้น นำค่าที่ได้มาคำนวณหาความยาวของโครโมโซมแต่ละแท่ง การวัดค่าความยาวของโครโมโซมอาจจะใช้วิธีการตัดโครโมโซมออกมาจากรูปถ่ายที่ละแท่ง กำหนดหมายเลขให้โครโมโซมทุกแท่งก่อนการวัด เมื่อวัดความยาวเสร็จแล้วจึงจับคู่โครโมโซมที่มีความยาวของแขนแต่ละข้าง และความยาวทั้งแท่งใกล้เคียงกันมากที่สุด

3. การคำนวณหาค่า relative length (RL) คำนวณได้จากสูตรดังนี้

$$\text{ค่า relative length (RL)} = \frac{\text{ความยาวของโครโมโซมแต่ละแท่ง (LT)}}{\text{ความยาวทั้งหมดของโครโมโซมทุกแท่ง (\sum LT)}}$$

การใช้ค่า RL นี้สามารถช่วยในการจับคู่โครโมโซมได้แน่นอนกว่าการใช้ค่าความยาวของโครโมโซม เพราะค่า RL ของโครโมโซมแต่ละแท่งจะคงที่ในทุก ๆ เซลล์ ส่วนค่าความยาวของโครโมโซมจะแตกต่างกันไปในเซลล์แต่ละเซลล์

4. การคำนวณหาค่า centromeric index (CI) คำนวณได้จากสูตรดังนี้

$$\text{ค่า centromeric index (CI)} = \frac{\text{ความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาว (LI)}}{\text{ความยาวของโครโมโซมแต่ละแท่ง (LT)}}$$

นำค่า CI ที่ได้นำมาระบุชนิดของโครโมโซม โดยใช้เกณฑ์ ดังนี้

ค่า CI อยู่ระหว่าง 0.500–0.599 จัดเป็นโครโมโซมชนิดเมทาเซนทริก

ค่า CI อยู่ระหว่าง 0.600–0.699 จัดเป็นโครโมโซมชนิดซับเมทาเซนทริก

ค่า CI อยู่ระหว่าง 0.700–0.899 จัดเป็นโครโมโซมชนิดอะโครเซนทริก

ค่า CI อยู่ระหว่าง 0.900–1.000 จัดเป็นโครโมโซมชนิดเทโลเซนทริก

5. การกำหนดขนาดของโครโมโซม แบ่งขนาดของโครโมโซมออกเป็น 3 ขนาด โดยกำหนดให้โครโมโซมคู่ที่ยาวที่สุดเป็นโครโมโซมคู่ที่ 1 และโครโมโซมคู่ที่สั้นที่สุดเป็นโครโมโซมคู่สุดท้าย

โครโมโซมขนาดใหญ่ (large=L) คือ โครโมโซมที่มีความยาวมากกว่าครึ่งหนึ่งของผลบวกความยาวเฉลี่ยของโครโมโซมใหญ่สุด รวมกับโครโมโซมคู่เล็กที่สุด

$$\text{ดังนั้น } L > \frac{\text{เฉลี่ยคู่ที่ 1} + \text{เฉลี่ยคู่สุดท้าย}}{2}$$

โครโมโซมขนาดกลาง (medium=M) คือ โครโมโซมที่มีค่าความยาวน้อยกว่าครึ่งหนึ่งของความยาวเฉลี่ยของโครโมโซมใหญ่สุด รวมกับโครโมโซมคู่เล็กที่สุด

$$\text{ดังนั้น } M < \frac{\text{เฉลี่ยคู่ที่ 1} + \text{เฉลี่ยคู่สุดท้าย}}{2}$$

โครโมโซมขนาดเล็ก (small=S) ได้แก่ โครโมโซมที่มีความยาวน้อยกว่าครึ่งหนึ่งของความยาวเฉลี่ยของโครโมโซมคู่ใหญ่สุด

ดังนั้น $S < LT$ เฉลี่ยคู่ที่ 1

2

6. จัดเรียงแคริโอไทป์ ให้เรียงตามความยาวของโครโมโซมแต่ละคู่จากมากไปหาน้อย ยกเว้นโครโมโซมเพศจะวางเป็นคู่สุดท้ายมุมล่างซ้าย ต้องบอกหมายเลขของโครโมโซมแต่ละคู่ด้านล่างวางแท่งโครโมโซมให้แขนข้างสั้นอยู่ด้านบน แขนข้างยาวอยู่ด้านล่าง และนิยมวางแท่งโครโมโซมให้ตำแหน่งเซนโทรเมียร์ตรงกัน

3.5 การทำอิดิโอแกรมมาตรฐาน

อิดิโอแกรม คือ ไดอะแกรมแสดงแคริโอไทป์ของโครโมโซม 1 ชุดแฮพลอยด์ ซึ่งประกอบด้วยโครโมโซมร่างกาย และโครโมโซมเพศ โดยใช้ข้อมูลค่าเฉลี่ยความยาวของโครโมโซม รูปร่างของโครโมโซม และตำแหน่งเซนโทรเมียร์ อิดิโอแกรมจากเทคนิคการย้อมสีโครโมโซมแบบธรรมดาใช้เซลล์ระยะเมทาเฟส ชนิดละ 20 เซลล์ นำมาจัดแคริโอไทป์ แล้ววัดความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาว และแขนโครโมโซมข้างสั้นของโครโมโซมทุกคู่ด้วยเวอร์เนีย (vernier) จัดทำภาพวาดอิดิโอแกรมด้วยคอมพิวเตอร์ โดยการนำค่าเฉลี่ยความยาวของโครโมโซมแต่ละคู่มาสร้างกราฟโดยใช้โปรแกรม Microsoft Excel XP/2003 ให้แกนตั้ง (Y) เป็นความยาวของโครโมโซมแต่ละคู่ และแกนนอน (X) เป็นลำดับของโครโมโซมคู่ที่ใหญ่ที่สุดไปหาคู่ที่เล็กที่สุด ยกเว้นโครโมโซมเพศจัดเป็นคู่สุดท้าย แล้วนำมาปรับรูปร่างของโครโมโซมโดยใช้โปรแกรม Microsoft Word XP/2003 หรือ Microsoft Powerpoint XP/2003

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 ผลการศึกษาการกระจายพันธุ์ของตุ๊กแกป่าจารุจินต์ (*Cyrtodactylus jarujini*) และตุ๊กแกป่าดอยสุเทพ (*Cyrtodactylus doisuthep*) ในประเทศไทย

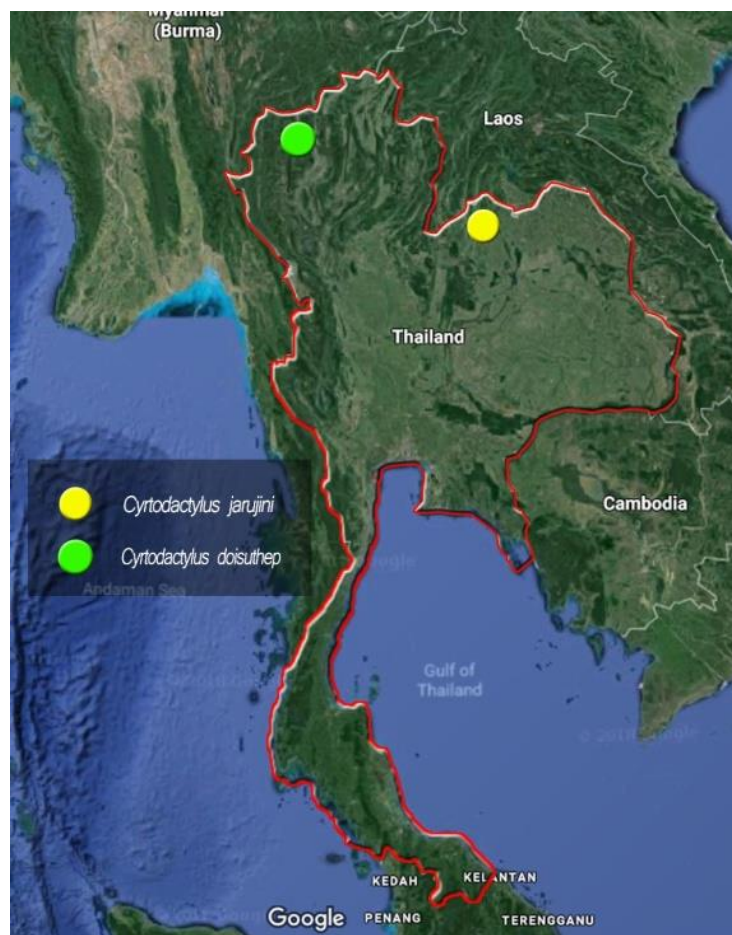
สัตว์เลื้อยคลานในลำดับ Gekkonidae จำนวน 1 สกุล ในการศึกษาครั้งนี้จำแนกออกเป็น 2 ชนิดตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา ได้แก่ *C. jarujini* และ *C. doisuthep* โดยแต่ละชนิดมีชื่อสามัญ ได้แก่ ตุ๊กแกป่าจารุจินต์ และตุ๊กแกป่าดอยสุเทพ ตามลำดับ ตุ๊กแกป่าทั้ง 2 ชนิดจัดอยู่ในลำดับ Squamata วงศ์ Gekkonidae ตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา จากการสืบค้นข้อมูลพบว่าตุ๊กแกป่าทั้ง 2 ชนิด มีรายงานการค้นพบในประเทศไทยในพื้นที่ที่แตกต่างกัน โดยตุ๊กแกป่าจารุจินต์ (*C. Jarujini*) และ ตุ๊กแกป่าดอยสุเทพ (*C. doisuthep*) มีรายงานการค้นพบในภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคเหนือ ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 1 ตุ๊กแกป่าทั้ง 2 ชนิด มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกันดังแสดงในภาพที่ 1

ตารางที่ 1 ข้อมูลทั่วไปของตุ๊กแกป่าจารุจินต์ (*C. Jarujini*) และ ตุ๊กแกป่าดอยสุเทพ (*C. doisuthep*)

ข้อมูล	ชนิดตุ๊กแกป่า	
	<i>C. jarujini</i>	<i>C. doisuthep</i>
ชื่อสามัญภาษาไทย	ตุ๊กแกป่าจารุจินต์ (Jarujin's Forest Gecko)	ตุ๊กแกป่าดอยสุเทพ (Took-kai Doi Suthep)
ชื่อสามัญภาษาอังกฤษ	Jarujin bent-toed gecko	Doi Suthep bent-toed gecko
การจัดจำแนก	Kingdom: Animalia	Kingdom: Animalia
	Phylum: Chordata	Phylum: Chordata
	Order: Squamata	Order: Squamata
	Family: Gekkonidae	Family: Gekkonidae
	Genus: <i>Cyrtodactylus</i>	Genus: <i>Cyrtodactylus</i>
	Species: <i>Cyrtodactylus jarujini</i>	Species: <i>Cyrtodactylus doisuthep</i>
การกระจายพันธุ์ในประเทศไทย	เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูวัว ภูทอก และภูสิงห์ อำเภอสรีวิไล จังหวัดบึงกาฬ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (Ulber, 1993)	ดอยสุเทพ จังหวัดเชียงใหม่ (Kunya และคณะ 2014)



ภาพที่ 1 ลักษณะทั่วไปทางสัณฐานวิทยาของ (ก) ตุ๊กแกป่าจารุจินต์ (*C. jarujini*) และ (ข) ตุ๊กแกป่าดอยสุเทพ (*C. doisuthep*)



ภาพที่ 2 แผนที่แสดงการค้นพบตุ๊กแกป่าจารุจินต์ (*C. jarujini*) และตุ๊กแกป่าดอยสุเทพ (*C. doisuthep*) ในประเทศไทย

4.2 ผลการศึกษาการศึกษาโครโมโซมของตุ๊กแกป่าจระจันต์ (*Cyrtodactylus jarujini*) และตุ๊กแกป่าดอยสุเทพ (*Cyrtodactylus doisuthep*)

4.2.1 แคริโอไทป์จากโครโมโซมที่ย้อมสีแบบธรรมดา (Conventional Staining Technique)

การจัดแคริโอไทป์ของโครโมโซมของตุ๊กแกป่า จากภาพโครโมโซมที่ผ่านการย้อมสีโครโมโซมแบบธรรมดา (conventional staining) พบว่าตุ๊กแกป่าแต่ละชนิดมีจำนวนโครโมโซมเท่ากับ 40 และ 34 แท่ง ตามลำดับ และมีจำนวนโครโมโซมพื้นฐาน (Fundamental number, NF) เท่ากับ 66 และ 61 ตามลำดับ จากการวัดความยาวเฉลี่ยของโครโมโซมจากภาพเซลล์ระยะเมทาเฟสจำนวน 20 เมทาเฟส โดยเครื่องมือ ruler โปรแกรม Adobe Photoshop (CS3) แล้วคำนวณหาค่าต่างๆ ได้แก่ Mean length of short arm chromosome (Ls), length of long arm chromosome (Ll), length of total chromosomes (LT), relative length (RL), centromeric index (CI) และ standart deviation (SD) เพื่อระบุขนาดและรูปร่างของโครโมโซม โดยใช้โปรแกรม Microsoft Excel (2010) จาก 20 เมทาเฟสในแต่ละชนิด ดังแสดงในตารางที่ 2 และ 3 สามารถเขียนสูตรแคริโอไทป์ระบุขนาดและชนิดของโครโมโซมตุ๊กแกป่าแต่ละชนิดได้ $2n$ (diploid) $40 = L^m_1 + L^{sm}_2 + L^t_3 + M^m_1 + M^t_4 + S^m_2 + S^a_2 + S^t_5$ และ $2n$ (diploid) $34 = L^{sm}_3 + L^m_2 + L^t_3 + M^m_1 + M^t_2 + S^m_4 + S^a_1 + S^t_1$ ตามลำดับ ภาพโครโมโซมในระยะเมทาเฟสและแคริโอไทป์แสดงในภาพที่ 3-6

ตุ๊กแกป่าจระจันต์ (*C. jarujini*) มีจำนวนโครโมโซมทั้งหมดเท่ากับ 40 แท่ง ประกอบด้วยโครโมโซมแบบเมทาเซนทริกขนาดใหญ่ ขนาดกลาง และขนาดเล็ก จำนวน 1, 1, 2 คู่ ตามลำดับ โครโมโซมแบบซับเมทาเซนทริกขนาดใหญ่ จำนวน 2 คู่ โครโมโซมแบบเทโลเซนทริกขนาดใหญ่ ขนาดกลาง และขนาดเล็ก จำนวน 3, 4, 5 คู่ ตามลำดับ และโครโมโซมแบบอะโครเซนทริกขนาดเล็ก จำนวน 2 คู่ ทั้งในเพศผู้และเพศเมีย ดังแสดงในภาพที่ 3-4

ตุ๊กแกป่าดอยสุเทพ (*C. doisuthep*) มีจำนวนโครโมโซมทั้งหมดเท่ากับ 34 แท่ง ประกอบด้วยโครโมโซมแบบเมทาเซนทริกขนาดใหญ่ ขนาดกลาง และขนาดเล็ก จำนวน 2, 1, 4 คู่ ตามลำดับ โครโมโซมแบบซับเมทาเซนทริกขนาดใหญ่ จำนวน 3 คู่ โครโมโซมแบบเทโลเซนทริกขนาดใหญ่ ขนาดกลาง และขนาดเล็ก จำนวน 3, 2, 1 คู่ ตามลำดับ และโครโมโซมแบบอะโครเซนทริกขนาดเล็ก จำนวน 1 คู่ ทั้งในเพศผู้และเพศเมีย ดังแสดงในภาพที่ 5-6

ตารางที่ 2 การวัดความยาวแขนของโครโมโซมตุ๊กแกป่าจารุจินต์ (*C. jarujini*) Mean length of short arm chromosome (Ls), length of long arm chromosome (Ll), length of total chromosomes (LT), relative length (RL), centromeric index (CI) และ standart deviation (SD) $2n = (\text{diploid}) 40$

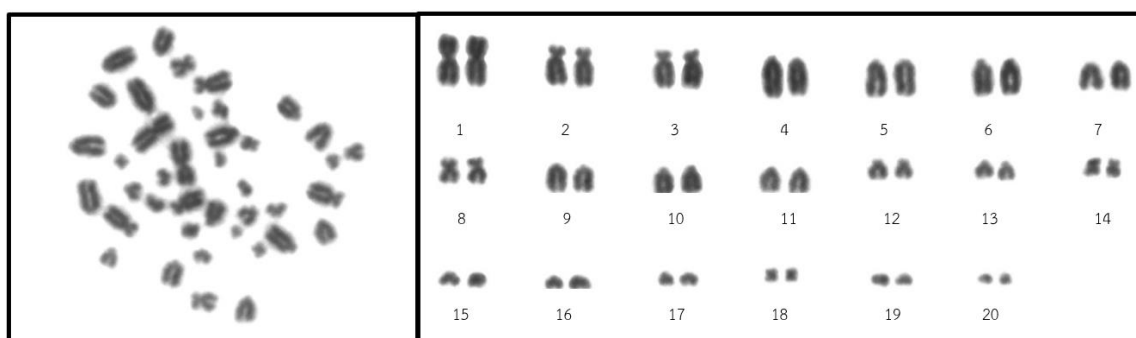
pairs	Ls	Ll	LT	CI $\pm$ SD	RL $\pm$ SD	Size	Type
1	4.690	5.915	10.605	0.557 $\pm$ 0.012	0.097 $\pm$ 0.003	Large	Metacentric
2	2.641	5.986	8.627	0.695 $\pm$ 0.017	0.078 $\pm$ 0.002	Large	submetacentric
3	2.525	5.626	8.151	0.692 $\pm$ 0.022	0.074 $\pm$ 0.001	Large	submetacentric
4	0.000	8.234	8.234	1.000 $\pm$ 0.000	0.075 $\pm$ 0.002	Large	telocentric
5	0.000	7.981	7.981	1.000 $\pm$ 0.000	0.073 $\pm$ 0.002	Large	telocentric
6	0.000	7.669	7.669	1.000 $\pm$ 0.000	0.070 $\pm$ 0.003	Large	telocentric
7	0.000	6.410	6.410	1.000 $\pm$ 0.000	0.058 $\pm$ 0.002	Medium	telocentric
8	2.299	3.263	5.562	0.590 $\pm$ 0.033	0.051 $\pm$ 0.003	Medium	metacentric
9	0.000	5.834	5.834	1.000 $\pm$ 0.000	0.053 $\pm$ 0.003	Medium	telocentric
10	0.000	5.737	5.737	1.000 $\pm$ 0.000	0.052 $\pm$ 0.001	Medium	telocentric
11	0.000	5.551	5.551	1.000 $\pm$ 0.000	0.051 $\pm$ 0.002	Medium	telocentric
12	1.425	3.014	4.439	0.679 $\pm$ 0.032	0.041 $\pm$ 0.000	Small	acrocentric
13*	1.187	2.976	4.163	0.712 $\pm$ 0.030	0.038 $\pm$ 0.001	Small	acrocentric
14*	1.591	2.306	3.898	0.593 $\pm$ 0.057	0.036 $\pm$ 0.002	Small	metacentric
15	0.000	3.337	3.337	1.000 $\pm$ 0.000	0.030 $\pm$ 0.002	Small	telocentric
16	0.000	2.967	2.967	1.000 $\pm$ 0.000	0.027 $\pm$ 0.002	Small	telocentric
17	0.000	2.836	2.836	1.000 $\pm$ 0.000	0.026 $\pm$ 0.002	Small	telocentric
18	1.215	1.591	2.806	0.569 $\pm$ 0.020	0.026 $\pm$ 0.000	Small	metacentric
19	0.000	2.367	2.367	1.000 $\pm$ 0.000	0.022 $\pm$ 0.002	Small	telocentric
20	0.000	2.290	2.290	1.000 $\pm$ 0.000	0.021 $\pm$ 0.001	Small	telocentric

หมายเหตุ : * NORs bearing chromosomes (satellite chromosome)

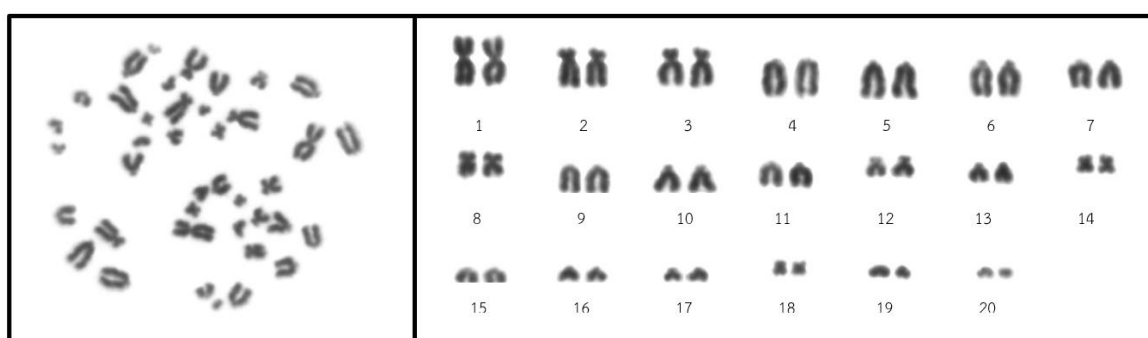
ตารางที่ 3 การวัดความยาวแขนของโครโมโซมตุ๊กแกป่าดอยสุเทพ (*C. doisuthei*) Mean length of short arm chromosome (Ls), length of long arm chromosome (LL), length of total chromosomes (LT), relative length (RL), centromeric index (CI) และ standart deviation (SD) $2n(\text{diploid}) = 34$

Pairs	Ls	LL	LT	CI $\pm$ SD	RL $\pm$ SD	Size	Type
1	4.395	7.059	11.454	0.616 $\pm$ 0.016	0.104 $\pm$ 0.002	Large	Submetacentric
2	3.668	6.177	9.846	0.628 $\pm$ 0.020	0.089 $\pm$ 0.004	Large	Submetacentric
3	3.321	5.551	8.872	0.626 $\pm$ 0.021	0.080 $\pm$ 0.003	Large	Submetacentric
4	3.492	5.078	8.570	0.593 $\pm$ 0.013	0.077 $\pm$ 0.003	Large	Metacentric
5	3.222	4.768	7.991	0.598 $\pm$ 0.020	0.072 $\pm$ 0.004	Large	Metacentric
6	0.000	8.227	8.227	1.000 $\pm$ 0.000	0.075 $\pm$ 0.004	Large	Telocentric
7	0.000	8.035	8.035	1.000 $\pm$ 0.000	0.073 $\pm$ 0.002	Large	Telocentric
8	0.000	7.951	7.951	1.000 $\pm$ 0.000	0.072 $\pm$ 0.003	Large	Telocentric
9*	2.823	3.911	6.735	0.579 $\pm$ 0.032	0.061 $\pm$ 0.003	Medium	Metacentric
10	0.000	6.321	6.321	1.000 $\pm$ 0.000	0.057 $\pm$ 0.002	Medium	Telocentric
11	0.000	5.908	5.908	1.000 $\pm$ 0.000	0.053 $\pm$ 0.002	Medium	Telocentric
12	2.008	3.422	5.430	0.629 $\pm$ 0.052	0.049 $\pm$ 0.003	Small	Acrocentric
13*	1.471	2.158	3.629	0.597 $\pm$ 0.035	0.033 $\pm$ 0.003	Small	Metacentric
14	0.000	3.236	3.236	1.000 $\pm$ 0.000	0.029 $\pm$ 0.003	Small	Telocentric
15	1.336	1.740	3.076	0.567 $\pm$ 0.015	0.028 $\pm$ 0.001	Small	Metacentric
16	1.160	1.599	2.760	0.583 $\pm$ 0.027	0.025 $\pm$ 0.001	Small	Metacentric
17	1.067	1.375	2.443	0.565 $\pm$ 0.018	0.022 $\pm$ 0.002	Small	Metacentric

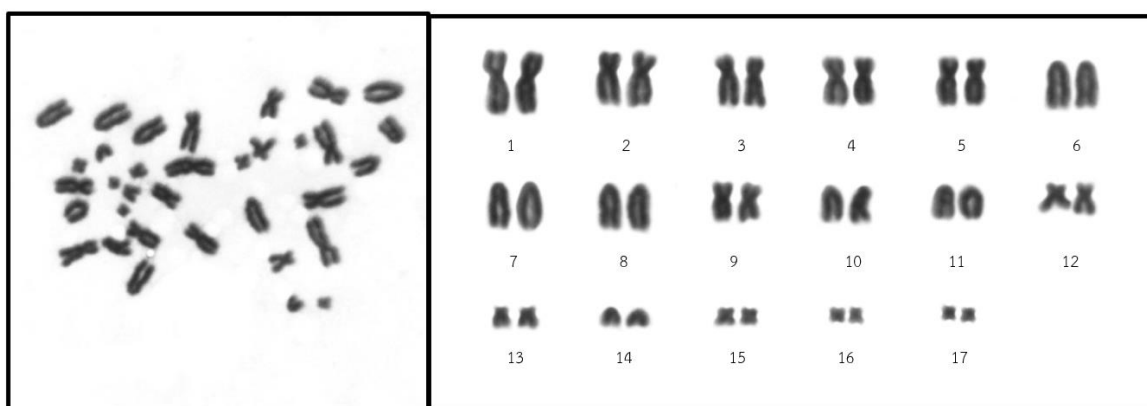
หมายเหตุ : * NORs bearing chromosomes (satellite chromosome)



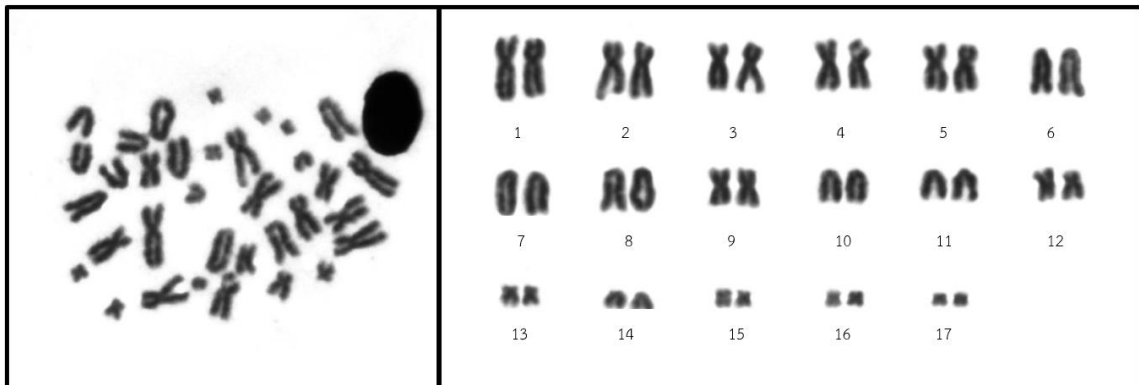
ภาพที่ 3 โครโมโซมระยะเมทาเฟสและแคริโอไทป์ของโครโมโซมตุ๊กแกป่าจาร์จินต์เพสผู้ (*C. jarujini*)
จำนวนโครโมโซม $2n=34$ จากการย้อมสีแบบธรรมดา



ภาพที่ 4 โครโมโซมระยะเมทาเฟสและแคริโอไทป์ของโครโมโซมตุ๊กแกป่าจาร์จินต์เพสเมีย (*C. jarujini*)
จำนวนโครโมโซม $2n=34$ จากการย้อมสีแบบธรรมดา



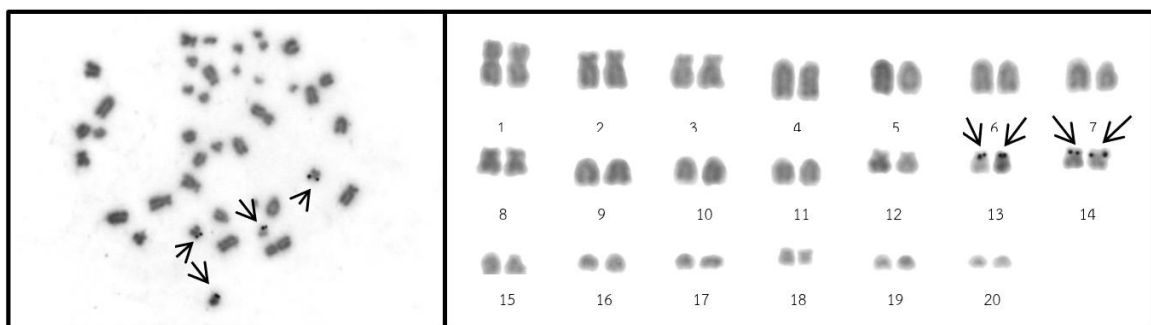
ภาพที่ 5 โครโมโซมระยะเมทาเฟสและแคริโอไทป์ของโครโมโซมตุ๊กแกป่าดอยสุเทพเพสผู้ (*C. doisueth*) จำนวนโครโมโซม $2n=34$ จากการย้อมสีแบบดั้งเดิม



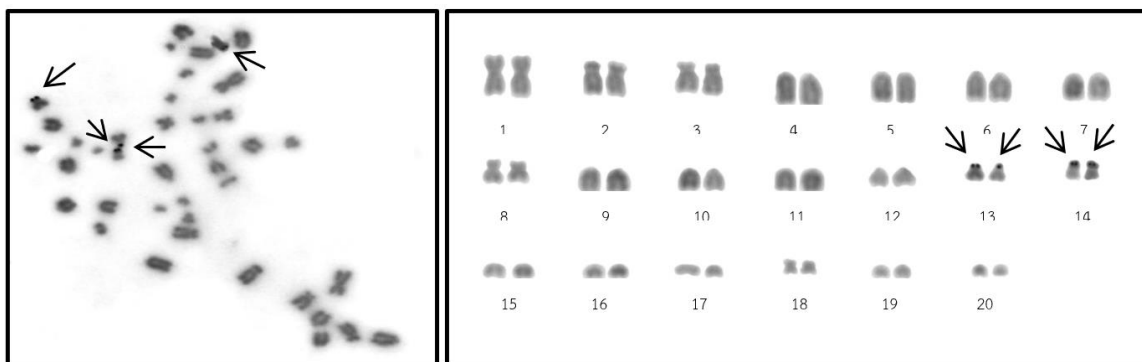
ภาพที่ 6 โครโมโซมระยะเมทาเฟสและแคโรไทป์ของโครโมโซมตุ๊กแกป่าดอยสุเทพเทศเมีย (*C. doisuthep*) จำนวนโครโมโซม $2n=34$ จากการย้อมสีแบบธรรมดา

4.2.2 ตำแหน่ง NORs บนโครโมโซมของตุ๊กแกป่าจารุจินต์ (*C. jarujini*) และตุ๊กแกป่าดอยสุเทพ (*C. doisuthep*)

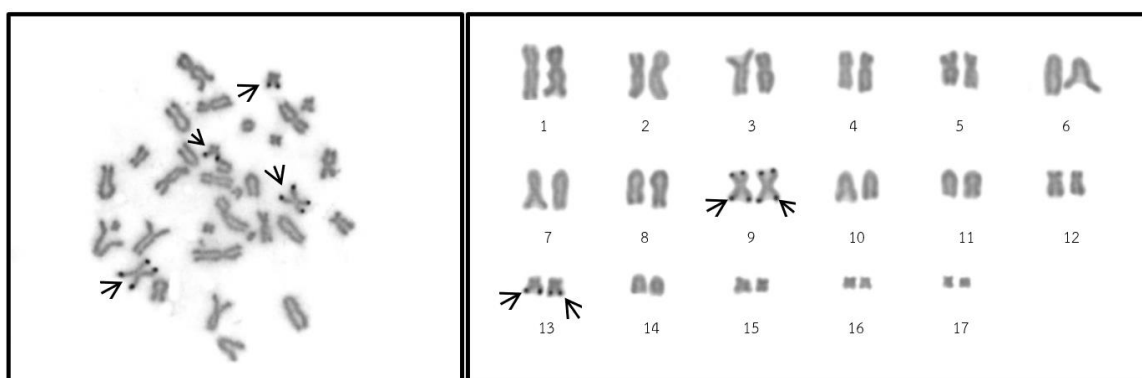
หลังการย้อมสีโครโมโซมของตุ๊กแกป่าด้วยซิลเวอร์ไนเตรตเพื่อระบุตำแหน่ง Nucleolar Organized Regions หรือ NORs บนโครโมโซมของตุ๊กแกป่าในระยะเมทาเฟส พบว่าตุ๊กแกป่าจารุจินต์ (*C. jarujini*) ตำแหน่ง NORs อยู่บนแขนข้างสั้น (p-arm) ของโครโมโซมคู่ที่ 13 และ 14 ทั้งในเพศผู้และเพศเมีย ส่วนตุ๊กแกป่าดอยสุเทพ (*C. doisuthep*) ตำแหน่ง NORs อยู่บนปลายแขนข้างสั้น (p-arm) และแขนข้างยาว (q-arm) ของโครโมโซมแท่งที่ 9 และอยู่บนแขนข้างยาว (q-arm) ของโครโมโซมคู่ที่ 13 ทั้งในเพศผู้และเพศเมีย ดังแสดงในภาพที่ 7-10



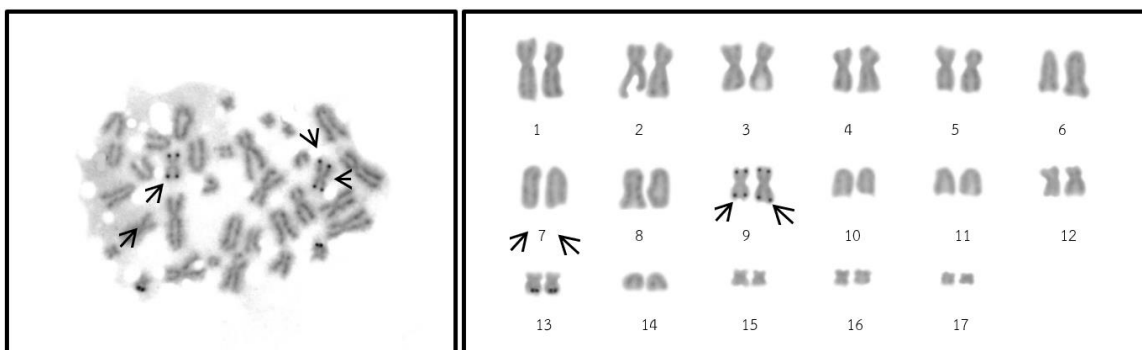
ภาพที่ 7 โครโมโซมระยะเมทาเฟสและแคโรไทป์ของโครโมโซมตุ๊กแกป่าจารุจินต์เพศผู้ (*C. jarujini*) จำนวนโครโมโซม $2n=40$ แสดงตำแหน่ง NOR บนโครโมโซมแท่งที่ 13 และ 14 จากการย้อมสีแบบ Ag-NORs หรือ Silver staining



ภาพที่ 8 โครโมโซมระยะเมทาเฟสและแครีโอไทป์ของโครโมโซมตุ๊กแกป่าจาร์จิ้นต์เทศเมีย (*C. jarujini*) จำนวนโครโมโซม $2n=40$ แสดงตำแหน่ง NOR บนโครโมโซมแท่งที่ 13 และ 14 จากการย้อมสีแบบ Ag-NORs หรือ Silver staining



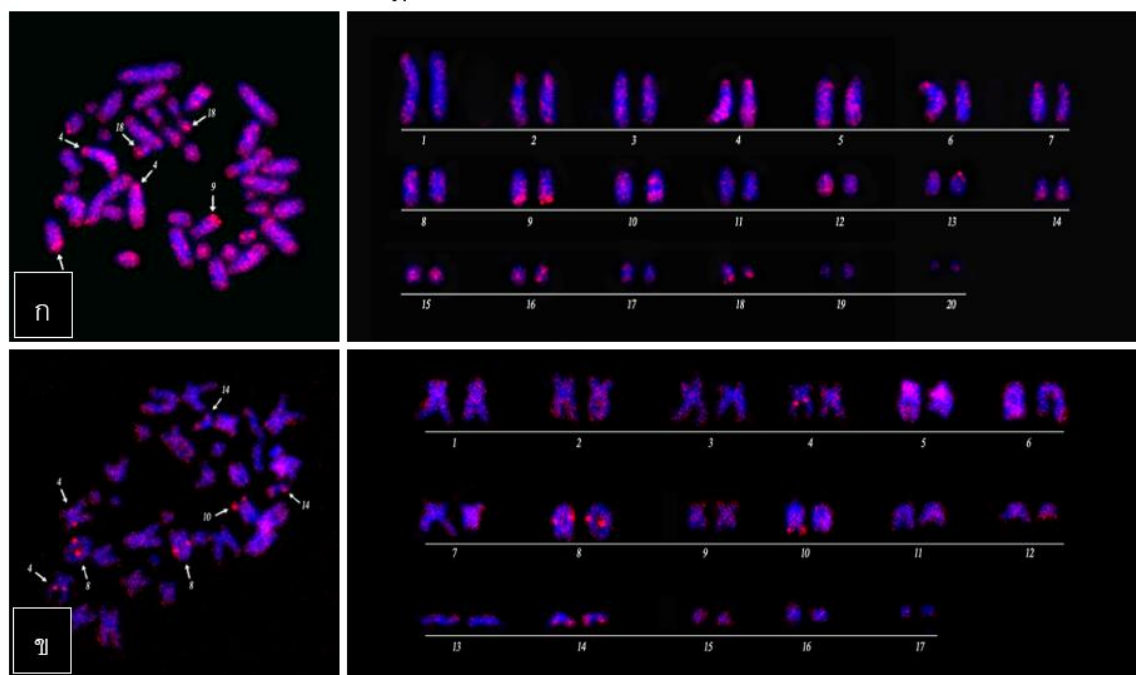
ภาพที่ 9 โครโมโซมระยะเมทาเฟสและแครีโอไทป์ของโครโมโซมตุ๊กแกป่าดอยสุเทพเทศเมีย (*C. doisuthep*) จำนวนโครโมโซม $2n=34$ แสดงตำแหน่ง NOR บนโครโมโซมแท่งที่ 9 และ 13 จากการย้อมสีแบบ Ag-NOR หรือ Silver staining



ภาพที่ 10 โครโมโซมระยะเมทาเฟสและแครีโอไทป์ของโครโมโซมตุ๊กแกป่าดอยสุเทพเทศเมีย (*C. doisuthep*) จำนวนโครโมโซม $2n=34$ แสดงตำแหน่ง NOR บนโครโมโซมแท่งที่ 9 และ 13 จากการย้อมสีแบบ Ag-NOR หรือ Silver staining

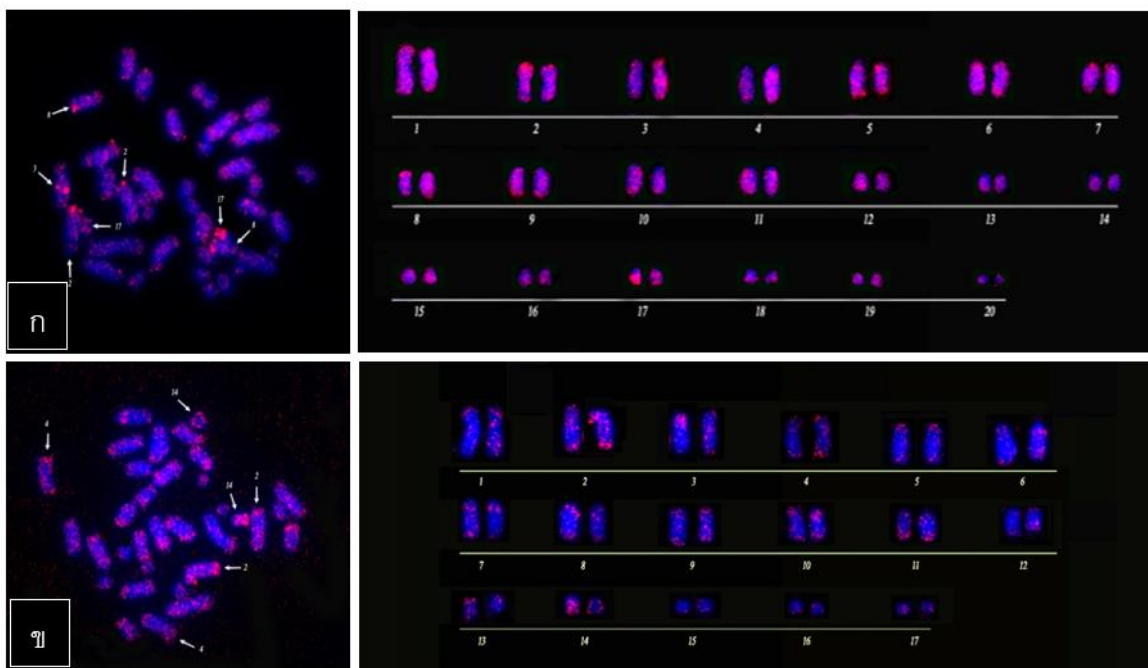
การศึกษาโครโมโซมในระดับโมเลกุล โดยใช้เทคนิค FISH ใช้โพรบไมโครแซทเทลไลต์ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง โพรบที่ใช้ประกอบไปด้วยโพรบประเภทโมโน-, ได-, ไตร- และโอลิโกนิวคลีโอไทด์ เป็นเครื่องหมายทางพันธุกรรม ได้แก่ A_{20} , GA_{15} , CGG_{10} , CAG_{10} และ telomere ที่มีลำดับเบสคือ $TTAGGG_n$ ได้ผลแสดงการสะสมของลำดับเบสซ้ำไมโครแซทเทลไลต์ที่แตกต่างกันบนโครโมโซมของตุ๊กแกป่าทั้ง 2 ชนิด และมีรูปแบบที่หลากหลายตามชนิดโพรบที่ใช้ในการ hybridization

การทดลองโดยใช้โพรบ A_{20} hybridization กับโครโมโซมของตุ๊กแกป่า พบว่ามีการสะสมลำดับเบสซ้ำ A มากบนโครโมโซมบางแท่ง ทั้งบนโครโมโซมของตุ๊กแกป่าจาร์จินต์ (*C. jarujini*) และโครโมโซมของตุ๊กแกป่าดอยสุเทพ (*C. doisuthep*) แต่ปรากฏสัญญาณเข้มบนโครโมโซมต่างแท่งกัน และอยู่บนตำแหน่งที่แตกต่างกัน สังเกตได้จากสัญญาณโพรบเข้ม (strong signals) ที่ตรวจวัดได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ โดยโครโมโซมของ *C. jarujini* ปรากฏสัญญาณการเรืองแสงของโพรบเข้มบนส่วนปลายด้านสั้น (p-arm) ของโครโมโซมคู่ที่ 4 และปลายด้านยาว (q-arm) ของโครโมโซมคู่ที่ 9 และ 18 ส่วนโครโมโซมของ *C. doisuthep* ปรากฏสัญญาณการเรืองแสงของโพรบเข้มบนส่วนแขนข้างสั้น (p-arm) ของโครโมโซมคู่ที่ 4 ระหว่างเซนโทรเมียร์และเทโลเมียร์ ค่อนไปทางด้านเซนโทรเมียร์ บนแขนข้างยาวยาว (q-arm) ของโครโมโซมคู่ที่ 8 ระหว่างเซนโทรเมียร์และเทโลเมียร์ ค่อนไปทางด้านเทโลเมียร์ บนแขนข้างยาวยาว (q-arm) บนโครโมโซมคู่ที่ 10 ตรงส่วนปลายใกล้บริเวณเซนโทรเมียร์ และบนแขนข้างยาวยาว (q-arm) บนโครโมโซมคู่ที่ 14 ตรงส่วนปลายใกล้บริเวณเซนโทรเมียร์ สัญญาณโพรบที่ปรากฏแสดงใน ภาพที่ 11



ภาพที่ 11 โครโมโซมในระยะเมทาเฟส หลังจากการ hybridization ด้วยโพรบไมโครแซทเทลไลต์ประเภทโมโนนิวคลีโอไทด์ ชนิด A_{20} แสดงการสะสมของลำดับเบสซ้ำ A บนโครโมโซมของ (ก) ตุ๊กแกป่าจาร์จินต์ (*C. jarujini*) และ (ข) ตุ๊กแกป่าดอยสุเทพ (*C. doisuthep*)

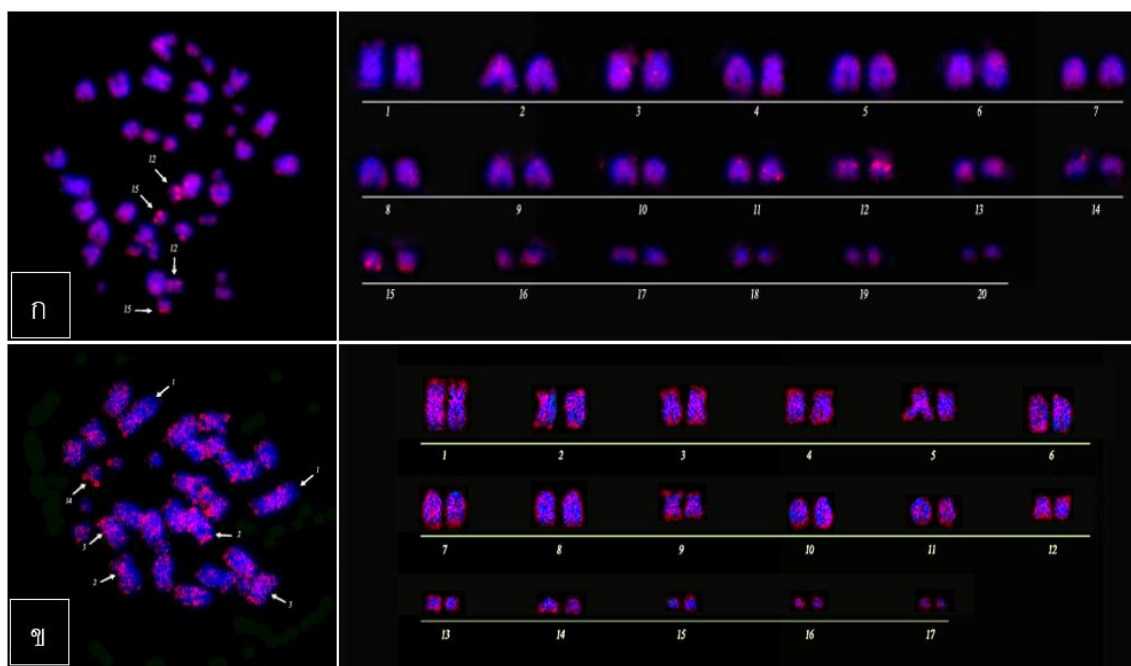
การทดลองโดยใช้โพรบ GA₁₅ hybridization กับโครโมโซมของตึกแกป่า พบว่ามีการสะสมลำดับเบสซ้ำ GA มากบนโครโมโซมของตึกแกป่าจารูจินต์ (*C. jarujini*) และตึกแกป่าดอยสุเทพ (*C. doisuthep*) โดยปรากฏสัญญาณเข้มของโพรบดังกล่าว บนโครโมโซมของตึกแกป่าจารูจินต์ (*C. jarujini*) บนแขนข้างสั้น (p-arm) ส่วนปลายติดกับเทโลเมียร์ ของโครโมโซมคู่ที่ 2 บนแขนข้างยาว (q-arm) ค่อนไปทางเซนโทรเมียร์ และบนแขนข้างสั้น (p-arm) ส่วนปลายติดกับเทโลเมียร์ ของโครโมโซมคู่ที่ 3 บนแขนข้างสั้น (p-arm) ส่วนปลายติดกับเซนโทรเมียร์ของโครโมโซมคู่ที่ 8 และบนแขนข้างยาว (q-arm) ของโครโมโซมคู่ที่ 17 ส่วนโครโมโซมของตึกแกป่าดอยสุเทพ (*C. doisuthep*) ปรากฏสัญญาณเข้มของโพรบดังกล่าวบนแขนข้างยาว (q-arm) ส่วนปลายติดกับเทโลเมียร์ของโครโมโซมคู่ที่ 2 และ 4 และบนแขนข้างยาว (q-arm) ของโครโมโซมคู่ที่ 14 สัญญาณโพรบที่ปรากฏแสดงใน ภาพที่ 12



ภาพที่ 12 โครโมโซมในระยะเมทาเฟส หลังจากการ hybridization ด้วยโพรบไมโครแซทเทลไลท์ ประเภทไดนิวคลีโอไทด์ ชนิด GA₁₅ แสดงการสะสมของลำดับเบสซ้ำ GA บนโครโมโซมของ (ก) ตึกแกป่าจารูจินต์ (*C. jarujini*) และ (ข) ตึกแกป่าดอยสุเทพ (*C. doisuthep*)

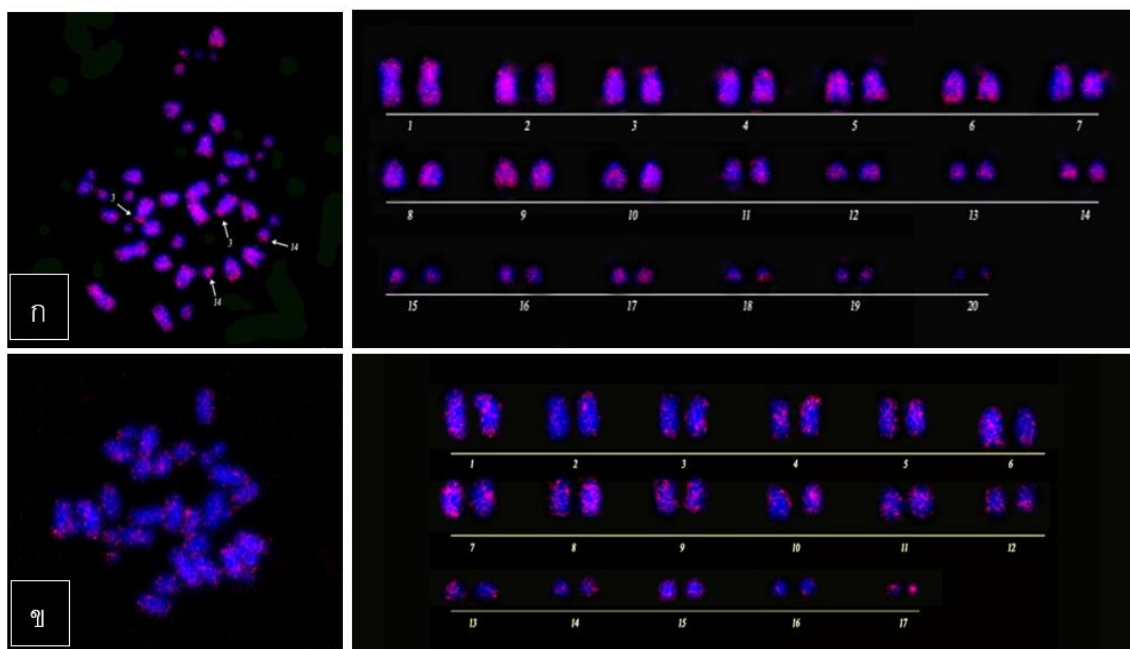
การทดลองโดยใช้โพรบ CGG₁₀ hybridization กับโครโมโซมของตึกแกป่า พบว่ามีการสะสมลำดับเบสซ้ำ CGG รูปแบบที่แตกต่างกันบนโครโมโซมของตึกแกป่าจารูจินต์ (*C. jarujini*) และตึกแกป่าดอยสุเทพ (*C. doisuthep*) โดยสัญญาณเข้มของโพรบปรากฏบนโครโมโซมของตึกแกป่าจารูจินต์ (*C. jarujini*) บริเวณแขนข้างยาว (q-arm) ค่อนไปทางด้านเซนโทรเมียร์ ของโครโมโซมคู่ที่ 12 และบนแขนข้างยาว (q-arm) ส่วนปลายใกล้เซนโทรเมียร์ของโครโมโซมคู่ที่ 15 ส่วนโครโมโซมของตึกแกป่าดอยสุเทพ

(*C. doisuthep*) ไม่มีสัญญาณโพรบสะสมมากบนบริเวณเดียว แต่มีรูปแบบการกระจายทั่วทั้งโครโมโซม สัญญาณโพรบที่ปรากฏแสดงในภาพที่ 13



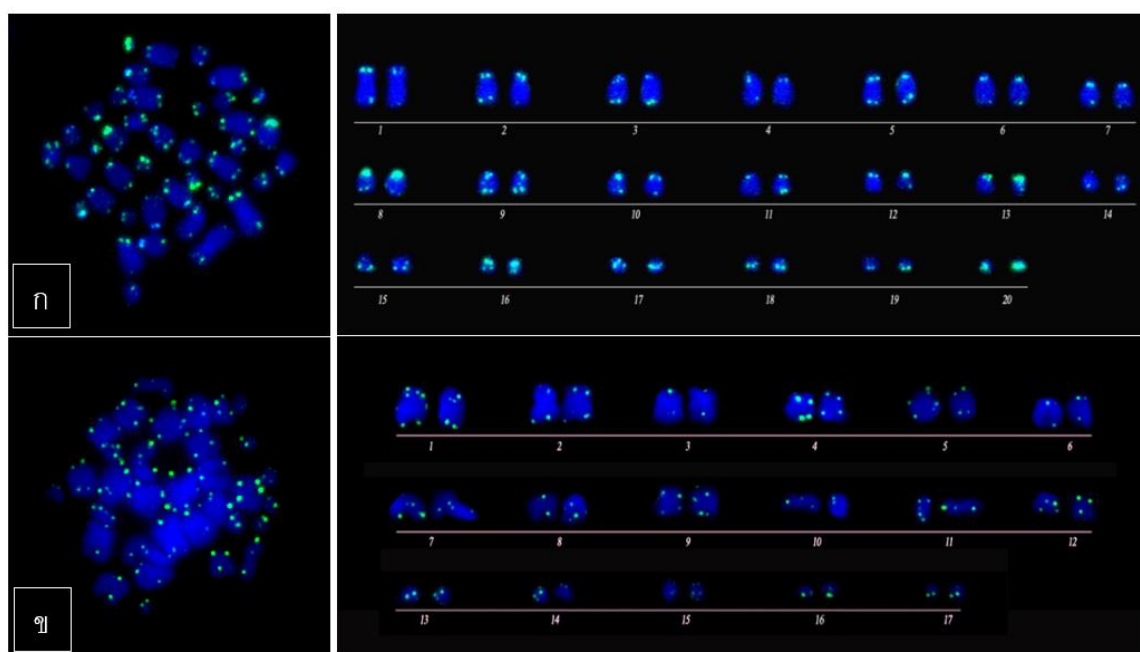
ภาพที่ 13 โครโมโซมในระยะเมทาเฟส หลังจากการ hybridization ด้วยโพรบไมโครแซทเทลไลต์ ประเภทไตรนิวคลีโอไทด์ ชนิด CGG₁₀ แสดงการสะสมของลำดับเบสไมโครแซทเทลไลต์บน โครโมโซมของ (ก) ตั๊กแกป่าจาร์จินี (*C. jarujini*) และ (ข) ตั๊กแกป่าดอยสุเทพ (*C. doisuthep*)

การทดลองโดยใช้โพรบ CAG₁₀ hybridization กับโครโมโซมของตั๊กแกป่า พบว่าปรากฏสัญญาณ เข้มของโพรบดังกล่าวบนโครโมโซมต่างแท่งกัน แสดงการสะสมของลำดับเบสซ้ำ CAG บนโครโมโซมของ ตั๊กแกป่าจาร์จินี (*C. jarujini*) และตั๊กแกป่าดอยสุเทพ (*C. doisuthep*) โดยโครโมโซมของตั๊กแกป่าจาร์ จินี (*C. jarujini*) ปรากฏสัญญาณเข้มบนแขนข้างสั้น (p-arm) ส่วนปลายติดกับเทโลเมียร์ของโครโมโซม คู่ที่ 3 และบนแขนข้างยาว (q-arm) ส่วนปลายติดกับเทโลเมียร์ของโครโมโซมคู่ที่ 14 ส่วนโครโมโซมของ ตั๊กแกป่าดอยสุเทพ (*C. doisuthep*) ปรากฏสัญญาณเข้มบนแขนข้างยาว (q-arm) ของโครโมโซมคู่ที่ 17 สัญญาณโพรบที่ปรากฏแสดงใน ภาพที่ 14



ภาพที่ 14 โครโมโซมในระยะเมทาเฟส หลังจากการ hybridization ด้วยโพรบไมโครแซทเทลไลต์ ประเภทไตรนิวคลีโอไทด์โพรบ CAG₁₀ แสดงการสะสมของลำดับเบสไมโครแซทเทลไลต์บน โครโมโซมของ (ก) ตั๊กแกป่าจารูจินต์ (*C. jarujini*) และ (ข) ตั๊กแกป่าดอยสุเทพ (*C. doisuthei*)

การทดลองโดยใช้โพรบ TTAGGG_n ซึ่งเป็นโพรบสังเคราะห์ hybridization กับโครโมโซมของ ตั๊กแกป่า พบว่าปรากฏสัญญาณเข้มของโพรบดังกล่าวติดบนส่วนปลายตรงตำแหน่งเทโลเมียร์ของ โครโมโซมทุกแท่ง ทั้งบนโครโมโซมของ (ก) ตั๊กแกป่าจารูจินต์ (*C. jarujini*) และ (ข) ตั๊กแกป่าดอยสุเทพ (*C. doisuthei*) สัญญาณโพรบที่ปรากฏแสดงในภาพที่ 15



ภาพที่ 15 โครโมโซมในระยะเมทาเฟส หลังจากการ hybridization ด้วยโพรบไมโครแซทเทลไลต์ ประเภทโอลิโกนิวคลีโอไทด์โพรบ TTAGGG_n แสดงการสะสมของลำดับเบสซ้ำ TTAGGG บริเวณ telomeres บนโครโมโซมของ (ก) ตั๊กแกป่าจารูจินต์ (*C. jarujini*) และ (ข) ตั๊กแกป่าดอยสุเทพ (*C. doisuthei*)

บทที่ 5

วิจารณ์ผลการวิจัย

ตุ๊กแกป่าจารุจินต์ (*C. jarujini*) และตุ๊กแกป่าดอยสุเทพ (*C. doisuthep*) มีแคโรไทป์ที่แตกต่างกัน โดยมีจำนวน $2n$ (diploid) และสูตรโครโมโซมที่แตกต่างกัน ได้แก่ $2n$ (diploid) $40 = L^m_1 + L^{sm}_2 + L^t_3 + M^m_1 + M^t_4 + S^m_2 + S^a_2 + S^t_5$ และ $2n$ (diploid) $34 = L^{sm}_3 + L^m_2 + L^t_3 + M^m_1 + M^t_2 + S^m_4 + S^a_1 + S^t$ ตามลำดับ และมีตำแหน่ง Nucleolar Organized Regions หรือ NORs บนโครโมโซมต่างแท่งกัน โดยตุ๊กแกป่าจารุจินต์ (*C. jarujini*) ตำแหน่ง NORs อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 13 และ 14 ส่วนตุ๊กแกป่าดอยสุเทพ (*C. doisuthep*) ตำแหน่ง NORs อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 9 และ 13 จากการศึกษาก่อนหน้านี้มีรายงานการค้นพบโครโมโซมเพศในตุ๊กแกป่าบางชนิด ดังเช่นการศึกษาของ Hidetoshi และคณะ (2014) พบโครโมโซมเพศในตุ๊กแกป่า 2 ชนิด ได้แก่ *C. consobrinus* และ *C. pubisulous* ซึ่งเป็นโครโมโซมเพศระบบ ZW และจัดเป็น heteromorphic sex chromosome ลำดับเบส GATA tetranucleotide ซึ่งจัดเป็น Microsatellites DNA พบว่าเป็นลำดับเบสที่มีการสะสมมากบนโครโมโซม W ซึ่งเป็นโครโมโซมเพศ แต่อย่างไรก็ตามในการศึกษาครั้งนี้ไม่ปรากฏการมีโครโมโซมเพศในตุ๊กแกป่าจารุจินต์ (*C. jarujini*) และตุ๊กแกป่าดอยสุเทพ (*C. doisuthep*)

รูปแบบการกระจายของลำดับเบสซ้ำไมโครแซทเทลไลต์มีรูปแบบที่แตกต่างกับบนโครโมโซมของตุ๊กแกป่าทั้ง 2 ชนิด ขึ้นอยู่กับประเภทและชนิดของโพรบที่ใช้ในการ hybridization จากการศึกษาโครโมโซมของตุ๊กแกป่าจารุจินต์ (*C. jarujini*) และตุ๊กแกป่าดอยสุเทพ (*C. doisuthep*) ในครั้งนี้ พบว่าโครโมโซมของตุ๊กแกป่าทั้ง 2 ชนิด อาจมีความสัมพันธ์กัน โดยมีบรรพบุรุษร่วมกัน ผ่านกระบวนการวิวัฒนาการ ซึ่งในระหว่างนี้โครโมโซมอาจเกิดการหัก (fission) และการเชื่อมรวม (fusion) จากการศึกษาวิเคราะห์ผลการศึกษาพบว่าเมื่อเปรียบเทียบสัญญาณโพรบ A_{20} ที่แสดงตำแหน่งลำดับเบสซ้ำ A บนโครโมโซม พบความสัมพันธ์ระหว่างโครโมโซมคู่ที่ 14 และ คู่ที่ 13 ของตุ๊กแกป่าจารุจินต์ (*C. jarujini*) ซึ่งเป็นโครโมโซมขนาดเล็กแบบเมทาเซนทริก และอะโครเซนทริก ตามลำดับ กับโครโมโซมคู่ที่ 4 ของตุ๊กแกป่าดอยสุเทพ (*C. doisuthep*) ตำแหน่งที่สัญญาณโพรบข้ามบนแขนข้างยาวของโครโมโซมคู่ที่ 4 ของตุ๊กแกป่าดอยสุเทพ (*C. doisuthep*) มีตำแหน่งตรงกับด้านปลายติดกับเทโลเมียร์ของแขนข้างยาวที่ติดสัญญาณโพรบข้ามบนโครโมโซมของตุ๊กแกป่าจารุจินต์ (*C. jarujini*) คู่ที่ 14 และ คู่ที่ 13 จึงคาดว่า โครโมโซมคู่ที่ 14 และ คู่ที่ 13 ของตุ๊กแกป่าจารุจินต์ (*C. jarujini*) หรือโครโมโซมของบรรพบุรุษตุ๊กแกป่าชนิดนี้ เกิดการหักและเชื่อมต่อกัน กลายเป็นโครโมโซมคู่ที่ 4 ของตุ๊กแกป่าดอยสุเทพ (*C. doisuthep*) หรือโครโมโซมของบรรพบุรุษตุ๊กแกป่าชนิดนี้ นอกจากนั้นสัญญาณโพรบ CAG_{10} สนับสนุนความสัมพันธ์ระหว่างโครโมโซมคู่ที่ 14 และ คู่ที่ 13 ของ *C. jarujini* ซึ่งเป็นโครโมโซมขนาดเล็กแบบเมทาเซนทริก และอะโครเซนทริก ตามลำดับ เกิดการหักและเชื่อมรวมกันเป็นโครโมโซมคู่ที่ 4 ของ *C. doisuthep*

ตามทฤษฎีโครโมโซมสามารถเกิดการหักและเชื่อมรวมกันได้ เนื่องจากโมเลกุลของดีเอ็นเอเมื่อเกิดการหัก (fission) บริเวณส่วนปลายที่เกิดการหักอาจเกิดปลายเหนียว (sticky end) ซึ่งสามารถเกิดการเชื่อมรวม (fusion) กับโครโมโซมแท่งอื่นที่เกิดการหักเช่นเดียวกัน ดังเช่นการศึกษาก่อนหน้าที่มีรายงานการหักและเชื่อมรวมกันของโครโมโซม แสดงให้เห็นความสัมพันธ์ระหว่างโครโมโซมสัตว์ต่างชนิดกัน Trifonov และคณะ (2011) ศึกษา Chromosomal rearrangements ของโครโมโซมตุ๊กแกในระดับโมเลกุล สกุล *Hemidactylus* พบว่าบรรพบุรุษของสัตว์ในกลุ่มดังกล่าวมีจำนวน $2n(\text{diploid}) = 38$ ซึ่งเท่ากับจำนวนโครโมโซมของตุ๊กแก ชนิด *Gekko japonicas*, *G. gecko*, *G. ulikovskii* ที่มีจำนวน $2n(\text{diploid}) = 38$ ที่พบในปัจจุบัน ระหว่างกระบวนการวิวัฒนาการเกิดการหักของโครโมโซม (fission) กลายเป็นบรรพบุรุษของตุ๊กแกในสกุล *Hemidactylus* ได้แก่ *H. frenatus*, *H. platyulius* และ *H. turcicus* ที่มีจำนวน $2n(\text{diploid}) = 40, 46$ และ 44 ตามลำดับ

เอกสารอ้างอิง

- วีรยุทธ์ เล่าหะจินดา, วุฒิ ทักษิณธรรม. 2549. หลักอนุกรมวิธานสัตว์. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- อลงกลด แทนอมทอง. 2554. พันธุศาสตร์เซลล์. ขอนแก่น: มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- Abdulle-Muneer, P.M. 2014. Appliation of Microsatellite Markers on Conservation Genetics and Fisheries Management: Recent Advances in Population Structure Analysis and Conservation Strategies. Hindawi 35(1); 47-53.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., et al. 2002. Molecular Biology of the Cell. 4th ed. Garland Science, New York.
- Bansal, R. and Karanth, K.P. 2010. Molecular phylogeny of *Hemidactylus* geckos(Squamata: Gekkonidae) of the Indian subcontinent reveals a unque Indian radiation and an Indian origin of Asian house geckos. Molecular Phylogenetics and Evolution 57: 459-465.
- Bauer, A.M., Sumontha, M., Grossmann, W., Pauwels, O.S.G. and Vogel, G. 2004. A New Species of *Dixonius* (Squamata: Gekkonidae) from Kanchanaburi Province, Western Thailand. Current Herpetology 23(1): 17-26.
- Bauer, A.M., Pauwels, S.G. and Chanhom, L. 2002. A New Species of Cave-dwelling *Cyrtodactylus* (Squamata: Gekkonidae) from Thailand. The Natural History of Chulalongkorn University 2(2): 19-29.
- Carvalho, P.C., Oliveira, E.A., Bertollo, L.A.C., Yano, C.F., Oliveira, C., Decru, E., Jegede, O.I., Hatanaka, T., Liehr, T., Al-Rikabi, A.B.H. and Cioffi, M.B. 2017. First Chromosomal Analysis in Hepsetidae (Actinopterygii, Characiformes): Insights into Relationship between African and Neotropical Fish Group. Frontiers in Genetics 8: 203.
- David, P., Nguyen, T.Q., Schneider, N. and Ziegler, T. 2011. A new species of the genus *Cyrtodactylus* Gray, 1827 from central Laos (Squamata: Gekkonidae). Zootaxa 2883: 29-40.
- Clark, M.S. and Wall, W.J. 1996. Chromosomes. Oxford: Great Britain by the Alden Press.
- Ellis, M. and Pauwels, O.S.G. 2012. The bent-toed geckos (*Cyrtodactylus*) of the caves and karst of Thailand. Cave and Karst 39(1).

- Gamble, T., Colli, G.R., Rodrigues, M.T., Werneck, F.P. and Simon, A.M. 2012. Phylogeny and cryptic diversity in geckos (Phyllopezus; Phyllodactylidae; Gekkota) from South America's open biomes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 62: 943-953.
- Kawai, A., Ishijima, J., Nishida, C., Kosaka, A., Ota, H., Kohno, S. and Matsuda, Y. 2009. The ZW sex chromosome of *Gekko hokouensis* (Gekkonidae, Squamata) represent highly conserved homology with those of avian species. *Chromosoma* 118: 43-51.
- Korf, B.R. and Irons, M.B. 2013. *Human Genetics and Genomics*. 4thed. Wiley-Blackwell, UK.
- Kunya, K., Panmongkol, A., Pauwels, O.S.G., Sumontha, M., Meesavana, J., Bunkhwamdi, W. and Dangsi, S. 2014. A new forest-dwelling Bent-toed Gecko (Squamata: Gekkonidae: Cyrtodactylus) from Doi Suthep, Chiang Mai Province, northern Thailand. *Zootaxa* 3811(2): 251-261
- Ota, H., Hikida, T., Matsui, M. and Mori, A. 2014. Karyotypes of two species of the genus *Cyrtodactylus* (Squamata: Gekkonidae) from Sarawak, Malaysia. *Caryologia: International Journal of Cytology, Cytosystematics and Cytogenetics* 45(1): 43-49.
- Pauwels, O.S.G., Sumontha, K.K. and Phanamphon, E. 2014. *Cyrtodactylus kunyai* (Squamata: Gekkonidae), a new cave-dwelling Bent-toed Gecko from Loei Province northeastern Thailand. *Zootaxa* 3821(2): 253-246
- Pellegrino, K.C., Rodrigues, M.T. and Yassuda, Y.Y. 1999. Chromosomal evolution in the Brazilian lizards of genus *Leposoma* (Squamata, Gymnophthalmidae) from Amazon and Atlantic rain forest: banding patterns and FISH of telomeric sequences. *Hereditas* 131: 15-21.
- Pokona, M., Kratochvil, L. and Kejnovsky, E. 2011. Microsatellite distribution on sex chromosomes at different atages of heteromorphism and heterochromatinization in two lizard species (Squamata: Eublepharidae: *Coleonyx elegans* and Lacertidae: *Eremias velox*). *BMC Genetics* 12: 90.
- Robert, H.T. 1989. *Principle of genetics*. U.S.A.: Wm. C. Communication.
- Schneider, C.H., Gross, M.C., Terencio, M.L., Tavares, E.S.G.M., Martins, C. and Feldberg. 2015. Chromosomal distribution of microsatellite repeats in Amazon cichlids genomes (Pisces, Cichlidae) *CompCytogen* 9(4): 595-605.
- Shibaike, Y., Takahashi, Y., Arikura, I., Liizumi, R., Kitakawa, S., Sakai, M., Imaoka, C., Shiro, H., Tanaka, H., Akakubo, N., Nakano, M., Watanabe, M., Ohne, K., Kubota, S., Kohno, S.

- and Ota, H. 2009. Chromosome Evolution in the Lizard genus *Gekko* (Gekkonidae, Squamata, Reptilia) in the East Asian Islands. *Cytogenetic and Genomic Research* 127: 182-190.
- Trifonov, V.A., Giovannotti, M., O'Brien, P.C.M., Wallduck, M., Lovell, F., Rens, W., Parise-Maltempi, P., Caputo, V. and Ferguson-Smith, M. 2011. Chromosomal evolution in Gekkonidae. I. Chromosome painting between *Gekko* and *Hemidactylus* species reveals phylogenetic relationships within the group. *Chromosome Res* 19: 843-855.
- Vieira, M.L., Santini, L., Diniz, A.L. and Munhoz, C.F. 2016. Microsatellite marker: what they mean and why they are so useful. *Genetics and Molecular Biology* 39(3): 312-328.
- Zheng, Y. and Weins, J.J. 2016. Combining phylogenomic and supermatrix approaches, and a time-calibrated phylogeny for squamate reptiles (lizards and snakes) based on 52 genes and 4162 species. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 94: 537-547.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

วัสดุอุปกรณ์ สารเคมี และการเตรียมสารต่าง ๆ

รายการวัสดุอุปกรณ์ สารเคมี และการเตรียมสารต่าง ๆ

1. วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

1.1 วัสดุอุปกรณ์

- ปีกเกอร์ขนาดต่าง ๆ
- ขวดรูปชมพู่ขนาดต่าง ๆ
- กระตักน้ำแข็ง
- กระบอกตวง
- กรวยกรอง
- โถสำหรับย้อมสี (staining jar)
- กระบอกฉีดยา (syring) และเข็มฉีดยาขนาดต่าง ๆ
- Automatic pipette, micropipette และ pipette ขนาดต่าง ๆ
- หลอดเลี้ยงเซลล์ขนาด 10 และ 15 มิลลิลิตร
- ถังมือยาง
- ตะเกียงแอลกอฮอล์
- แผ่นสไลด์
- เครื่องปั่นเหวี่ยง
- หลอดหยด
- เครื่องกรองสาร และแผ่นกรองเมมเบรน (Millipore membrane filter) ขนาด 0.2 ไมโครลิตร
- เครื่องชั่งแบบละเอียด (balance)
- ตู้เย็น
- กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงพร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ

1.2 สารเคมี

- โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)
- โคลชิซิน (colchicine)
- เมทานอล (methanol)
- เอทานอล 95 และ 70 เปอร์เซ็นต์ (ethanol 95% และ 70%)
- กรดอะซิติกเข้มข้น (glacial acetic acid)
- สีย้อมจิมซ่า (Giemsa's stain)
- โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต (NaHCO_3)
- โซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (NaHPO_4)
- โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)

- กรดไฮโดรคลอริก (HCl)
- โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)

2. การเตรียมสารเคมี

2.1 การเตรียม Hypotonic solution 0.075 M KCl

2.1.1 สารที่ใช้เตรียม

- 1) KCl crystal
- 2) น้ำกลั่น

2.1.2 วิธีเตรียม (ปริมาตรที่เตรียม 100 มิลลิลิตร)

ชั่งผลึก KCl 0.5588 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร เขย่าจนผลึกละลายหมด เก็บใส่ขวดไว้ที่อุณหภูมิห้อง
หมายเหตุ: น้ำยานี้มีอายุการใช้งาน 1-2 สัปดาห์

2.2 การเตรียม Colchicine

- สูตรที่ 1 ชั่ง colchicines 0.005 กรัม ละลายน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร
ได้ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/ มิลลิลิตร
- สูตรที่ 2 ชั่ง colchicines 0.0025 กรัม ละลายน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร
ได้ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัม/ มิลลิลิตร
- Colchicine powder เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส

2.3 การเตรียม Fixative

2.3.1 สารที่ใช้เตรียม

- 1) Glacial acetic acid
- 2) Absolute methanol

2.3.2 วิธีเตรียม

ใช้ glacial acetic acid 1 ส่วน ผสมกับ absolute methanol 3 ส่วน เก็บใส่ขวด แช่ในตู้เย็น (ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้ง)

2.4 การเตรียม Sorensen buffer

2.4.1 สารที่ใช้เตรียม

- 1) Stock Solution A: ใช้ KH_2PO_4 9.1 กรัม ละลายน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร
- 2) Stock Solution B: ใช้ NaHPO_4 9.5 กรัม ละลายน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร

2.4.2 วิธีเตรียม

ใช้ Stock Solution A 50.8 มิลลิลิตร ผสมกับ Stock Solution B 49.2 มิลลิกรัม จะได้ Sorensen buffer (pH 6.8) 100 มิลลิกรัม

2.5 การเตรียมสีย้อม Giemsa

2.5.1 การเตรียมจิมซ่า 10% (10% Giemsa's Solution)

สีจิมซ่า 10% เตรียมจาก Giemsa's stain ใช้ชนิด Stock Giemsa's Solution โดยตูดสีจิมซ่าจาก Stock Giemsa's Solution มา 5 มิลลิลิตร ละลายใน Sorensen buffer 45 มิลลิลิตร

2.6 การเตรียม Phytohemagglutinin (PHA)

2.6.1 สารที่ใช้เตรียม

- 1) PHA Powder
- 2) น้ำกลั่น

2.6.2 วิธีเตรียม

ละลายผง PHA ด้วยน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน เก็บไว้ที่ 2-8 องศาเซลเซียส

2.7 การเตรียมสารละลาย 1N HCl

2.7.1 สารที่ใช้เตรียม

- 1) Conc. HCl
- 2) น้ำกลั่น

2.7.2 วิธีเตรียม (ปริมาตรที่เตรียม 500 มิลลิลิตร)

ใช้ Conc. HCl จำนวน 43.68 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่น 456.32 มิลลิลิตร โดยค่อย ๆ ริน HCl ลงในน้ำกลั่น (ข้อควรระวังห้ามเท HCl ลงในน้ำกลั่น เป็นอันตราย แต่ให้เทกรด HCl ลงในน้ำกลั่น)

2.8 การเตรียมสารละลาย 1N NaOH

2.8.1 สารที่ใช้เตรียม

- 1) NaOH Crystal
- 2) น้ำกลั่น

2.8.2 วิธีเตรียม (ปริมาตรที่เตรียม 500 มิลลิลิตร)

ชั่งผลึก NaOH 20 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร เก็บใส่ขวดไว้ที่อุณหภูมิห้อง

2.9 การเตรียม Hank' balance salt solution (HBSS)

2.9.1 สารที่ใช้เตรียม

- 1) HBSS powder
- 2) NaHCO_3 crystal
- 3) 1 N HCl
- 4) 1 N NaOH
- 5) น้ำกลั่น

2.9.2 วิธีเตรียม

1) ละลาย HBSS powder 1 ซองใน Erlenmeyer flask ที่มีน้ำกลั่นอยู่ 500 มิลลิลิตร ล้างผง HBSS ที่ติดอยู่ในซองออกให้หมดเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร เขย่าจนผงละลายเข้ากันได้ดี

2) ชั่ง NaHCO_3 0.35 กรัม ละลายผลึก NaHCO_3 ในสารละลาย HBSS เขย่าจนผลึกละลายหมด

3) ปรับ pH โดยใช้ 1 N HCl และ 1 N NaOH จนได้ pH 7.1-7.3

4) ทำให้ปลอดเชื้อโดยใช้ Millipore membrane filter ขนาด 0.2 ไมโครเมตร

5) แบ่งใส่ขวด ขวดละ 100 มิลลิลิตร (aseptic technique) เก็บที่ 2-8 องศาเซลเซียส

2.10 การเตรียมสารละลาย AgNO_3

2.10.1 สารที่ใช้เตรียม

1) AgNO_3

2) น้ำกลั่น

2.10.2 วิธีเตรียม

ชั่ง AgNO_3 5 กรัม ละลายผลึก AgNO_3 ในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร เก็บไว้ในหลอดที่ใช้กระดาษฟอยด์หุ้มป้องกันแสง เก็บไว้ที่ 2-8 องศาเซลเซียส

2.11 การเตรียม Gelatin

2.11.1 สารที่ใช้เตรียม

1) Gelatin

2) กรดฟอร์มิก

3) น้ำกลั่น

2.11.2 วิธีเตรียม

1) ชั่ง Gelatin 1.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

2) เติมกรดฟอร์มิก 500 ไมโครลิตร

ภาคผนวก ข
ข้อมูลการเผยแพร่

Cytogenetic characterisation and chromosomal mapping of microsatellite and telomeric repeats in two gecko species (Reptilia, Gekkonidae) from Thailand

Weera Thongnetr¹, Surachest Aiumsumang², Rodjarin Kongkaew³,
Alongklod Tanomtong³, Chatmongkon Suwannapoom⁴, Sumalee Phimphan²

1 Walai Rukhvej Botanical Research institute, Mahasarakham University, Kantharawichai, Maha Sarakham, Thailand **2** Biology program, Faculty of Science and Technology, Phetchabun Rajabhat University, Phetchabun, 67000, Thailand **3** Program of Biology, Faculty of Science, Khon Kaen University, Muang, Khon Kaen, 40002, Thailand **4** Department of Fishery, School of Agriculture and Natural Resources, University of Phayao, Muang, Phayao, 56000, Thailand

Corresponding author: Sumalee Phimphan (joodoof@gmail.com)

Academic editor: N. Golub | Received 1 September 2020 | Accepted 16 December 2020 | Published 2 February 2021

<http://zoobank.org/FC36370E-12AB-4DED-960D-0B72CCBC8008>

Citation: Thongnetr W, Aiumsumang S, Kongkaew R, Tanomtong A, Suwannapoom C, Phimphan S (2021) Cytogenetic characterisation and chromosomal mapping of microsatellite and telomeric repeats in two gecko species (Reptilia, Gekkonidae) from Thailand. CompCytogen 15(1): 41–52. <https://doi.org/10.3897/compcytogen.v15.i1.58208>

Abstract

Studies of chromosomes of *Cyrtodactylus jarujini* Ulber, 1993 and *C. doisuethep* Kunya et al., 2014 to compare microsatellite and TTAGGG sequences by classical and molecular techniques were conducted in Thailand. Karyological typing from a conventional staining technique of *C. jarujini* and *C. doisuethep* showed diploid chromosome numbers of 40 and 34 while the Fundamental Numbers (NF) were 56 in both species. In addition, we created the chromosome formula of the chromosomes of *C. jarujini* showing that $2n (40) = L^{sm}_1 + L^{sm}_2 + L^t_3 + M^m_1 + M^t_4 + S^m_2 + S^a_2 + S^t_5$ while that of *C. doisuethep* was $2n (34) = L^{sm}_3 + L^m_2 + L^t_3 + M^m_1 + M^t_2 + S^m_4 + S^a_1 + S^t_1$. Ag-NOR staining revealed NOR-bearing chromosomes in chromosome pairs 13 and 14 in *C. jarujini*, and in chromosome pairs 9 and 13 in *C. doisuethep*. This molecular study used the FISH technique, as well as microsatellite probes including (A)₂₀, (TA)₁₅, (CGG)₁₀, (GAA)₁₀, (TA)₁₅ and TTAGGG repeats. The signals showed that the different patterns in each chromosome of the Gekkonids depended on probe types. TTAGGG repeats showed high distribution on centromere and telomere regions, while (A)₂₀, (TA)₁₅, (CGG)₁₀, (GAA)₁₀ and (TA)₁₅ bearing dispersed over the whole genomes including chromosomes and some had strong signals on only a pair of homologous chromosomes. These results suggest that the genetic linkages have been highly differentiated between the two species.

Keywords

Ag-NOR, *Cyrtodactylus doisuthep*, *Cyrtodactylus jarujini*, FISH microsatellite, karyotype

Introduction

Bent-toed geckos (genus *Cyrtodactylus* Gray, 1827) in Thailand have been classified into approximately 24 species (Chuaynkern and Chuaynkern 2012). *Cyrtodactylus jarujini* ranges from Nong kai, Bueng Kan and Nakhon Phanom Provinces, Thailand. More recently, Sumontha et al. (2008), found it in two caves on two sandstone hills, Phu Sing and Phu Thok, where it remained by day on the walls and crevices and emerged from the caves at night. Both in Phu Sing and Phu Thok, syntropy was found with the cave-dwelling agamid *Mantheyus phuwanensis* (Manthey and Nabhitabhata 1991). It has also been recorded from central and northern Laos (Stuart 1999), but the exact identity of the Lao populations has to be re-evaluated (Fig. 1A). In contrast *C. doisuthep* is known only from Doisuthep in the Doi Suthep-Pui Range, Mueang District, Chiang Mai Province, northern Thailand (Fig. 1B).

Only 13% of gekkonid species have been karyotyped (Olmo and Signorino 2005) and were studied with conventional cytogenetic methods, including routine staining, as well as R-, NOR- and C-banding (Moritz 1983; Olmo and Signorino 2005; Shibaike et al. 2009). However, a small number of species were studied by molecular cytogenetic techniques (Kawai et al. 2009). The diploid number amongst gekkonid lizards ranges from $2n = 28$ to 46 with most of the karyotypes composed of 28–46 chromosomes (Gorman 1973; Olmo 1986; Schmid et al. 1994). There are five karyotyped *Cyrtodactylus* species: *C. consobrinus* $2n = 48$, $NF = 50$, *C. pubisulcus* $2n = 42$, $NF = 44$ (Ota et al. 1992); *C. interdigitalis* $2n = 42$, $NF = 52$ and *C. kunyai* $2n = 40$, $NF = 52$ (Thongnetr et al. 2019a); *C. sai yok* $2n = 42$, $NF = 42$ (Thongnetr et al. 2019b). The typical karyotype consists of a gradual series of telocentric chromosomes (sometimes with a few metacentric) and there is no distinction between macro- and microchromosomes, the centromere often being subterminal (Gorman 1973). Karyotype evolution within the group is accompanied by fissions and fusions and pericentric inversions (Gorman 1973; Olmo and Signorino 2005). This information on chromosomes is considered important along with other information for identification of the species (Campiranont 2003), especially the identification of related species, because of similarity of shape, appearance and other phenotypic expressions that are presumed to be associated with the genotype. Information from sequences of DNA allows us to understand the creation of a phylogenetic tree (dendrogram), because these characteristics often have a particular pattern. Information on chromosomes can be used to identify the phylogenetic relationship between species and population of animals (Lauhajinda and Taksintum 2006). Therefore, it is necessary to study the karyology of this group. In addition, geckos could be affected by the actions of humans in their use of household objects and agricultural chemicals. Thus, the gecko is one of the important groups of animals that can serve as a model for studying the environmental impact from human actions in the future.

Material and methods

The samples of *C. jarujini* and *C. doisuthep* were collected from the Phu Wua, Ban Phaeng District, Nakhonphanom Province and Doi Suthep-Pui Range, Mueang District, Chiang Mai Province, Thailand, (permission from an ethical committee ID U1-04498-2559). Chromosomes were directly prepared *in vivo* (Ota et al. 1990) by 0.1% colchicine were injected into the animals' intramuscular and abdominal cavity and left for 8–10 hours. Bone marrow, liver and testis (male) were cut into small pieces and then mixed with 0.075 M potassium chloride (KCl). After discarding all large cell pieces, 15 ml of cell suspension was transferred to a centrifuge tube and incubated 30–40 minutes, then centrifuged at 3,000 rpm for 8 minutes. Cells were fixed in fresh cool fixative of methanol:glacial acetic acid (3:1) and gradually made up to 8 ml before centrifuging again at 3,000 rpm for 8 minutes, whereupon the supernatant was discarded. Fixation was repeated until the supernatant was clear and the pellet was mixed with 1 ml fixative. Using conventional Giemsa staining, a drop of the mixture was added to a clean and cold slide by micropipette followed by the air-dry technique. The slide was conventionally stained with 20% Giemsa solution for 30 minutes (Patawang et al. 2014). Then, the slides were rinsed thoroughly with running tap water to remove excess stain. Afterwards, the slides were allowed to air-dry at room temperature. Ag-NOR banding was analysed following the method of Howell and Black (1980). Two drops each of 50% silver nitrate and 2% gelatine solutions were added to slides, respectively. Then, they were sealed with cover glasses and incubated at 60 °C for 5–10 minutes. Afterwards, they were then soaked in distilled water until the cover glasses were separated. Finally, the slides were allowed to air-dry at room temperature and observed under microscope. Metaphase figures were analysed according to the chromosome classification of Chaiyasut (1989) and Turpin and Lejeune (1965). Chromosomes were classified as metacentric (m), submetacentric (sm), acrocentric (a) and telocentric (t). The Fundamental Number (NF: number of chromosome arms) is obtained by assigning a value of two to metacentric, submetacentric and acrocentric chromosomes and one to telocentric chromosomes. The use of microsatellite probes described by Kubat et al. (2008) was followed here with slight modifications. These sequences were directly labelled with Cy3 at the 5'-terminal during synthesis by Sigma (St. Louis, MO, USA). Fluorescence *In Situ* Hybridization (FISH) was performed under highly stringent conditions on mitotic chromosome spreads (Pinkel et al. 1986). After denaturation of chromosomal DNA in 70% formamide/ 2×SSC at 70 °C, spreads were incubated in 2×SSC for 4 min at 70 °C. The hybridization mixture (2.5 ng/μL probes, 2 μg/μL salmon sperm DNA, 50% deionized formamide, 10% dextran sulphate) was dropped on the slides, and the hybridization was performed overnight at 37 °C in a moist chamber containing 2×SSC. The post hybridization wash was carried out with 1×SSC for 5 min at 65 °C. A final wash was performed at room temperature in 4×SSC for 5 min. Finally, the chromosomes were counterstained with DAPI (1.2 μg/mL), mounted in antifading solution (Vector, Burlingame, CA, USA), and analyzed in fluorescence microscope Nikon ECLIPSE.

Results

The diploid chromosome number and fundamental number

The diploid numbers in *C. jarujini* and *C. doisuhep*, were 40 and 34, respectively (Fig. 1C, E), whereas NF was 56 in both species (Fig. 1G, I). The type chromosomes of metacentric, submetacentric, acrocentric and telocentric were 8-4-4-24 and 14-6-2-12. There are no sex-related chromosomal heteromorphisms in the two species here studied.

The karyological characteristics

The karyotype of *C. jarujini* consists of two large metacentric, four large submetacentric, six large telocentric, two medium metacentric, eight medium telocentric, four small metacentric, four small acrocentric and ten small telocentric chromosomes. The karyotype formula for *C. jarujini* is as follows: $2n (40) = L^m_2 + L^{sm}_4 + L^t_6 + M^m_2 + M^t_8$

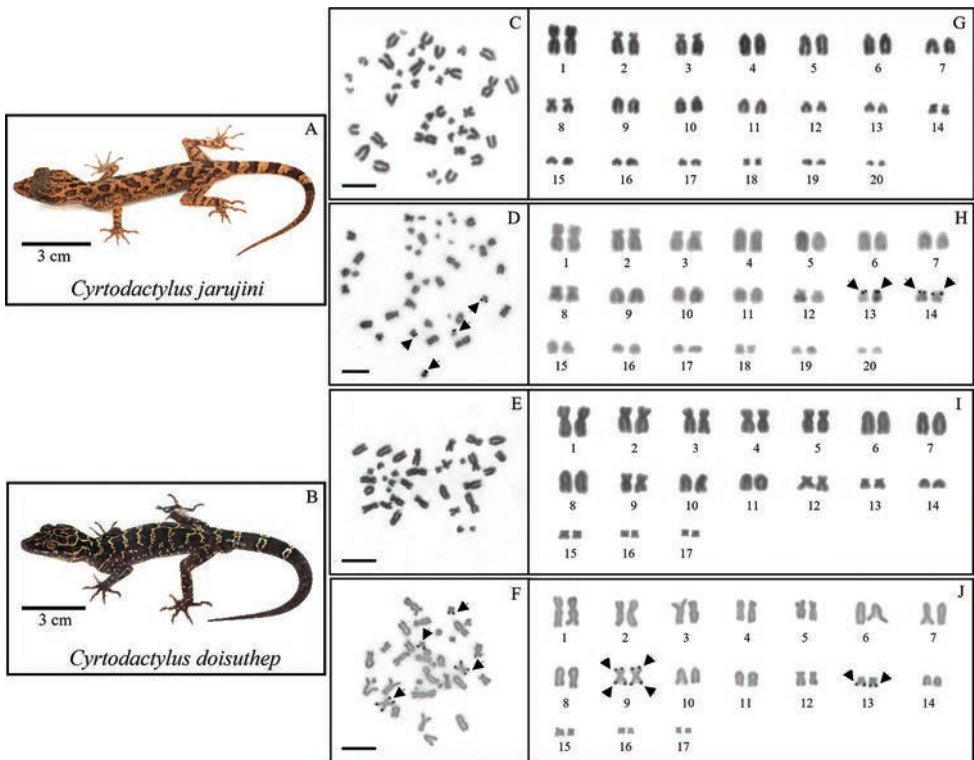


Figure 1. The *C. jarujini* specimen (A), metaphase chromosome plate and karyotypes (A–G) by conventional technique, (D–H) by Ag-NOR banding technique. The *C. doisuhep* specimen (B), metaphase chromosome plate and karyotypes (E–I) by conventional technique, (F–J) by Ag-NOR banding technique. Arrows indicated Ag-NORs regions. Scale Bar: 5 μm.

+ $S^m_4 + S^a_4 + S^t_{10}$ or $2n (40) = 8m + 4sm + 4a + 24t$. The karyotype of *C. doisuthep* comprises four large metacentric, six large submetacentric, six large telocentric, two medium metacentric, four medium telocentric, eight small metacentric, two small acrocentric and two small telocentric chromosomes. The karyotype formula for *C. doisuthep* is as follows: $2n (34) = L^m_4 + L^{sm}_6 + L^t_6 + M^m_2 + M^t_4 + S^m_8 + S^a_2 + S^t_2$ or $2n (34) = 14m + 6sm + 2a + 12t$.

Ag-NOR banding

This technique highlighted active NORs on pairs 13 and 14 of *C. jarujini* (Fig. 1D, H) and pairs 9 and 13 of *C. doisuthep* (Fig. 1F, J).

Microsatellite pattern

Microsatellites $(A)_{20}$, $(TA)_{15}$, $(CAG)_{10}$, $(CGG)_{10}$, $(GAA)_{10}$ and $(TA)_{15}$ abundantly distributed in some chromosomes, usually in telomeric regions of both species studied. FISH with the telomeric probe TTAGGG revealed hybridization signals on each telomere of all chromosomes (Fig. 2).

Discussion

Karyological data of the genus *Cyrtodactylus*

The species in the *Cyrtodactylus* exhibited a variable chromosome number, ranging from 34 to 42, however, the most frequent numbers were 40 and 42. The present study showed that the chromosome numbers of *C. jarujini* and *C. doisuthep* were 40 and 34, respectively. The fundamental number was 56 in both species. These results showed difference and accordance with others *Cyrtodactylus* that have been reported (Table 1). The karyological characteristics of *C. jarujini* and *C. doisuthep* obtained in the present study are the first report of chromosome sizes and the chromosome types in these species. In different species of *Cyrtodactylus*, different karyological characteristics can be found. However, overall, of these karyotypes of *C. jarujini* and *C. doisuthep* resemble those of other *Cyrtodactylus* species and other gekkonids, which comprised many mono-armed (telocentric) and few bi-armed chromosomes (meta- or submetacentric). For those gekkonid chromosomes which have been reported previously, most species showed that the karyotype comprises of many mono-armed chromosomes and few bi-armed chromosomes. The present results of *C. jarujini* and *C. doisuthep* agreed with the chromosomal evolution line hypothesis within the gekkonid group (Trifonov et al. 2011). The karyotype of *C. jarujini* and *C. doisuthep* showed the gradient of most telocentrics, while comprising of a few bi-armed chromosomes. These features conform to the hypothesis of re-arrangement from ancestral karyotype by Robertsonian fissions, fusions or pericentric inversions (Gorman 1973; King 1987).

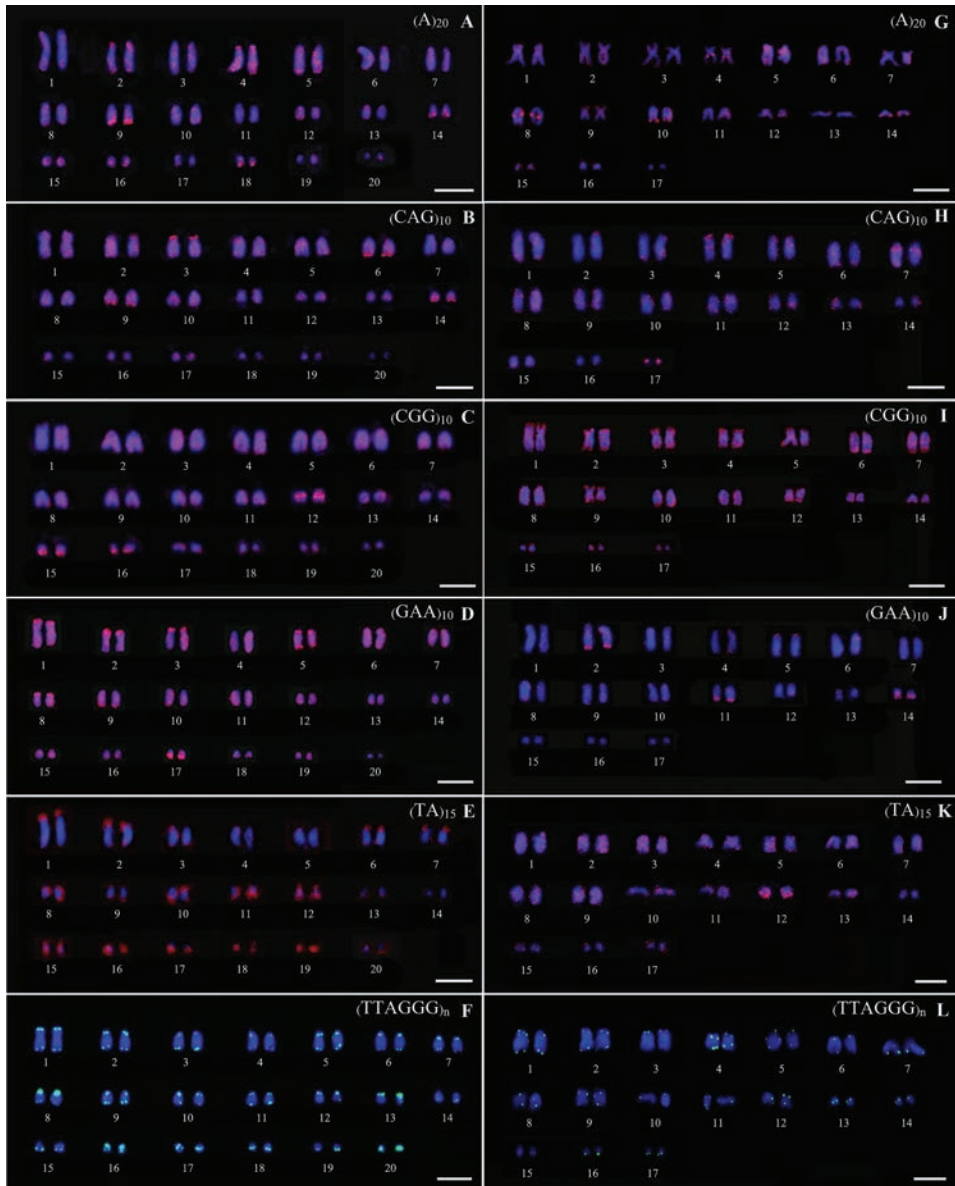


Figure 2. Karyotypes of two geckos presenting the patterns of microsatellite $(A)_{20}$, $(CAG)_{10}$, $(CGG)_{10}$, $(GAA)_{10}$, $(TA)_{15}$ and $TTAGGG$; *C. jarujini* (A–F), *C. doisuthep* (G–L). Scale Bars: 10 μ m.

Active NOR sites

Nucleolus organiser regions (NORs) are chromosome sites which contain the 18S and 28S ribosomal RNA genes. If these regions were active during the interphase prior to mitosis, they can be detected by silver nitrate staining (Howell and Black 1980). In the present study, the chromosome markers of both *Cyrtodactylus* are determined by using

Table 1. Karyotype reviews in the genera *Cyrtodactylus*, *Gekko* Laurenti, 1768 and *Hemidactylus* Goldfuss, 1820 (Gekkonidae, Squamata).

Species	2n	NF	Karyotype formula	NORs	Location	Reference
<i>Cyrtodactylus consobrinus</i> (Peters, 1871)	48	50	2bi-arm+46t	–	Malaysia	Ota et al. (1992)
<i>C. doisuthep</i> Kunya et al., 2014	34	56	14m+6sm+2a+12t	P9, 13	Thailand	Present study
<i>C. interdigitalis</i> Ulber, 1993	42	52	4m+2sm+4a+32t	P12	Thailand	Thongnetr et al. (2019a)
<i>C. jarujini</i> Ulber, 1993	40	56	8m+4sm+4a+24t	P13, 14	Thailand	Present study
<i>C. kunyai</i> Pauwels et al., 2014	40	52	8m+4sm+6a+22t	P12	Thailand	Thongnetr et al. (2019a)
<i>C. pubisulcus</i> Inger, 1958	42	44	2bi-arm+40t	–	Malaysia	Ota et al. (1992)
<i>C. saiyok</i> Panitvong, 2014	42	42	42t	P15	Thailand	Thongnetr et al. (2019b)
<i>Gekko chinensis</i> Gray 1842	40	46	6bi-armed+34uni-armed	–	China	Lau et al. (1997)
<i>G. gekko</i> (Linnaeus, 1758)	38	50	12bi-armed+26uni-armed	–	–	Cohen et al. (1967)
	38	50	Lm2+Lsm4+Lt4+Mt6+Sm4+Sa2+St16	P4	Thailand	Patawang et al. (2014)
<i>G. hokouensis</i> Pope, 1928	38	56	4m+6sm+20t+8bi-armed	P(L)19	China	Chen et al. (1986)
<i>G. monarchus</i> (Schlegel, 1836)	38	46	–	–	Malaysia	Ota et al. (1990)
<i>G. petricolus</i> Taylor, 1962	38	54	–	–	–	Ota (1989)
<i>G. shibatai</i> Toda et al., 2008	38	58	4m+8sm+18t+8bi-armed	P(L)19	Japan	Shibaike et al. (2009)
<i>G. tawaensis</i> Okada, 1956	38	58	4m+8sm+18t+8bi-armed	P(L)19	Japan	Shibaike et al. (2009)
<i>G. taylori</i> Grossmann et Ulber, 1990	42	–	–	–	Thailand	Ota and Nabhitabhata (1991)
<i>G. vertebralis</i> Toda et al., 2008	38	62	4m+14sm+14t+6bi-armed	P(L)19	Japan	Shibaike et al. (2009)
<i>Hemidactylus brookii</i> Gray, 1854	40	44	4bi-armed+36t	–	–	Bhatnagar (1962)
<i>H. flaviviridis</i> Rüppell, 1835	40	60	20bi-armed+20t	–	–	Asana and Mahabale (1941)
	46	46	46t	–	–	Makino and Momma (1949)
	40	52	12bi-armed+28t	–	–	Branch (1980)
<i>H. frenatus</i> Schlegel, 1836	46	46	46t	–	–	Makino and Momma (1949)
	40	54	14bi-armed+26t	P3	–	King (1978)
	40	46	6bi-armed+34t	–	–	Darevsky et al. (1984)
<i>H. mabouia</i> (Moreau de Jonnès, 1818)	42	56	14bi-armed+28t	–	–	Becak et al. (1972)
	42	54	12bi-armed+30t	–	–	McBee et al. (1987)

Remarks: 2n = diploid chromosome number, NORs = nucleolus organiser regions, SCR = subcentromeric regions, NF = fundamental number (number of chromosome arms), bi-arm = bi-armed chromosome, m = metacentric, sm = submetacentric, a = acrocentric, t = telocentric chromosome, L = large, S = small, P = chromosome pair and – = not available.

the Ag-NOR banding technique as shown in Table 1. *C. jarujini* had the acrocentric chromosome pair 13 and metacentric chromosome pair 14, which were the NOR-bearing chromosome. Pair 13 NORs were located on the short arm near the telomere (telomeric NOR) and the pair 14 NORs were located on the short arm near the centromere (centromeric NOR). *C. doisuthep* had the metacentric, two chromosome pair 9 and pair 13 which were the NOR-bearing chromosomes. Pair 9 NORs were located on the arm near the telomere (telomeric NOR) on both sides and the pair 13 NORs were located on the arm near the telomere (telomeric NOR).

The NORs in both species of genus *Cyrtodactylus* exhibited at the telomeric region on the long arm and short arm and are similar to the previous reports of the gekkonids for the Gekkonidae family by King (1978) and Moritz and King (1985). The NORs of *Dixonius siamensis* (Boulenger, 1898), *G. gekko*, *G. hokouensis*, *G. shibatai*, *G. tawaensis*, *G. vertebralis*, *H. frenatus* and *H. platyurus* were found at all regions on the short arm

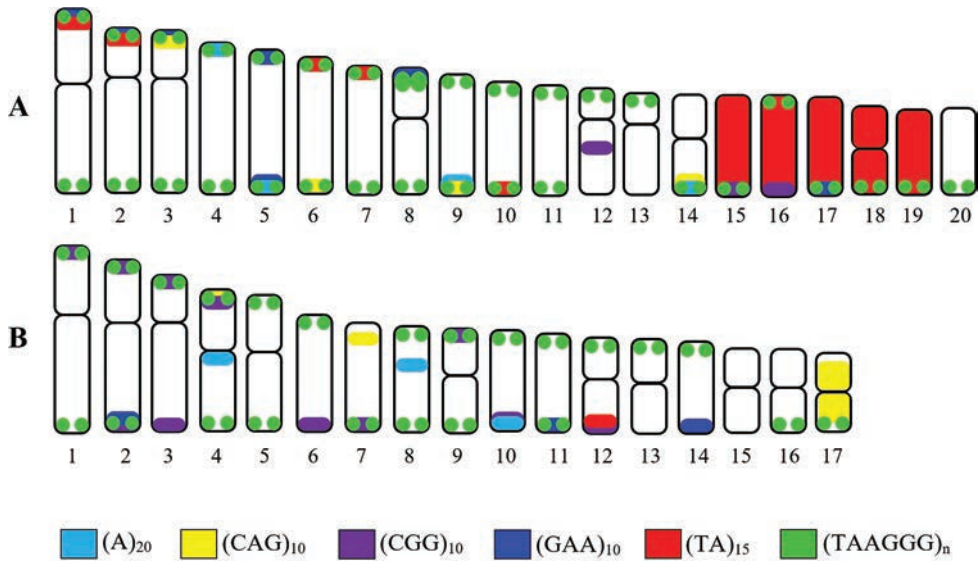


Figure 3. Idiograms represent the $(A)_{20}$, $(CAG)_{10}$, $(CGG)_{10}$, $(GAA)_{10}$, $(TA)_{15}$ and TTAGGG mapping on the chromosomes of *C. jarujini* (A) and *C. doisuhep* (B).

and that agrees with those previous reported (Asana and Mahabale 1941; Makino and Momma 1949; Bhatnagar 1962; Cohen et al. 1967; Becak et al. 1972; King 1978; Branch 1980; Darevsky et al. 1984; Chen et al. 1986; McBee et al. 1987; Ota 1989; Ota et al. 1990; Ota and Nabhitabhata 1991; Lau et al. 1997; Ota et al. 2001; Shibaike et al. 2009; Patawang et al. 2014; Trifonov et al. 2011; Trifonov et al. 2015).

Microsatellite pattern

Microsatellites or simple sequence repeats (SSRs) are oligonucleotides of 1–6 base pairs in length, forming excessive tandem repeats of usually 4 to 40 units (Tautz and Renz 1984; Ellegren 2004; Chistiakov et al. 2006). They show abundant distribution throughout eukaryotic genomes, being dispersed or clustered both in euchromatin or heterochromatin. They are highly polymorphic regarding copy number variations (Ellegren 2004). In our present study both species exhibited the same general hybridisation pattern for some applied probes with the motif TAAGGG repeat showing abundance at the telomeric ends of all chromosomes (Fig. 3), corroborating findings from other gekko groups studied to date (Srikulnath 2015). Otherwise, the dinucleotides $(A)_{20}$, $(CAG)_{10}$, $(CGG)_{10}$, $(GAA)_{10}$ and $(TA)_{15}$ accumulated exclusively in telomeric and subtelomeric chromosomal regions. However, the results clearly indicate that the microsatellite repeats are in high copy number on some chromosome pairs, according to previous reports on reptile groups (Pokorná et al. 2011; Matsubara et al. 2013).

Conclusions

In this study, the comparison of the cytogenetic maps of two *Cyrtodactylus* species (*C. jarujini* and *C. doisuthep*) enabled us to delineate the process of chromosomal reorganisation in this group. This is the first report in Thailand for the study of cytogenetics of both species. Therefore, the cytogenetic data obtained can be used to benefit cytotaxonomy and the study of evolution of geckos, as well as being an essential prerequisite for future genome projects of gecko groups.

Acknowledgements

This research project was financially supported by Mahasarakham University, Phetchabun Rajabhat University and The Unit of Excellence 2020 on Biodiversity and Natural Resources Management, University of Phayao (UoE63005).

References

- Asana JJ, Mahabale TS (1941) Spermatogonial chromosomes of two Indian lizards, *Hemidactylus flaviridis* Ruppell and *Mabuya macularia* Blyth. *Current Science* 11: 494–495.
- Becak ML, Becak W, Denaro L (1972) Chromosome polymorphism, geographical variation and karyotypes in Sauria. *Caryologia* 25: 313–326. <https://doi.org/10.1080/00087114.1972.10796485>
- Bhatnagar AN (1962) Chromosome cytology of two lizards, *Riopa punctata* Gmelin and *Hemidactylus brookii* Grey. *Caryologia* 15(2): 335–349. <https://doi.org/10.1080/00087114.1962.10796064>
- Branch WR (1980) Chromosome morphology of some reptiles from Oman and adjacent territories. *Journal of Oman Studies Special Report* 2: 333–345.
- Campiranont A (2003) Cytogenetics. Bangkok: Department of Genetics, Faculty of Science, Kasetsart University, 306 pp. [In Thai]
- Chistiakov DA, Hellemans B, Volckaert FAM (2006) Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: a review with special reference to fish genetics. *Aquaculture* 255: 1–29. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.11.031>
- Chaiyasut K (1989) Cytogenetics and Cytotaxonomy of the Genus *Zephyranthes*. Bangkok: Department of Botany, Faculty of Science, Chulalongkorn University. [In Thai]
- Chuaynkern Y, Chuaynkern C (2012) Checklist of reptiles in Thailand. *Journal of Wildlife in Thailand* 19(1): 75–162.
- Cohen MM, Huang CC, Clark HF (1967) The somatic chromosomes of 3 lizard species: *Gekko gekko*, *Iguana iguana* and *Crotaphytus collaris*. *Experientia* 23(9): 769–771. <https://doi.org/10.1007/BF02154168>

- Darevsky IS, Kupriyanova LA, Roshchin VV (1984) A new all-female triploid species of gecko and karyological data on the bisexual *Hemidactylus frenatus* from Vietnam. *Journal of Herpetology* 18: 277–284. <https://doi.org/10.2307/1564081>
- Ellegren H (2004) Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature Review Genetics* 5: 435–445. <https://doi.org/10.1038/nrg1348>
- Gorman GC (1973) The chromosome of the Reptilia, a cytotaxonomic interpretation. In: Chiarelli AB, Cappana E (Eds) *Cytotaxonomy and Vertebrate Evolution*. Academic Press, New York, 349–424.
- Howell WM, Black DA (1980) Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia* 36(8): 1014–1015. <https://doi.org/10.1007/BF01953855>
- Kawai A, Ishijima J, Nishida C, Kosaka A, Ota H, Kohno S, Matsuda Y (2009) The ZW sex chromosomes of *Gekko hokouensis* (Gekkonidae, Squamata) represent highly conserved homology with those of avian species. *Chromosoma* 118: 43–51. <https://doi.org/10.1007/s00412-008-0176-2>
- King M (1978) A new chromosome form of *Hemidactylus frenatus* (Duméril and Bibron). *Herpetologica* 34: 216–218.
- Kubat Z, Hobza R, Vyskot B, Kejnovsky E (2008) Microsatellite accumulation in the Y chromosome of *Silene latifolia*. *Genome* 51: 350–356. <https://doi.org/10.1139/G08-024>
- Lauhajinda W, Taksintum W (2006) *Principles of Animal Taxonomy*. Kasetsart University Press, Bangkok, 256 pp. [In Thai]
- Lau MW, Ota H, Bogadek A (1997) Chromosome polymorphism and karyotype of *Gekko chinensis* (Gekkonidae: Reptilia) from Hong Kong. *Journal of Herpetology* 31(1): 137–139. <https://doi.org/10.2307/1565344>
- Makino S, Momma E (1949) An idiogram study of the chromosome in some species of reptiles. *Cytologia* 15: 96–108. <https://doi.org/10.1508/cytologia.15.96>
- Matsubara K, Knopp T, Sarre DS, Georges A, Ezaz T (2013) Karyotypic analysis and FISH mapping of microsatellite motifs reveal highly differentiated XX/XY sex chromosomes in the pink-tailed worm-lizard (*Aprasia parapulchella*, Pygopodidae, Squamata). *Molecular Cytogenetics* 6: e60. <https://doi.org/10.1186/1755-8166-6-60>
- McBee K, Biekhram JW, Dixon JR (1987) Male heterogamety and chromosomal variation in Caribbean geckos. *Journal of Herpetology* 21: 68–71. <https://doi.org/10.2307/1564380>
- Moritz C, King D (1985) Cytogenetic perspectives on parthenogenesis in the Gekkonidae. In: Grigg G, Shine R, Ehrmann H (Eds) *Biology of Australasian Frogs and Reptiles*. Royal Zoological Society of New South Wales, Sydney, 327–337.
- Moritz C (1983) Parthenogenesis in the endemic Australian lizard *Heteronotia binoei* (Gekkonidae). *Science* 220: 735–737. <https://doi.org/10.1126/science.220.4598.735>
- Olmo E, Signorino G (2005) Chromorep: a reptiles chromosomes database. <http://chromorep.univpm.it/> [Accessed July 2020]
- Ota H (1989) *Japalura brevipes* Gressitt (Agamidae: Reptilia), a valid species from high altitude area of Taiwan. *Herpetologica* 45(1): 55–60. <https://doi.org/10.2307/1445482>
- Ota H, Hikida T, Matsui M, Mori A (1990) Karyotype of *Gekko monarchus* (Squamata: Gekkonidae) from Sarawak, Malaysia. *Japanese Journal of Herpetology* 13(4): 136–138. https://doi.org/10.5358/hsj1972.13.4_136

- Ota H, Nabhitabhata J (1991) A new species of Gekko (Gekkonidae: Squamata) from Thailand. *Copeia* 2: 503–509. <https://doi.org/10.2307/1446598>
- Ota H, Hikida T, Matsui M, Mori A (1992) Karyotypes of two species of the genus *Cyrtodactylus* (Squamata: Gekkonidae) from Sarawak, Malaysia. *Caryologia* 45(1): 43–49. <https://doi.org/10.1080/00087114.1992.10797209>
- Ota H, Hikida T, Nabhitabhata J, Panha S (2001) Cryptic taxonomic diversity in two broadly distributed lizards of Thailand (*Mabuya macularia* and *Dixonius siamensis*) as revealed by chromosomal investigations (Reptilia: Lacertilia). *The Natural History Journal of Chulalongkorn University* 1(1): 1–7.
- Patawang I, Tanomtong A, Jumrusthanasan S, Kakampuy W, Neeratanaphan L, Pinthong K (2014) Chromosomal characteristics of NORs and karyological analysis of tokey gecko, *Gekko gecko* (Gekkonidae, Squamata) from mitotic and meiotic cell division. *Cytologia* 79(3): 315–324. <https://doi.org/10.1508/cytologia.79.315>
- Pinkel D, Straume T, Gray J (1986) Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83: 2934–2938. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.9.2934>
- Pokorná M, Kratochvíl L, Kejnovský E (2011) Microsatellite distribution on sex chromosomes at different stages of heteromorphism and heterochromatinization in two lizard species (Squamata: Eublepharidae: *Coleonyx elegans* and Lacertidae: *Eremias velox*). *BMC Genetics* 12: e90. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-12-90>
- Shibaike Y, Takahashi Y, Arikura I, Iiizumi R, Kitakawa S, Sakai M, Imaoka C, Shiro H, Tanaka H, Akakubo N, Nakano M, Watanabe M, Ohne K, Kubota S, Kohno S, Ota H (2009) Chromosome evolution in the lizard genus *Gekko* (Gekkonidae, Squamata, Reptilia) in the East Asian islands. *Cytogenetic and Genome Research* 127: 182–190. <https://doi.org/10.1159/000303334>
- Srikulnath K, Uno Y, Nishida C, Ota H, Matsuda Y (2015) Karyotype reorganization in the Hokou Gecko (*Gekko hokouensis*, Gekkonidae): The Process of Microchromosome Disappearance in Gekkota. *PLoS ONE* 10(8): e0134829. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134829>
- Stuart B (1999) Amphibians and Reptiles. In: Duckworth JW, Salter RE, Khounboline K (Eds) *Wildlife in Lao PRD: 1999 Status Report*. Vientiane: IUCN – The World Conservation Union – Wildlife Conservation Society Centre for Protected Areas and Watershed Management, 43–67.
- Sumontha M, Kunya K, Pauwels OSG (2008) Took-kae-pa Jarujin (*Cyrtodactylus jarujini*) nai thammachat [Jarujin's Slender-toed Gecko (*Cyrtodactylus jarujini*) in the wild]. *Ecological Notes* 2(1): 22–23. [In Thai]
- Thongnetr W, Tanomtong A, Prasopsin S, Maneechot N, Pinthong K, Patawang I (2019a) Cytogenetic study of the Bent-toed Gecko (Reptilia, Gekkonidae) in Thailand; I: Chromosomal classical features and NORs characterization of *Cyrtodactylus kunyai* and *C. interdigitalis*. *Caryologia* 72(1): 23–28. <https://doi.org/10.13128/cayologia-248>
- Thongnetr W, Tanomtong A, Prasopsin S, Patawang I (2019b) Karyotype of the Sai Yok Bent-toed Gecko, *Cyrtodactylus sai yok* Panitvong et al., 2014 (Reptilia, Gekkonidae). 50 years Mahasarakham University: Public Devotion is a Virtue of the Learned. Mahasarakham University, Thailand, 655–667. [In Thai]

- Tautz D, Renz M (1984) Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Res* 12: 4127–4138. <https://doi.org/10.1093/nar/12.10.4127>
- Trifonov AV, Giovannotti M, O'Brien PCM, Wallduck M, Lovell F, Rens W, Parise-Maltempi PP, Caputo V, Ferguson-Smith AM (2011) Chromosomal evolution in Gekkonidae. I. Chromosome painting between *Gekko* and *Hemidactylus* species reveals phylogenetic relationships within the group. *Chromosome Research* 19: 843–855. <https://doi.org/10.1007/s10577-011-9241-4>
- Trifonov AV, Paoletti A, Barucchi CV, Kalinina T, O'Brien CMP, Ferguson-Smith AM, Giovannotti M (2015) Comparative Chromosome Painting and NOR Distribution Suggest a Complex Hybrid Origin of Triploid *Lepidodactylus lugubris* (Gekkonidae) PLoS ONE 10(7): e0132380. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132380>
- Turpin R, Lejeune J (1965) *Les Chromosomes Humains*. Gauthier Villars, Paris, 535 pp.
- Ulber T (1993) Bemerkungen über cyrtodactyline Geckos aus Thailand nebst Beschreibungen von zwei neuen Arten (Reptilia: Gekkonidae). *Mitteilungen aus dem Zoologischen Museum in Berlin* 69(2): 187–200. <https://doi.org/10.1002/mmzn.19930690202>

ประวัตินักวิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย

ชื่อ – นามสกุล ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุมาลี พิมพันธ์
ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์ประจำหลักสูตรสาขาวิชาชีววิทยา

หน่วยงานและสถานที่ติดต่อได้สะดวก

สูตรสาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์
83 หมู่ 11 ตำบลสะเดียง อำเภอเมือง จังหวัดเพชรบูรณ์ 67000
โทรศัพท์ มือถือ 0834197025
e-mail: joodoof@gmail.com

ประวัติการศึกษา

ปริญญาตรี วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาชีววิทยา มหาวิทยาลัยขอนแก่น
ปริญญาโท วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาชีววิทยา มหาวิทยาลัยขอนแก่น
ปริญญาเอก ปรัชญาคุณวุฒิบัณฑิต สาขาชีววิทยา มหาวิทยาลัยขอนแก่น

สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

พันธุศาสตร์เซลล์ของสัตว์

งานวิจัยที่ตีพิมพ์เผยแพร่

บทความวิจัยในการประชุมสัมมนาวิชาการ

1. **Phimphan, S.** and Tanomtong, A. 2012. Standardized Karyotype and Idiogram of Common Indian Toad, *Duttaphrynus melanostictus* (Schneider, 1799) by Conventional Staining and Ag-NOR banding Techniques. In: The 6th Graduate Research Conference. pp. 325-334. Udon Thani Rajabhat University, Udon Thani.
2. **Phimphan, S.**, Sangpakdee, W., Supiwong, W., Patawang, I., Tanomtong, A. 2015. Cytogenetics study and characterization of microsatellites d(CGG)₁₀, d(CA)₁₅ and telomeric regions in the genome of Blacktail snapper, *Lutjanus fulvus* (Perciformes, Lutjanidae). In: The 19th National Genetics Conference 2015 –Genetics and Genomics “from Molecular Studies to Applications”. pp. 78-84. Centara Hotel & Convention Centre, Khon Kaen.
3. **สุมาลี พิมพันธ์ และ สุรเชษฐ เอี่ยมสำอาน.** 2562. โครโมโซมของอังกกรายหัวใหญ่ (*Xenophrys major*) ด้วยการย้อมสีแบบธรรมดาและแถบสีแบบนอร์. รายงานสืบเนื่องการประชุมสัมมนาวิชาการ

- ระดับชาติเครือข่ายบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยราชภัฏภาคเหนือ ครั้งที่ 19. หน้า 73-80. มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่ จ.เชียงใหม่.
4. สลันญา สอนสุภาพ เจนจิรา เชื้อบุญจันทร์ สุรเชษฐ เอี่ยมสำอาง และสุมาลี พิมพันธ์. 2562. โครโมโซมของปลาอีสกเทศ (*Labeo rohita*) และปลาตะเพียนขาว (*Barbonymus gonionotus*) ในจังหวัดเพชรบูรณ์. รายงานสืบเนื่องการประชุมสัมมนาวิชาการระดับชาติเครือข่ายบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยราชภัฏภาคเหนือ ครั้งที่ 19. หน้า 109-119. มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่ จ.เชียงใหม่.
 5. สุปรียา ศิริวารินทร์ บุชยาแก้วย้อย สุรเชษฐ เอี่ยมสำอาง และสุมาลี พิมพันธ์. 2563. โครโมโซมตักแตนลิงจุดเชื่อมและตักแตนหน้าเอียงขาสี่ฟ้าจากจังหวัดเพชรบูรณ์. รายงานสืบเนื่องการประชุมวิชาการระดับชาติพิบูลสงครามวิจัย ครั้งที่ 6. หน้า 97. มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม (ส่วนทะเลแก้ว) จ.พิษณุโลก.
 6. อารียา แสงลามก อีรพงษ์ ขุนเกี่ยม สุรเชษฐ เอี่ยมสำอาง และสุมาลี พิมพันธ์. 2563. โครโมโซมจิ้งหรีดทองดำ จิ้งหรีดทองแดง และจิ้งโกร่งในจังหวัดเพชรบูรณ์. รายงานสืบเนื่องการประชุมวิชาการระดับชาติพิบูลสงครามวิจัย ครั้งที่ 6. หน้า 100. มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม (ส่วนทะเลแก้ว) จ.พิษณุโลก.

บทความวิจัยที่เผยแพร่ในวารสารที่อยู่ในฐานข้อมูล Thai-journal citation index (TCI)

1. สุมาลี พิมพันธ์, อลงกลด แทนอมทอง, ยอดชาย ช่วยเงิน, และ โดม ประทุมทอง 2558. คาร์ิโอไทป์ของไก่ป่าแดงตุ้มหูขาว (*Gullus gallus spadiceus* Linnaeus, 1758) ด้วยการเพาะเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากไข่วิทยาศาสตร์ มข. 43(1): 39-48.
2. Phimphan, S., Supiwong, W. and Khakhong, S. 2015. Standardized Karyotype and Idiogram of False Clown Anemonefish, *Amphiprion ocellaris* Cuvier, 1830 (Amphiprioninae, Perciformes). Journal of Fisheries Technology Research 9(1): 43-52.
3. ศิริพร แสงศักดิ์, อลงกลด แทนอมทอง, สุมาลี พิมพันธ์ และ อีสสระ ปะทะวัง. 2560. พันธุศาสตร์เซลล์ของแมวดาว (*Prionailurus bengalensis*) ในประเทศไทยด้วยเทคนิคการย้อมสีแบบธรรมดาและแถบสีแบบนอร์. วารสารวิทยาศาสตร์ คชสส 39(2): 96-108.
4. สุมาลี พิมพันธ์ วิวรรณ แสงภักดี กฤติยา แสงภักดี และ อลงกลด แทนอมทอง. 2560. โครโมโซมและการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสของตักแตนสีน้ำตาล (*Cyrtacanthacris tatarica* Linnaeus, 1758) ในประเทศไทย. วารสารวิทยาศาสตร์ มข. KUU Science Journal 43(1): 469-477.
5. สุมาลี พิมพันธ์ และ วิวรรณ แสงภักดี. 2561. แคริโอไทป์ของตักแตนข้าวปิกสั้น (*Pseudoxya diminuta* Walker, 1871) ในประเทศไทย. วารสารวิทยาศาสตร์แห่งมหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี 14(2): 38-44.

6. **Phimphan, S.**, Rojrung, R., Aiumsumang, A., Koomsab, K. and Tanomtong, A. 2020. Karyological Analysis of Lesser Bamboo Rat, *Cannomys badius* (Rodentia, Rhizomyinae) by Classical and Molecular Cytogenetic Techniques. *KKU Science Journal* (accepted)
7. **Phimphan, S.**, Aiumsumang, A. and Koomsab, K. 2020. Karyotype Analysis and Idiogram in the *Channa gachua* from Phetchabun Province by Conventional Staining and Ag-NOR Banding Techniques. *Journal of Fisheries Technology Research*. (accepted)

• บทความวิจัยที่เผยแพร่ในวารสารนานาชาติที่อยู่ในฐานข้อมูล SCOPUS และ ISI Impact Factor

1. **Phimphan, S.**, Tanomtong, A., Patawang, I., Kaewsri, S., Jantarat, S. and Sanoamuang, L. 2013. Cytogenetic Study of Northeastern Butterfly Lizard, *Leiolepis reevesii rubritaeniata* (Squamata, Agamidae) in Northeast Thailand. *Cytologia* 78(2): 133-140. 80(2): 167-172.
2. Siripiyasing, P., Tanomtong, A., Jumrusthanasan, S., Patawang, I., **Phimphan, S.**, Sanoamuang, L. 2013. First cytogenetic study of Malayan snail-eating turtle, *Malayemys macrocephala* (Testudines, Geoemydidae) in Thailand. *Cytologia* 78(2): 125-132.
3. **Phimphan, S.**, Tanomtong, A., Jumrusthanasan, S., Supiwong, W., Siripiyasing, P. and Sanoamuang, L. 2013. First Report of NOR Polymorphism and Chromosome Analysis of John's Snapper, *Lutjanus johnii* (Perciformes, Lutjanidae) in Thailand. *Cytologia* 78(4): 335-344.
4. Patawang, I., Tanomtong, A., **Phimphan, S.**, Chuaynkern, Y., Chuaynkern, C., Phaengphairee, P., Khruetanet, W., 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.
5. **Phimphan, S.**, Tanomtong, A., Supiwong, W., Khongcharoensuk, H., Suvarnaraksha, A. and Kaewsri, S. 2014. Karyological analysis of the Barramundi, *Lates calcarifer* (Perciformes, Latidae). *Cytologia* 80(2): 167-172.
6. Sangpakdee, W. **Phimphan, S.**, Tanomtong, A., Patawang, I., Pinthong, K. and Neeratanaphan, L. 2015. Karyological study of *Lutjanus ehrenbergii* and *L. carponotatus* (perciformes, lutjanidae) by classical and Ag-NOR staining techniques. *Nucleus* 59(1): 53-59.

7. Patawang, I., Pinthong, K., **Phimphan, S.**, Chuaynkern, Y., Duengkae, P., Tanomtong, A. 2016. Karyological characteristics of the Koh Tao caecilian, *Ichthyophis kohtaoensis* (Amphibia: Gymnophiona: Ichthyophiidae) by conventional staining and Ag-NOR banding techniques. *Rendiconti Lincei-Scienze Fisiche e Naturali*; DOI: 10.1007/s12210-016-0534-6
8. Sangpakdee, W., **Phimphan, S.**, Liehr, T., Fan, X., Pinthong, K., Patawang, I., Tanomtong, A. 2016. Characterization of chromosomal rearrangements in pileated gibbon (*Hylobates pileatus*) using multiplex-FISH technique. *The Nucleus* 59(2): 131-135. DOI: 10.1007/s13237-016-0171-6
9. **Phimphan, S.**, Sangpakdee, W., Sangpakdee, K. and Tanomtong A. 2016. Chromosomal analysis and meiosis studies of *Oxya chinensis* (Orthoptera: Acrididae) from Thailand. *The Nucleus*. 60(1): 9-15.
10. Sangpakdee, W., **Phimphan, S.**, Tengjaroenkul, B., Pinthong, K., Neeratanaphan, L. and Tanomtong, A. 2017. Cytogenetics Study of Three Microhylid Species (Anura, Microhylidae) from Thailand. *Cytologia* 82(1): 67-74.
11. Patawang, I., Tanomtong, A., **Phimphan, S.**, Pinthong, K., Neeratanaphan, L. 2017. Standardized karyotype and idiogram of Bengal monitor lizard, *Varanus bengalensis* (Squamata, Varanidae). *Cytologia* 82(1): 75-82. [IF 0.913 (2016), Q4].
12. **Phimphan, S.**, Supiwong, W., Tanomtong, A., Pinthong, K., Sangpakdee W. and Kaewsri, S. 2017. Karyotypic Study of Five Lutjanid Species Using Conventional and Ag-NORs Banding Techniques. *Cytology and Genetics* 51(4): 315–324.
13. Rattanayuvakorn, S., Tanomtong, A., **Phimphan, S.**, Sangpakdee, W., Pinmongkhonkul, S. and Phintong. 2017. Karyological Study of Tusker and Tuskless Male Asian Elephant (*Elephas maximus*) by Conventional, GTG-, and Ag-NOR Banding Techniques. *Cytologia* 82(4): 349–354.
14. Supiwong, W., **Phimphan, S.**, Kaewmad, P., Saenjundaeng, P., Jantarat, S. and Tanomtong, A. 2017. First Cytogenetic Study of the Whitecheek Monocle Bream, *Scolopsis vosmeri* (Perciformes, Nemipteridae) from Thailand. *Cytologia* 82(5): 481-484.
15. Supiwong, W., Getlakha, N., Chaiphech, S., Pinthong, K., **Phimphan, S.** and Tanomtong, A. 2018. Nucleolar Organizer Regions Polymorphism and Karyological Analysis of Black Lancer, *Bagrichthys majusculus* (Siluriformes, Bagridae) in Thailand. *Cytologia* 83(2): 193–199.

16. **Phimphan, S.**, Tanomtong, A., Saengphan, N. and Sangpakdee, W. 2018. The First Karyological Study in Freshwater Prawn, *Macrobrachium lanchesteri* (Decapoda, Palaemonidae) from Thailand. *Nucleus* 62: 77-82.
17. Saenjundaeng, P., Oliveira, A.E., Tanomtong, A., Supiwong, W., **Phimphan, S.**, Collares-Pereira, M.J., Sember, A., Yano, C.F., Hatanaka, T., ; Bertollo, L.A.C., Rab and Cioffi, M.B. 2018. The Asian paleotetraploid cyprinid fishes: Chromosomal investigations in two endangered species of the small Probarbini tribe. *PLOS ONE*. doi.org/10.1186/s13039-018-0399-8.
18. Supiwong, W., Pinthong, K., Seetapan, K., Sanjundaeng, P., Oliveira, E.A., Yano, C.F., Leih, T., **Phimphan, S.**, Tanomtong, A., Cioffi, M.B. 2019. Karyotype diversity and evolutionary trends in the Asian swamp eel *Monopterus albus* (Synbranchiformes, Synbranchidae). A biodiversity approach on 22 allopatric populations. *BMC Evolutionary Biology*. 19: 73. doi.org/10.1186/s12862-019-1393-4.
19. **Phimphan, S.** and Aiumsumang, S. 2019. Karyotype Analysis of Taolor's stream frog (*Limnonectes taylori*) (Amphibia, Anura) by conventional straining and Ag-NOR banding techniques from Thailand. *The Nucleus*. doi.org/10.1007/s13237-019-00291-2 0399-8.
20. **Phimphan, S.**, Aiumsumang, Tanomtong, A. and Jantararat, S. 2020. Karyomorphological delineation and linear differentiation of microsatellite patterns, and meiosis in giant Asian river frog (*Limnonectes blythii*) from Thailand. *Nucleus* https://doi.org/10.1007/s13237-020-00315-2.
21. **Phimphan, S.**, Chaiyasan, P., Suwannapoom, C., Reungsing, M., Juntaree, S., Tanomtong, A. and Supiwong, W. 2020 Comparative karyotype study of three Cyprinids (Cyprinidae, Cyprininae) in Thailand by classical cytogenetic and FISH techniques. (accepted)