**บทที่ 1**

**บทนำ**

**1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการทำวิจัย**

ปัจจุบันการใช้ทรัพยากรธรรมชาติอย่างไม่มีขอบเขตจำกัด ขาดการอนุรักษ์ การรักษา และการควบคุมอย่างเหมาะสม ทำให้ทรัพยากรธรรมชาติและมีจำนวนลดลงอย่างรวดเร็วประกอบกับประเทศไทยมีประชากรเพิ่มขึ้นมาก จำเป็นต้องอาศัยพื้นดินและแหล่งน้ำในการทำเกษตรกรรม พื้นที่ป่าถูกบุกรุกมากขึ้นและมีการปล่อยของเสียลงสู่แหล่งน้ำทำให้เกิดมลพิษขึ้นในสิ่งแวดล้อมส่งผลกระทบต่อประชากรพืชและสัตว์โดยเฉพาะกลุ่มสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก (amphibians) ได้แก่ กบ เขียด อึ่งอ่าง คางคก และปาด ซึ่งในช่วงวัยอ่อนต้องอาศัยแหล่งน้ำเป็นที่อยู่อาศัย สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกมีประโยชน์ต่อมนุษย์ทั้งทางตรงและทางอ้อม กบ เขียด อึ่งอ่าง เป็นแหล่งอาหารโปรตีน โดยเฉพาะกับประชากรที่อาศัยในชนบท คางคก และปาด ถึงใช้เป็นอาหารไม่ได้แต่ก็มีส่วนช่วยในการกำจัดแมลงศัตรูพืชไม่ให้แพร่ระบาดมากจนเกินไป ตัวอ่อนหรือลูกอ๊อดที่อาศัยอยู่ในน้ำก็เป็นตัวช่วยควบคุมปริมาณของสัตว์น้ำขนาดเล็กให้อยู่ในภาวะสมดุล และลูกอ๊อดเองก็เป็นอาหารเป็นอาหารของสัตว์น้ำชนิดอื่นๆ นอกจากนี้สภาพความสมบูรณ์ของตัวเต็มวัยยังเป็นดัชนีบ่งบอกถึงสภาวะมลพิษในอากาศและสิ่งแวดล้อมได้เป็นอย่างดี สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกเป็นประโยชน์ต่อการเกษตรกรรมแผนใหม่ที่ลดการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืช โดยปล่อยให้สัตว์ในธรรมชาติควบคุมแทน คางคกบ้านหนึ่งตัวสามารถกำจัดปลวกได้นับพันตัวในช่วงเวลาคืนเดียว กบอื่น ๆ ก็สามารถกำจัดแมลงทั้งที่อยู่ในน้ำและบนบกได้เป็นจำนวนมาก (ธัญญา จั่นอาจ,2546)

 สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกกลุ่มอึ่งอ่าง คางคกมีโอกาสเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ เนื่องจากการทำลายป่าต้นน้ำ ลำธาร ซึ่งเป็นแหล่งที่อยู่อาศัยตามธรรมชาติที่สำคัญอย่างยิ่ง คือ ขาดความรู่พื้นฐานที่จะนำไปใช้ในการจัดการอย่างเหมาะสมเพื่อประโยชน์ในแนวทางการอนุรักษ์ (จารุจินต์ นภึตะภัฎ, 2531) ปัจจุบันกรมป่าไม้ออกพระราชบัญญัติให้คางคก 3 ชนิด คือ จงโครง (*Phrynoidis aspera*) คางคกหัวราบ (*Bufo macrotis*) และคางคกแคระ (*Bufo parvas*) เป็นสัตว์ป่าคุ้มครองประเภทที่ 1 คือ เป็นสัตว์ป่าปกติไม่นิยมใช้บริโภคเป็นอาหารหรือไม่ล่าเป็นเกมกีฬา แต่เป็นสัตว์ที่ช่วยกำจัดศัตรูพืช ขจัดสิ่งปฏิกูลหรือเป็นสัตว์ป่าที่ควรสงวนไว้เพื่อมิให้จำนวนลดลง (สมชาย เลี้ยงพรพรรณ, 2540) กบหลายชนิดมีการแพร่กระจายทั่วทุกภาคของประเทศไทย มีประโยชน์หลายด้าน เช่น ประโยชน์ทางตรงเป็นอาหาร เนื้อเป็นที่นิยมบริโภคกันมากในปัจจุบัน เนื่องจากมีโปรตีนที่มีคุณค่าทางอาหารสูง และทางการค้าสามารถเพิ่มพูนรายได้ให้กับครอบครัวและประเทศชาติ หนังสามารถนำไปทำกระเป๋ารองเท้า เครื่องดนตรี และของชำรวยต่าง ๆ ส่วนหัว อวัยวะระบบทางเดินอาหารและกระดูกที่ตัดชำแหละแล้ว นำไปใช้เป็นอาหารเลี้ยงสัตว์ได้ ประโยชน์ทางอ้อม คือ ในระบบนิเวศวิทยา กบช่วยทำลายแมลง (ภาณุวัฒน์ นาคสิงห์, 2546)

ปัจจุบันได้มีการนำเอาความรู้ทางด้านพันธุศาสตร์เซลล์ (cytogenetics) ซึ่งเกี่ยวกับโครโมโซม (chromosome) และคาริโอไทป์ (karyotype) ด้านชีวเคมี (biochemistry) วิทยาภูมิคุ้มกัน (immunology) ตลอดจนชีววิทยาระดับโมเลกุล (molecular biology) เข้ามาช่วยในการจัดจำแนก ทำให้ข้อผิดพลาดด้านอนุกรมวิธาน ลดน้อยลง (ธวัช ดอนสกุล, 2546) กบบางชนิดซึ่งมีรูปร่างลักษณะลวดลาย สีสัน ภายนอกคล้ายคลึงกันมาก ซึ่งคาริโอไทป์สามารถที่จะช่วยบ่งบอกถึงความแตกต่างของกบแต่ละชนิดได้ ความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) เกิดจากความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) ของสิ่งมีชีวิต ส่งผลให้เกิดความแตกต่างในระดับรหัสพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต ทำให้สิ่งมีชีวิตชนิดเดียวหรือต่างชนิดกันที่มียีนที่แตกต่างกัน เกิดโปรตีน และกระบวนการชีวเคมีที่ต่างกันออกไป สิ่งมีชีวิตจึงมีความหลากหลายในทางพันธุกรรมที่ปรากฏออกมา ความหลากหลายทางพันธุกรรมปรากฏออกมาใน 2 ระดับ คือ ระดับโครโมโซม และระดับโมเลกุล ในระดับโครโมโซมสามารถตรวจสอบด้วยเทคนิคทางพันธุศาสตร์เซลล์ ส่วนในระดับโมเลกุลซึ่งได้แก่ ดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอ และโปรตีน สามารถตรวจสอบได้โดยเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุลเช่น polymerase chain reaction (PCR), electrophoresis, Southem blotting, Northem blotting, Westem blotting เป็นต้น (ประดิษฐ์ พงษ์ทองคำ, 2546; สมพร ประเสริฐส่งสกุล, 2547)

พันธุศาสตร์เซลล์เป็นการศึกษาโครโมโซมซึ่งเป็นหน่วยโครงสร้างที่สำคัญในการถ่ายทอดพันธุกรรมของเซลล์ การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโครโมโซมย่อมมีผลโดยตรงต่อการถ่ายทอดทางพันธุกรรม ทำให้เกิดการแสดงออกในสิ่งมีชีวิตในรูปแบบที่แตกต่างกัน มีผลต่อการเจริญพัฒนา และวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต (อมรา คัมภิรานนท์, 2546) เนื่องจากสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดจะมีจำนวน และรูปร่างของโครโมโซมที่จำเพาะ สิ่งมีชีวิตบางกลุ่มที่มีความใกล้ชิดกันทางสายวิวัฒนาการเมื่อตรวจสอบโครโมโซมพบว่ามีโครโมโซมหลายๆคู่ที่เหมือนกันในบางครั้งจำนวนโครโมโซมและลักษณะคาริโอไทป์ถูกนำมาใช้เป็นข้อมูลที่สำคัญประกอบการจัดจำแนกสัตว์ ที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology) คล้ายกันจนไม่สามารถแยกความแตกต่างได้ ( Giessmann, 2002) การศึกษาสิ่งมีชีวิตด้านพันธุศาสตร์เซลล์มีค่อยข้างน้อย ถึงแม้ว่าข้อมูลพื้นฐานที่ได้จากการศึกษาจะมีความสำคัญในการนำไปประยุกต์ใช้ด้านต่างๆ เช่น ด้านอนุกรมวิธาน การศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ การปรับปรุงพันธุ์ นอกจากนี้ยังใช้ประโยชน์ด้านการศึกษาโรคทางพันธุกรรมที่เกิดจากความผิดปกติของโครโมโซม

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม มีเนื้อที่ทั้งหมด 800 ไร่ เป็นพื้นป่าซึ่งมีความอุดมสมบูรณ์และความหลากหลายของชนิดพันธุ์ทั้งพืชและสัตว์ สัตว์ในกลุ่มสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกก็มีจำนวนที่หลากหลาย ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อระบบนิเวศ แต่ปัจจุบันพื้นที่ป่าส่วนใหญ่ภายในมหาวิทยาลัย ราชภัฏมหาสารคามกำลังถูกบุกรุก ทำให้สัตว์เหล่านั้นไม่มีที่อยู่อาศัยและทำให้ปริมาณลดน้อยลงในอัตราที่รวดเร็ว เสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ ปัจจุบันมีการศึกษาชีววิทยาของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในแง่ต่างๆ อย่างหลากหลาย เนื่องจากสัตว์กลุ่มนี้มีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมสามารถเป็นตัวบ่งชี้ทางชีววิทยา (biological indicator) เช่น ในแหล่งอุตสาหกรรมมักพบสัตว์จำพวกนี้น้อย เนื่องจากในบริเวณที่เป็นกรดจะทำให้ลูกอ๊อดที่เกิดมาเมื่อเจริญเป็นตัวเต็มวัยแล้วจะมีร่างกายพิการ เช่น แขนขากุด เป็นต้น การศึกษาในประเทศไทยส่วนใหญ่เป็นการศึกษาอนุกรมวิธานเพื่อจัดจำแนกโดยใช้ลักษณะลวดลายสีสัน และลักษณะทางสัณฐานวิทยาเป็นหลัก รวมทั้งในพื้นที่มหาวิทยาลัยขอนแก่น ซึ่งประชากรของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกแต่ละสกุล แต่ละชนิดย่อมมีจำนวนโครโมโซมและรูปร่างของโครโมโซมที่ต่างกัน ขณะเดียวกันประชากรในชนิดเดียวกันแต่อยู่ในแหล่งอาศัยต่างกันก็อาจมีรูปร่างของโครโมโซมที่ต่างกันได้ ทั้งนี้เนื่องจากอิทธิพลของความแตกต่างทางพันธุกรรม และสิ่งแวดล้อม การศึกษาในครั้งนี้จึงต้องจัดการศึกษาความเหมือนและแตกต่างของโครโมโซมดังกล่าว เพื่อใช้ในการจำแนกชนิด ขณะเดียวกันก็ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสิ่งแวดล้อมกับชนิดของโครโมโซม เพื่อเป็นข้อมูลในการประเมินหรือติดตามผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงของสิ่งมีชีวิต ซึ่งจะทำให้เกิดการบริหารจัดการความหลากหลายทางชีวภาพที่ยั่งยืนต่อไป

การศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกที่ผ่านมาในพื้นที่ของมหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคามยังไม่มีการศึกษาดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจเลือกศึกษาในพื้นที่นี้เพราะมีความสำคัญต่อการจัดการทรัพยากรสัตว์ การอนุรักษ์ การจัดการทรัพยากรท้องถิ่นอย่างยั่งยืน นอกจากนี้ข้อมูลทางด้านพันธุศาสตร์เซลล์ยังมีความสำคัญอย่างยิ่ง ที่ทำให้เราทราบถึงข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับโครโมโซม และนำไปใช้ร่วมกับการศึกษาด้านอนุกรมวิธาน และเชื่อมโยงความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการกับสัตว์กลุ่มอื่นๆ เป็นข้อมูลพื้นฐานทางด้านการปรังปรุงพันธุ์สัตว์เพื่อช่วยอนุรักษ์และขยายพันธุ์ รวมถึงการปรับปรุงพันธุ์เพื่อการค้าและเป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาด้านพิษวิทยาในอนาคต

**1.2 วัตถุประสงค์**

1. เพื่อศึกษาโครโมโซมของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกบางชนิดในพื้นที่มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม โดยใช้เทคนิคการย้อมสีโครโมโซมแบบธรรมดา (conventional staining) การย้อมแถบสีแบบนอร์ (NOR-banding) และการย้อมสีแบบจี (G-banding)

2. เพื่อศึกษาระยะต่างๆ ของการแบ่งเซลล์เพื่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (meiosis) ของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกบางชนิดในพื้นที่มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม

3. เพื่อศึกษาเปรียบเทียบจำนวน รูปร่าง และโครโมโซมเครื่องหมาย (chromosome marker) ของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกบางชนิดในพื้นที่มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม

4. เพื่อจัดคาริโอไทป์ และอิดิโอแกรม (idiopram) มาตรฐานของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกบางชนิดในพื้นที่มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม และนำมาเปรียบเทียบกันระหว่างสัตว์แต่ละชนิด

5. เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาพันธุศาสตร์ด้านอื่น ๆ

**1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ**

1. ทำให้ทราบจำนวน รูปร่าง และโครโมโซมเครื่องหมายของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกบางชนิดในพื้นที่มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม

2. ทำให้ทราบลักษณะคาริโอไทป์ของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกบางชนิดในพื้นที่มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม ข้อมูลนี้สามารถบ่งบอกความสัมพันธ์ในเชิงวิวัฒนาการ และใช้ประโยชน์สำหรับข้อมูลประกอบการจัดจำแนกสิ่งมีชีวิต (cytotaxonomy) ได้

3. ทำให้ทราบความเหมือนและแตกต่างระหว่างโครโมโซมของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกบางชนิดในพื้นที่มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม ข้อมูลนี้บ่งบอกความสัมพันธ์ระหว่างสัตว์ในกลุ่มนี้

4. เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาพันธุกรรมด้านอื่นๆ ของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก

**1.4 ขอบเขตและข้อจำกัดการวิจัย**

1. การศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกบางชนิดในพื้นที่มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม

2. การเตรียมโครโมโซมโดยใช้เทคนิคการเตรียมจากไขกระดูก

3. การย้อมสีโครโมโซมด้วยเทคนิคการย้อมสีแบบธรรมดา

4. ศึกษาจำนวน รูปร่างโครโมโซม ตรวจสอบหาเครื่องหมายของโครโมโซม จัดคาริโอไทป์ และทำอิดิโอแกรม โดยใช้เซลล์ระยะเมทาเฟสที่มีโครโมโซมกระจายตัวดี ชนิดละ 20 เซลล์

5. เปรียบเทียบคาริโอไทป์ และอิดิโอแกรมของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกบางชนิดในพื้นที่มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม

**1.5 สถานที่ทำการวิจัย**

1. ศูนย์วิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม

2. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

 3. สถานที่เก็บตัวอย่าง คือ ภายในพื้นที่มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม อำเภอเมือง จังหวัดมหาสารคาม