

บทนำ

แฉ้พันธุ์ *L.b.rubritaeniata* (Mertens) เป็นสัตว์เลื้อยคลานประเภทไต่  
คลาน (Lizard) และเป็นสัตว์ป่าที่ประชาชนคนไทยยอมรับเป็นอาหารและชอบกิน  
มาช้านาน แต่มีรายงานเกี่ยวกับชีววิทยาและนิเวศวิทยาของสัตว์ชนิดนี้น้อยมาก

โอบาส ซอนเชคต์ (2517) โรจน์ชัย ศัตรวาทา และ ไพรัช ทาบสิแพร  
(2525<sup>1</sup>, 2525<sup>2</sup>) Satirawaha (1984<sup>1</sup>, 1984<sup>2</sup>) Taylor (1969) รายงาน  
เกี่ยวกับนิเวศวิทยาโดยทั่วไป ลักษณะของรูอาศัย กิจกรรมการลอกกินประจำวัน  
ความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักตัวกับความยาวของร่างกาย และความสัมพันธ์ระหว่าง  
ความยาวต่างๆของร่างกาย การกระจายภายในประชากร การตรวจสอบชนิดของ  
อาหารที่แฉ้กิน โดยวิธีวิเคราะห์จากมูลของแฉ้ โรจน์ชัย ศัตรวาทา และ ชรินทร์  
คูคู่สมุทร (2528) รายงานเกี่ยวกับวิธีการจับแฉ้ อาณาเขตหากิน การเคลื่อนที่และ  
ความเร็วของแฉ้ การออกจากรูอาศัยและการกลับเข้าสู่รูอาศัย การเกี่ยววาราสี  
และการผสมพันธุ์ของแฉ้พันธุ์ *L.b.rubritaeniata* อย่างไรก็ตาม ยังไม่ปรากฏมี  
รายงานเกี่ยวกับการศึกษาเชิงชีววิทยาระบบสืบพันธุ์ และลักษณะทางพันธุกรรมของ  
สัตว์ชนิดนี้ ซึ่งเป็นความรู้พื้นฐานที่สำคัญและจำเป็นอย่างยิ่งต่อการศึกษาวิจัยขั้นสูง  
และเป็นแนวทางในการแสวงหาเส้นทางเพื่อการขยาย และปรับปรุงพันธุ์ของแฉ้ต่อไป  
ในอนาคต

จุดมุ่งหมายสำคัญของการศึกษาวิจัยครั้งนี้จึงเน้นหนักในเรื่องระบบการสืบพันธุ์  
และลักษณะโครงสร้างโดยทั่วไปของโครโมโซมของแฉ้พันธุ์ *L.b.rubritaeniata*  
ซึ่งเก็บรวบรวมได้จากจังหวัดต่างๆในภาคตะวันออกเฉียงเหนือเพื่อทราบลักษณะทั่วๆ  
ไปของระบบการสืบพันธุ์ และลักษณะพันธุกรรมจากจำนวน และโครงสร้างของ  
โครโมโซม

อุปกรณ์และวิธีการ

1. กายวิภาคระบบสืบพันธุ์

เก็บตัวอย่างแฉ้พันธุ์ *L.b.rubritaeniata* (Mertens) ระหว่างเดือน  
มีนาคม กรกฎาคม สิงหาคม กันยายน และ ตุลาคม 2530 ภายในเขตอำเภอเมือง  
ขอนแก่น จังหวัดขอนแก่นจำนวน 102 ตัว นำมาผ่าตัดศึกษาระบบสืบพันธุ์โดยการสัง

เกตุว่าแน่ที่ผ่าเป็นเพศผู้ หรือเพศเมีย ถ้าเป็นแน่เพศผู้ สังเกตอณฑะว่าอยู่ในวัยเจริญพันธุ์หรือไม่ โดยการสังเกตนขนาดของอณฑะ ถ้าเป็นเพศเมีย สังเกตว่ามีไข่ที่ผสมเชื้อแล้ว หรือยังไม่ได้ผสมเชื้อ ถ้าเป็นไข่ที่ผสมเชื้อแล้ว สังเกตว่ามีหนังหุ้มไข่ (envelope) แล้วหรือยังไม่มี และไข่เคลื่อนไปอยู่ในท่อนำไข่ (oviduct) พร้อมทั้งจะดูท่อนำไข่หรือรังไข่ พร้อมทั้งทำ paraffin section ของรังไข่ (ovary) และท่อนำไข่ (seminiferous tubule) ด้วย

## 2. โครโมโซม

การเตรียมสไลด์โครโมโซม (chromosome slide) เพื่อศึกษาจำนวนโครโมโซม (chromosome number) และ คาร์ิโอไทป์ (karyotype) โดยใช้เซลล์ *L. b. rotundivittatus* จากจังหวัดขอนแก่น อุดรธานี อุบลราชธานี และสกลนคร จำนวน 44, 18, 25 และ 12 ตัว ตามลำดับ มาเตรียมสไลด์โครโมโซมโดยวิธีดั้งเดิม และ วิธีอ้อม (Macgregor and Varley 1983) การเตรียมสไลด์โครโมโซมโดยวิธีดั้งเดิม เตรียมจากอวัยวะต่างๆของแน่ เช่น รังไข่ อณฑะ ตับ และ โปรงกระดูก (bone marrow) โดยการผ่าตัดเอาอวัยวะต่างๆของแน่เป็นเวลา 2 ชั่วโมงลงในสารละลายโคลชิซิน (colchicine) 0.5-1.0ml เข้าไปในช่องท้องของแน่ (เพื่อหยุดการแบ่งตัวของเซลล์) ผ่าตัดเปิดช่องท้องแน่ตัดเอาอวัยวะดังกล่าวข้างต้นออกมา (excise) แช่ขักรรโครโมโซมขนาดเล็กจนละเอียดโดยแช่อวัยวะนั้นอยู่ในสารละลายไฮโปโทนิค (0.075M KCl) 5ml ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18 นาที นำเซลล์ที่บดแล้วไปแช่ในสาร fixative (Methanol:acetic acid, 3:1) สองครั้ง แล้วนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นที่ 1000 rpm เป็นเวลา 5 นาที แยกส่วนละลาย (supernatant) ออก ถ้าเห็นการตามขึ้นตอนข้างต้นสองครั้ง นำเซลล์ที่ได้มาล้าง แล้วเติม fixative เพื่อจัดทำสไลด์โครโมโซม โดยหยดสารผสมที่เตรียมไว้สองหยด ลงไปบนแผ่นกระจกสไลด์ ปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิของห้อง แล้วย้อมสีด้วยสารละลาย Giemsa 2% ที่ละลายใน phosphate buffer pH 6.8 เป็นเวลา 5-10 นาที ล้างด้วยน้ำก็อกตากให้แห้งแล้ว mounted

การเตรียมสไลด์โครโมโซมโดยวิธีอ้อม เตรียมจากการเพาะเลี้ยงเม็ดเลือดแดง (Erythrocyte culture) และการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Tissue culture) ในการเพาะเลี้ยงเม็ดเลือดแดง ด้วยการใช้เลือดจากหัวใจของแน่ ผสมกับสาร Heparine 0.5-1.0 ml นำไปเพาะเลี้ยงในสาร Eagle's MEM 5ml ที่มี serum จากลูกวัวอยู่ 10% มี PHA-P 0.1% และ Concanabarine A 0.1% หลังจาก

เพาะเลี้ยงได้ 70 ชั่วโมง เติมสารละลายโคลจิมิด (Colchimid)  $10 \mu\text{g/ml}$  2-3 หยดหลังจากนั้น 2 ชั่วโมง เก็บเซลล์ที่เพาะเลี้ยงได้ แล้วทำ hypotonic KCl treatment, fixation และเตรียมสไลด์โครโมโซม ตามวิธีตรงดังกล่าวข้างต้น ในการเพาะเลี้ยงด้วยเนื้อเยื่อ ใช้เนื้อเยื่อโคนหางของแอมมาเพาะเลี้ยงโดยวิธีการเดียวกันกับการเพาะเลี้ยงเม็ดเลือดแดงโดยไม่ต้องมี mitogen เซลล์ที่เพาะเลี้ยงไว้ต้องทิ้ง subculture สัปดาห์ละ 2 ครั้ง และในการเก็บเซลล์ใช้สาร trypsin 0.25% เป็นตัวทำให้เซลล์หลุดจากผิวของขวดเพาะเลี้ยง นำไปละลายใน PBS pH 7.2 ล้างด้วยน้ำกลั่น ทำให้เจือจาง และย้ายไปเพาะเลี้ยงในขวดเพาะเลี้ยงขวดใหม่ การเพาะเลี้ยงใช้เวลาประมาณ 3 สัปดาห์ หรือจนได้เซลล์มากพอแล้วเติมโคลจิมิดให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น  $0.1 \mu\text{g/ml}$  เพื่อหยุด Mitosis และเก็บเก็บรวบรวมเซลล์ไปทำสไลด์โครโมโซม ตามขั้นตอนการเตรียมสไลด์ที่กล่าวได้ไว้แล้วข้างต้น

ผลการวิจัย

1. การวิจัยความหนาแน่นสืบพันธุ์

จากการผ่ารังเปิดดูของบลิบพันธุ์ของแอมมา *L.b.rubritaenista* แยกเป็นเพศเมีย 60 ตัว และเพศผู้ 52 ตัว ที่ลุ่มตัวอย่างระหว่างเดือน มีนาคม กรกฎาคม สิงหาคม กันยายน และ ตุลาคมพบว่า ในเดือนมีนาคมแอมมาเพศเมียมีไข่ที่ได้รับการผสมเชื้อแล้ว และยังมีเพศผู้มีอวัยวะขนาดใหญ่ค่อนข้างมากกว่า แอมมาที่ลุ่มตัวอย่างในเดือนอื่นๆ (ยกเว้นสิงหาคม) ไข่ของแอมมาที่ได้รับการผสมเชื้อ (fertilized) และมีหนังกุ้ม (envelopes) พร้อมทั้งจะวางไข่ได้แล้ว พบมากในเดือนมีนาคมและเดือนสิงหาคมตามลำดับ (ตารางที่ 3)

รังไข่ของแอมมา *L.b.rubritaenista* เป็นแบบ paired structure อยู่ในช่องท้อง ไข่เป็นแบบ solid ovary เหมือนกับ tetrapods ขึ้นสูง มี yolk มากเป็นแบบ polytelolecithal ไข่จากรังไข่จะเข้าสู่ท่อนำไข่ (oviduct) ซ้ายและขวา ซึ่งไปเปิดออกที่ uterine โดยไม่เชื่อมติดกันก่อน ไข่ที่ได้รับการผสมเชื้อแล้วและมีหนังกุ้มไข่นพร้อมที่จะดูทรงมีรูปร่างเป็นแบบ ellipsoid (รูปที่ 1) มีเส้นผ่าศูนย์กลางตามยาวโดยเฉลี่ยเป็น  $2.21 \pm 0.16$  ซม. (N = 7) และมีเส้นผ่าศูนย์กลางตามขวางโดยเฉลี่ยเป็น  $2.34 \pm 0.05$  ซม. (N = 7) ตามลำดับ แอมมาเพศเมียที่มีความยาวลำตัว (snout-vent length) ตั้งแต่ 8 ซม. ขึ้นไปที่เก็บรวบรวม

ได้มีทั้งที่มีไข่ที่ได้รับการผสมเชื้อแล้ว และยังไม่ได้รับการผสมเชื้อ (ตารางที่ 1) ไข่ที่ได้รับการผสมเชื้อแล้ว มีทั้งที่มีหนึ่งหุ้มไข่แล้วและยังไม่มีหนึ่งหุ้มไข่ (ตารางที่ 3) พบแยมี่ไข่ที่ได้รับการผสมเชื้อแล้ว ทั้งที่มีหนึ่งหุ้มไข่แล้ว (รูปที่ 2) และที่ยังไม่มีหนึ่งหุ้มไข่ (รูปที่ 3) มากที่สุดในเดือนมีนาคม และเดือนกรกฎาคม คิดเป็นร้อยละ 87 และ ร้อยละ 83 ตามลำดับ (ตารางที่ 1) ส่วนไข่ที่ได้รับการผสมเชื้อแล้วและมีหนึ่งหุ้มไข่ด้วยพบมากในแยมี่ที่เก็บรวบรวมได้ในเดือนสิงหาคมและเดือนมีนาคม คิดเป็นร้อยละ 80 และ ร้อยละ 75 ตามลำดับ (ตารางที่ 3) ส่วนแยมี่ที่เก็บรวบรวมได้ในเดือนอื่นจะมีไข่ที่ยังไม่ได้รับการผสมเชื้อ (รูปที่ 4) เป็นส่วนมาก

ตารางที่ 1 จำนวนแยมี่เพศเมียที่มีไข่ที่ได้รับการผสมเชื้อแล้ว และ ที่ยังไม่ได้รับการผสมเชื้อ จำแนกตามเดือนที่เก็บตัวอย่างในปี 2530

เดือน	มีไข่ที่ผสมเชื้อ	ร้อยละ	มีไข่ที่ยังไม่ผสมเชื้อ	ร้อยละ	รวม	ร้อยละ
มีนาคม	20	86.96	3	13.04	23	46.00
กรกฎาคม	5	83.33	1	16.67	6	12.00
สิงหาคม	5	50.00	5	50.00	10	20.00
กันยายน	2	33.33	4	66.67	6	12.00
ตุลาคม	0	00.00	5	100.00	5	10.00
รวม	32	64.00	18	36.00	50	

แยมี่เพศผู้จะมีอวัยวะ 1 คู่ ฝังอยู่ในช่องท้อง ในสัตว์เลื้อยคลานส่วนมากจะมีอวัยวะอยู่ในระดับเดียวกัน แต่ในแยมี่ชนิดนี้อวัยวะด้านขวาจะอยู่ค่อนข้างสูงกว่าอวัยวะด้านซ้ายเล็กน้อย ซึ่งจะเห็นได้ชัดเจนในแยมี่ผู้ในฤดูการผสมพันธุ์ (รูปที่ 5) อวัยวะของแยมี่มีรูปร่างเป็นแบบ oval ขนาดของอวัยวะจะเปลี่ยนแปลงไปตามฤดูกาล อวัยวะจะมีขนาดโตที่สุดในฤดูผสมพันธุ์

ตารางที่ 2 จำนวนแยะเพศผู้ที่มีอวัยวะขนาดใหญ่ และเล็ก จำแนกตามเดือนที่เก็บตัวอย่างในปี 2530

เดือน	มีอวัยวะขนาดใหญ่	ร้อยละ	มีอวัยวะขนาดเล็ก	ร้อยละ	รวม	ร้อยละ
มีนาคม	19	90.48	2	9.52	21	40.39
กรกฎาคม	3	50.00	3	50.00	6	11.54
สิงหาคม	4	44.44	5	55.55	9	17.31
กันยายน	1	12.50	7	87.50	8	15.38
ตุลาคม	0	00.00	8	100.00	8	15.38
รวม	27	51.92	25	48.08	52	

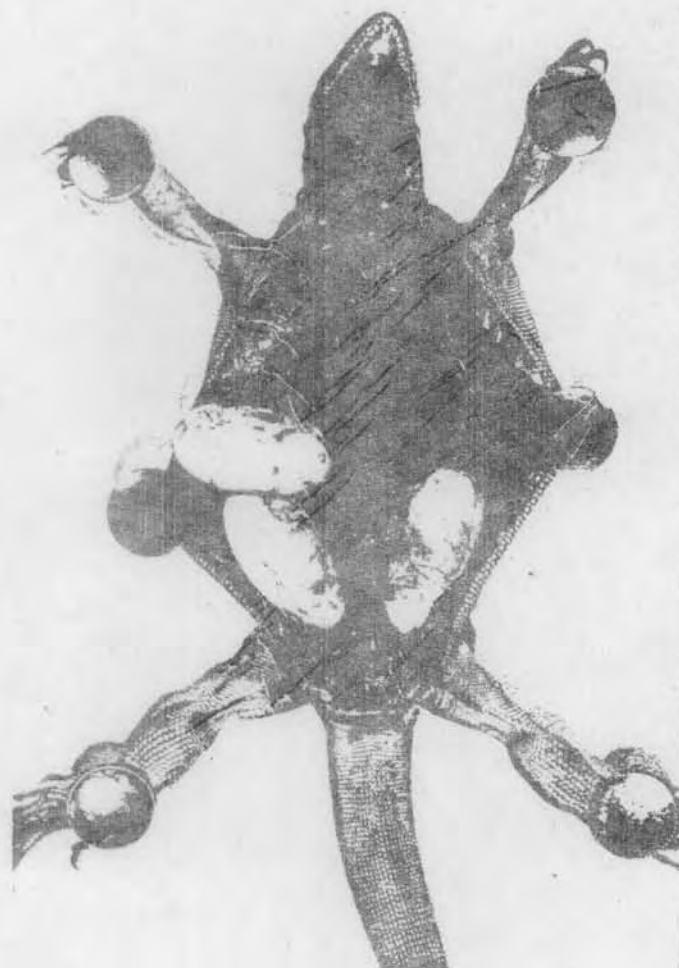
ตารางที่ 3 จำนวนไซที่ได้รับการผสมเชื้อและมีหนังกุ้มแล้ว และที่ยังไม่มีหนังกุ้ม จำแนกตามเดือนที่เก็บตัวอย่างในปี 2530

เดือน	ไซที่มีหนังกุ้มแล้ว	ร้อยละ	ไซที่ยังไม่มีหนังกุ้ม	ร้อยละ	รวม	ร้อยละ
มีนาคม	15	75.00	5	25.00	20	60.61
กรกฎาคม	2	33.33	4	66.67	6	18.18
สิงหาคม	4	80.00	1	20.00	5	15.15
กันยายน	0	0.00	2	100.00	2	6.06
รวม	21	68.64	12	36.36	32	

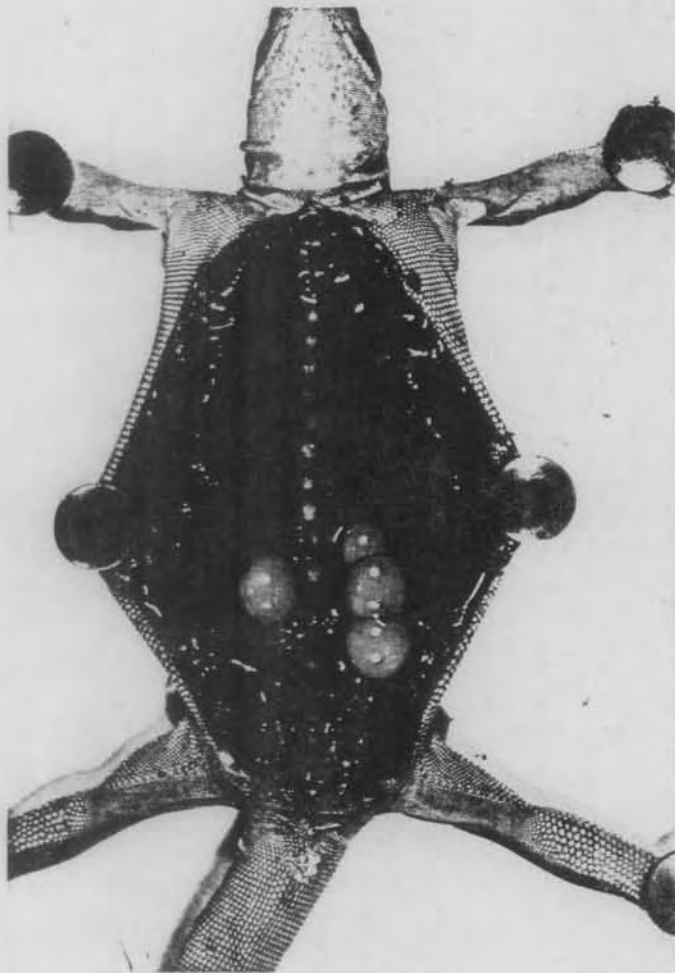
ไข่ของแอมฟิเบียที่ทำ ovarian section จากตัวอย่างแอมฟิเบียในเดือนมีนาคม พบว่ามีนิวเคลียสและนิวคลีโอล ภายใต้อันที่ได้รับการผสมเชื้อแล้ว มีขนาดของนิวเคลียสค่อนข้างโตเมื่อเปรียบเทียบกับขนาดของไข่ (รูปที่ 6) Section ของท่อนำไข่ (seminiferous tubule) ภายใต้อันที่แสดงให้เห็น spermatogonia จำนวนมากในชั้น basal layer การแบ่งตัวและการพัฒนาการของเซลล์ในชั้น inner layer และ พบว่ามี free spermatozoa ใน seminiferous lumen มากมาย (รูปที่ 7)



รูปที่ 1 แสดงไข่แอมฟิเบียที่ได้รับการผสมเชื้อและมีหนังหุ้มไข่แล้ว เคลื่อนที่ไปอยู่ในท่อนำไข่พร้อมที่จะถูกวาง (เก็บตัวอย่างในเดือนมีนาคม 2530)



รูปที่ 2 แสดงไข่แม่ *L. b. rubritaeniata* ทั้ง  
clutch ที่เจริญเต็มที่ภายในท้องน้ำไข  
พร้อมที่จะถูกวาง (เก็บตัวอย่างในเดือน  
มีนาคม 2530)



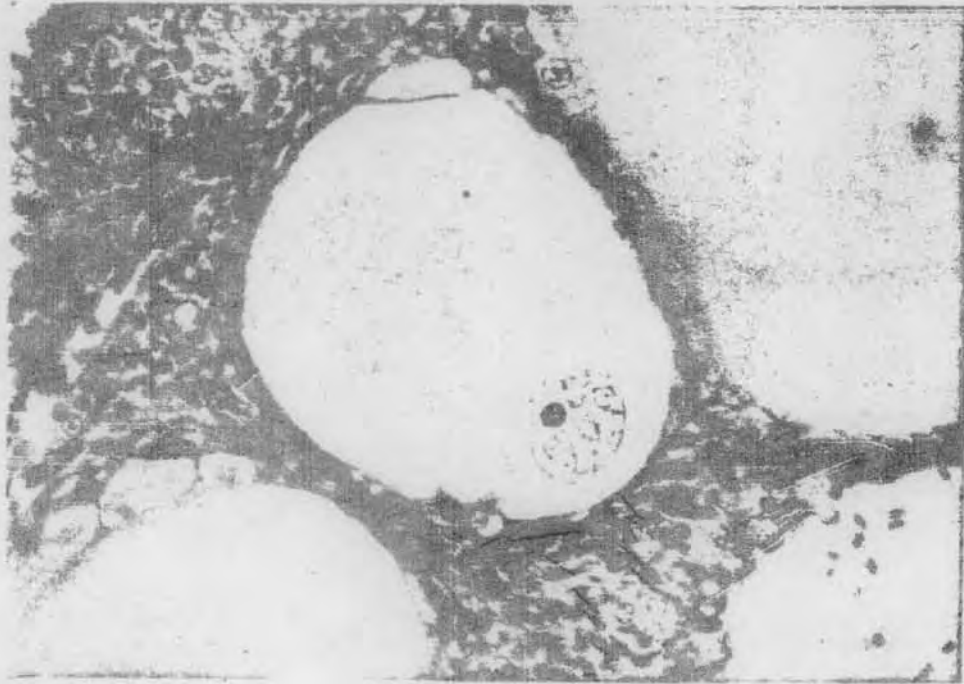
รูปที่ 3 แสดงไข่มเยื่อ *L. b. rubritaeniata* ที่ได้  
รับการผสมเชื้อแล้วแต่ยังไม่เจริญเต็มที่ซึ่ง  
ไม่มีหนังหุ้มไข่ (เก็บตัวอย่างในเดือนมิถุนา  
คม 2530)



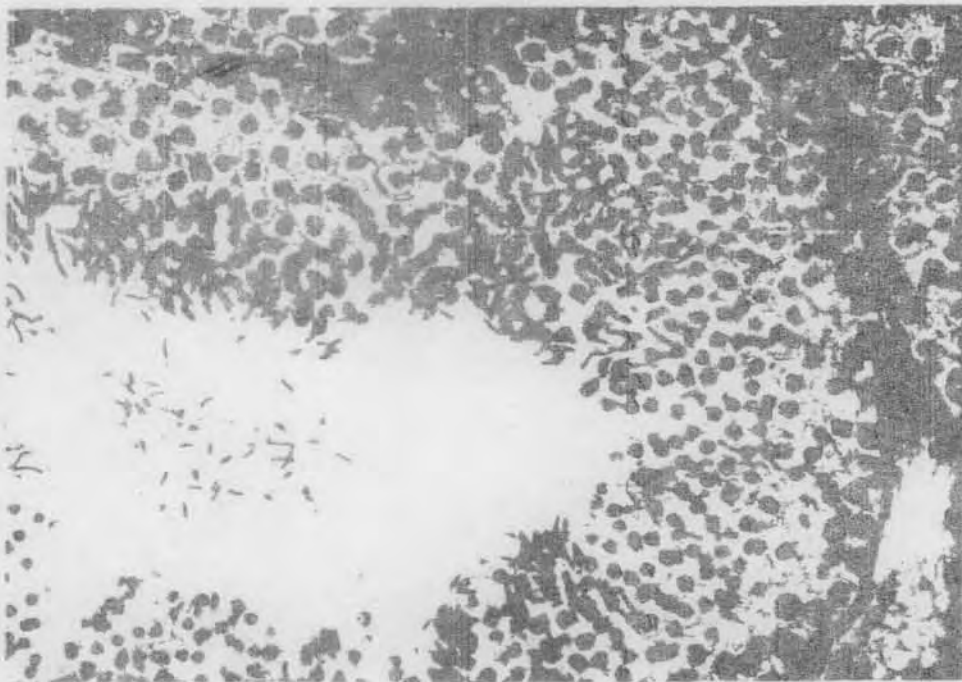
รูปที่ 4 แสดงไข่แม่ *L. b. rubritaeniata* ที่  
ยังไม่ได้รับการผสมเชื้ออยู่ภายในรังไข่  
(เก็บตัวอย่างในเดือนมีนาคม 2530)



รูปที่ 5 แสดงอณฑะแย้ *L.b.rubritaeniata* ที่  
มีขนาดโต 1 คู่ (เก็บตัวอย่างในเดือน  
มีนาคม 2530)



รูปที่ 6 แสดง Ovarian section ของแมลง *L.b. rubritaeniata*  
(เก็บตัวอย่างในเดือนมีนาคม 2530)



รูปที่ 7 แสดง Cross section ผ่าน seminiferous tubules  
ของแมลง *L.b. rubritaeniata* (เก็บตัวอย่างในเดือนมีนา  
คม 2530) แสดงระยะของการเกิด spermatogenesis

## 2. โครโมโซม

การตรวจสอบจำนวนโครโมโซม โดยการเตรียมโครโมโซมสไลด์โดยวิธีตรง จากโพรงกระดูกและจากตับไม้คอกจะได้ผลดีเท่าที่ควร ส่วนการเตรียมสไลด์โครโมโซมจากรังไข่และจากไข่ขาวได้ผลดีพอสมควร แต่ก็ได้รับผลดีเป็นที่น่าสนใจ เป็นการเตรียมโครโมโซมสไลด์โดยวิธี้อมจาก การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโคหนอง และการเพาะเลี้ยงเม็ดเลือดแดง

การตรวจนับจำนวนโครโมโซมของแฮฟมาว่า แฮ้งเจอร์ที่ใช้ศึกษาในครั้งนี้มีโครโมโซมจำนวน 26 อัน ประกอบด้วยโครโมโซมขนาดใหญ่ (macrochromosome) จำนวน 13 อัน และโครโมโซมขนาดเล็ก (microchromosome) จำนวน 24 อัน จากการจัดทำ karyotype พบว่าโครโมโซมของแฮ้งเจอร์นี้จัดได้เป็นสองชุด  $2n = 26$  ชุดที่ 1) จากการตรวจวัดโครโมโซมสามารถจัดแยกโครโมโซมขนาดใหญ่ของแฮ้งเจอร์นี้ออกได้เป็น 2 แบบ คือ เป็นแบบ Metacentric และ แบบ Submetacentric macrochromosomes โดยที่โครโมโซมขนาดใหญ่คู่ที่ 1 และ คู่ที่ 3 ถึงคู่ที่ 6 เป็นแบบ Metacentric macrochromosomes ส่วนคู่ที่ 2 เป็นแบบ Submetacentric macrochromosomes (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 การตรวจวัดพารามิเตอร์ของ chromosomes ของแฮ้งเจอร์ *L. b. rubritarseneta*

Chromosomes	Relative length ( $\mu$ และ $\pm$ SD)	Arm ratio	Morphological classification
1	0.241 $\pm$ 0.0114	0.454	M
2	0.215 $\pm$ 0.0131	0.405	SM
3	0.177 $\pm$ 0.0101	0.462	M
4	0.162 $\pm$ 0.0091	0.457	M
5	0.125 $\pm$ 0.0069	0.462	M
6	0.079 $\pm$ 0.0055	0.471	M



ก



1 2 3 4 5 6

ข



รูปที่ 8 แสดง Somatic diploid metaphase chromosomes  
 ของแฉ้ พันธุ์ *L.b.rubritseniata* (Mertens)

(ก) Metaphase plate และ (ข) Karyotypes.



๑๑ อัน ซึ่งจัดว่าเป็นลักษณะของสัตว์ที่มีการสืบพันธุ์แบบ ไม่ต้องได้รับการผสมเชื้อ (Parthenogenesis) ในกรณีของ Hall นี้ อาจเป็นไปได้ว่า แอ้ที่ Hall ศึกษา เป็นแอ้พันธุ์ *L. b. belliana* (Gray) ซึ่งมีกระจายอยู่ในแถบภาคใต้ของประเทศไทยและเป็นต้นละพันธุ์ (subspecies) กับแอ้พันธุ์ *L. b. rubritaenata* (Merlens) ที่ศึกษาในครั้งนี้อย่างไรก็ตาม แอ้ที่ Hall ใช้ศึกษา นั้นไม่ทราบแหล่งที่อยู่ที่แน่นอน เพียงเป็นการสันนิษฐานว่าเป็นแอ้ที่พ่อค้าสัตว์ป่าเก็บรวบรวมได้จากภาคเหนือของประเทศไทยมาเลเซีย หรือ เขตชายแดนติดต่อกับภาคใต้ของประเทศไทย จึงเป็นที่น่าสงสัยที่ควรจะมีการตรวจสอบโครโมโซมของแอ้พันธุ์ *L. b. belliana* (Gray) จากภาคใต้ของประเทศไทยต่อไป เพื่อที่สืบหรือคัดค้านข้อมูลของ Hall เพราะในปัจจุบันยังไม่มีข้อมูลสนับสนุน หรือคัดค้านรายงานของ Hall ดังกล่าวแต่อย่างใด และหากตรวจสอบว่าแอ้พันธุ์ *L. b. belliana* (Gray) มีลักษณะการผสมพันธุ์เป็นแบบที่ไม่ต้องได้รับการผสม: ที่จริงจะว่าเป็นประโยชน์ในการขยายพันธุ์แล้วอีกทางหนึ่ง