

การศึกษาแคโรไทป์ของกบห้วยขาป๋มเหนือ (*Limnonectes taylori*) ในจังหวัดเชียงใหม่ของประเทศไทย

Karyotypic Study of Taylor's Stream Frog (*Limnonectes taylori*) in Chiang Mai, Thailand

พรวดี ใจเที่ยงธรรม¹, อิศสระ ปะทะวัง^{2*}
Pronwadee Chaithiangtham¹, Isara Patawang^{2*}

Received: 3 July 2019 ; Revised: 29 October 2019 ; Accepted: 22 November 2019

บทคัดย่อ

รายงานนี้เป็นการศึกษาแคโรไทป์และอิดิโอแกรมของกบห้วยขาป๋มเหนือ (*Limnonectes taylori*) ในภาคเหนือของประเทศไทย เก็บตัวอย่างจากจังหวัดเชียงใหม่ เตรียมโครโมโซมโดยตรงจากไขกระดูก ย้อมสีโครโมโซมแบบธรรมดาด้วยสีจิมซ่า 20 เปอร์เซ็นต์ เพื่อศึกษาจำนวน รูปร่าง และขนาดของโครโมโซม ผลการศึกษาพบว่ากบห้วยขาป๋มเหนือมีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ ($2n$) เท่ากับ 22 แห่ง มีจำนวนโครโมโซมพื้นฐาน (NF) เท่ากับ 44 ทั้งในเพศผู้และเพศเมีย แคโรไทป์ประกอบด้วยโครโมโซมชนิดเมทาเซนทริกขนาดใหญ่ 8 แห่ง ซับเมทาเซนทริกขนาดใหญ่ 2 แห่ง เมทาเซนทริกขนาดกลาง 2 แห่ง ซับเมทาเซนทริกขนาดกลาง 2 แห่ง และเมทาเซนทริกขนาดเล็ก 8 แห่ง ไม่สามารถจำแนกความแตกต่างของโครโมโซมเพศได้ กบห้วยขาป๋มเหนือมีสูตรแคโรไทป์ คือ $2n (22) = L^m_8 + L^{sm}_2 + M^m_2 + M^{sm}_2 + S^m_8$

คำสำคัญ: โครโมโซม แคโรไทป์ กบห้วยขาป๋มเหนือ เชียงใหม่

Abstract

This study analyzed the karyotype and idiogram of Taylor's stream frog (*Limnonectes taylori*) collected from Chiang Mai Province in Northern Thailand. A mitotic chromosome preparation from bone marrow was obtained by direct method. Chromosomes were stained by conventional staining technique with 20% Giemsa solution in order to examine diploid number, shape and size. The result showed that the diploid number ($2n$) of *Limnonectes taylori* was 22, the fundamental number (NF) was 44 both male and female. The type of chromosomes were 8 large metacentrics, 2 large submetacentrics, 2 medium metacentrics, 2 medium submetacentrics and 8 small metacentrics. No cytologically distinguishable sex chromosome was observed. The karyotype formula of *L. taylori* is as follows: $2n (22) = L^m_8 + L^{sm}_2 + M^m_2 + M^{sm}_2 + S^m_8$.

Keywords: Chromosome, Karyotype, *Limnonectes taylori*, Chiang Mai

¹ นักศึกษามหาบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

² อาจารย์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ 50200

¹ Master's degree student, Graduate School, Chiang Mai University

² Instructor, Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University, Mueang District, Chiang Mai 50200, Thailand
Corresponding author: isara.p@cmu.ac.th

บทนำ

กบเป็นสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกที่มีความหลากหลายชนิดมากจัดอยู่ในอันดับกบ (order Anura) วงศ์ Dicoglossidae ทั่วโลกพบกบในวงศ์นี้จำนวน 14 สกุล และประมาณ 215 ชนิด แบ่งออกเป็น 2 วงศ์ย่อย คือ วงศ์ย่อย Dicoglossinae มี 12 สกุล 200 ชนิด และ วงศ์ย่อย Occidozyginae มี 2 สกุล 15 ชนิด กบห้วย ฆาปุมเหนือหรือกบห้วยฆาปุมเทเลอร์ (*Limnodynastes taylori*) อยู่ในวงศ์ย่อย Dicoglossinae สกุลกบล่าห้วย (genus *Limnodynastes*) ในสกุลนี้มีสมาชิกอยู่ 72 ชนิด¹ สำหรับในประเทศไทยพบ 16 ชนิด² กบห้วยฆาปุมเหนือจัดเป็นกบขนาดกลาง มีส่วนหัวค่อนข้างโต เพศผู้มีขนาดลำตัว 46-93 มิลลิเมตร เพศเมียมีขนาด 40-62 มิลลิเมตร เพศผู้มีส่วนหัวยาวกว่าเพศเมีย ลำตัวด้านหลังและขามีแถบสีดำหรือสีเข้ม มีตุ่มขนาดเล็กละเอียดด้านหลัง และมีพังผืดเว้าลึกแต่กางเต็มนิ้วตีน³ (Figure 1) มีเขตกระจายพันธุ์ทางภาคเหนือของประเทศไทยในพื้นที่จังหวัดเชียงราย เชียงใหม่ แม่ฮ่องสอน ลำปาง แพร่ น่าน และภาคตะวันตกของประเทศไทย ได้แก่ จังหวัดตาก²



Figure 1 General characteristics of the *Limnodynastes taylori*

รายงานการศึกษาโครโมโซมของกบในวงศ์ Dicoglossidae ก่อนหน้านี้พบว่ากบส่วนใหญ่ในวงศ์นี้มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ ($2n$) อยู่ระหว่าง 22-26 แท่ง⁴⁻¹⁴ ลักษณะแคโรไทป์ประกอบด้วยออโตโซมและโครโมโซมเพศ (พบในบางชนิด) โดยออโตโซมส่วนใหญ่จะเป็นโครโมโซมชนิดที่มี 2 แขน ส่วนโครโมโซมเพศนั้นพบว่ากบบางชนิดในวงศ์นี้มีระบบกำหนดเพศทั้งแบบ XX/XY⁴ และระบบกำหนดเพศ แบบ ZZ/ZW¹⁰ และในอดีตเคยมีรายงานการศึกษาโครโมโซมของกบในสกุล *Limnodynastes* พบว่ามีจำนวนโครโมโซมอยู่ระหว่าง 22-26 แท่ง ลักษณะโครโมโซมเป็นชนิดที่มี 2 แขน (bi-armed) แบบเมทาเซนทริก และ/หรือซับเมทาเซนทริก ยกเว้นในกบ *L. blythii* ที่มีเมทาเซนทริก ซับเมทาเซนทริก และซับเทโลเซนทริก และในกบ *L. modestus* ที่มีโครโมโซมแบบเมทาเซนทริก

และเทโลเซนทริก มีค่าจำนวนโครโมโซมพื้นฐานอยู่ระหว่าง 44-52 และไม่มีรายงานการตรวจพบโครโมโซมเพศในกบสกุล *Limnodynastes* ทุกชนิด⁵⁻⁹ (Table 1) สำหรับกบห้วยฆาปุมเหนือเคยมีรายงานการศึกษาโครโมโซมไว้โดย Phimphan and Aiumsumang เมื่อปี 2562 ซึ่งศึกษาจากประชากรกบห้วยฆาปุมเหนือในจังหวัดพิษณุโลก และจังหวัดพะเยา พบว่ามีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 22 แท่ง และไม่สามารถตรวจพบโครโมโซมเพศได้ การศึกษาโครโมโซมของกบจะเป็นข้อมูลพื้นฐานทางด้านพันธุกรรมของสัตว์กลุ่มนี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ร่วมกับการศึกษาอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องได้ เช่น ด้านอนุกรมวิธาน สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ การอนุรักษ์พันธุกรรม และการศึกษาพันธุศาสตร์ด้านอื่นๆ ต่อไปในอนาคต

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการศึกษา

เก็บตัวอย่างกบห้วยฆาปุมเหนือทั้งเพศผู้ ($n=4$, หมายเลข AC v21-v24) และเพศเมีย ($n=6$, หมายเลข AC v26-v31) รวมจำนวน 10 ตัว ในบริเวณแหล่งน้ำต่างๆ ในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ จำแนกและระบุชนิดโดยเทียบเคียงกับคำบรรยายลักษณะสัณฐานวิทยา จากเอกสารของ Matsui et al.³ เลี้ยงกบไว้ในห้องปฏิบัติการเป็นเวลา 1 วัน เพื่อเป็นการปรับสภาพสัตว์ ทำการเตรียมโครโมโซมโดยตรงจากไขกระดูกตัดแปลงจาก Patawang et al.⁴ โดยนำตัวอย่างกบมาฉีดด้วยสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรต่อน้ำหนักตัว 10 กรัม ทิ้งไว้เป็นเวลา 8 ชั่วโมง จากนั้นทำการสลบกบและผ่าตัดแยกเอาเซลล์ไขกระดูกจากขาหน้า ขาหลัง สับเนื้อเยื่อไขกระดูกให้ละเอียด ย้ายตะกอนเซลล์ใส่ในหลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 15 มิลลิลิตร แล้วนำมาผ่านขั้นตอนการทำให้เซลล์ฟองโตโดยเติมสารละลายไฮโปโทนิกซึ่งใช้โพแทสเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.075 โมลาร์ (M) เดิมให้ได้ปริมาตร 7 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที (rpm) เป็นเวลา 10 นาที เมื่อปั่นเสร็จแล้วดูดส่วนใสด้านบนทิ้งให้เหลือไว้เฉพาะตะกอนเซลล์ที่ก้นหลอด ทำการตรึงเซลล์ด้วยน้ำยาตรึงเซลล์สูตรคาร์นอยด์ (Carnoy's fixative) จำนวน 3 รอบ ย้อมสีโครโมโซมแบบธรรมดาด้วยสีจิมซาคาความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 นาที แล้วล้างสีออกด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำไปตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่ กำลังขยาย 1,000 เท่า เลือกถ่ายภาพเซลล์ที่มีการกระจายตัวดี นำภาพที่ได้มาจัดทำแคโรไทป์พร้อมทั้งวัดค่าความยาวของโครโมโซมจากเพศผู้จำนวน 10 เซลล์ และเพศเมียจำนวน 10 เซลล์ จัดทำอิดิโอแกรมมาตรฐาน จำแนกชนิด รูปร่าง และขนาดของโครโมโซม โดยตัดแปลงจากวิธีของอลองกลด และคณะ¹⁵

Table 1 Review of cytogenetic reports in the genus *Limnonectes*

Species	(2n)	Fundamental number (NF)	Karyotype	Reference
<i>Limnonectes taylori</i>	22	44	16m+6sm	Phimphan and Aiumsumang ⁵
<i>L. blythii</i>	24	48	10m+12sm+2st	ชวัช และอัจฉริยา ⁶
<i>L. modestus</i>	24	44	20m+4t	Nasaruddin et al. ⁷
<i>L. gruniens</i>	24	48	24m	Nasaruddin et al. ⁷
<i>L. kuhlii</i>	22	44	8m+14sm	Supaprom ⁸
<i>L. pileatus</i>	26	52	16m+10sm	Supaprom ⁸
	26	52	16m+10sm	Supaprom and Baimai ⁹

Remarks: m, metacentric; sm, submetacentric; st, subtelocentric; t, telocentric

ตัวอย่างซากกบหัวขาปุ่มเหนือที่เหลือจากการศึกษาโครโมโซมจะถูกแยกเอาเนื้อเยื่อตับเก็บรักษาสภาพในเอทิลแอลกอฮอล์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้สำหรับการศึกษาชีววิทยาโมเลกุลในอนาคต และส่วนของร่างกายที่เหลือ รวมทั้งตัวอย่างกบหัวขาปุ่มเหนือบางส่วนที่มีสภาพสมบูรณ์จะถูกรักษาสภาพไว้ในเอทิลแอลกอฮอล์และเก็บรักษาไว้ ณ แหล่งรวบรวมสัตว์ของห้องปฏิบัติการวิจัยพันธุศาสตร์ระดับเซลล์และเซลล์ชีวเคมีคัล (Animal Collection of Cytogenetics and Cytosystematics Research, AC) ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ผลการศึกษา

กบหัวขาปุ่มเหนือมีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์

เท่ากับ 22 แห่ง (Figure 2) และมีจำนวนโครโมโซมพื้นฐานเท่ากับ 44 ทั้งในเพศผู้และเพศเมีย แคริโอไทป์ประกอบด้วยโครโมโซมชนิดเมทาเซนทริกขนาดใหญ่ 8 แห่ง (คู่ที่ 1, 2, 4 และ 5) ซับเมทาเซนทริกขนาดใหญ่ 2 แห่ง (คู่ที่ 3) เมทาเซนทริกขนาดกลาง 2 แห่ง (คู่ที่ 6) ซับเมทาเซนทริกขนาดกลาง 2 แห่ง (คู่ที่ 7) และเมทาเซนทริกขนาดเล็ก 8 แห่ง (คู่ที่ 8-11) (Figure 3 and Table 2) แคริโอไทป์ของกบหัวขาปุ่มเหนือจากการย้อมสีโครโมโซมแบบธรรมดาไม่สามารถตรวจพบบริเวณที่เป็นรอยคอดที่สอง (2nd constriction) หรือโครโมโซมที่เป็นแซตเทลไลต์ (satellite chromosome) อันจะใช้เพื่อระบุเป็นโครโมโซมเครื่องหมายได้ นอกจากนี้แคริโอไทป์จากการย้อมสีแบบธรรมดาก็ยังไม่สามารถระบุโครโมโซมเพศของกบหัวขาปุ่มเหนือได้ สูตรแคริโอไทป์ของกบหัวขาปุ่มเหนือคือ $2n (22) = L_8^m + L_2^{sm} + M_2^m + M_2^{sm} + S_8^m$

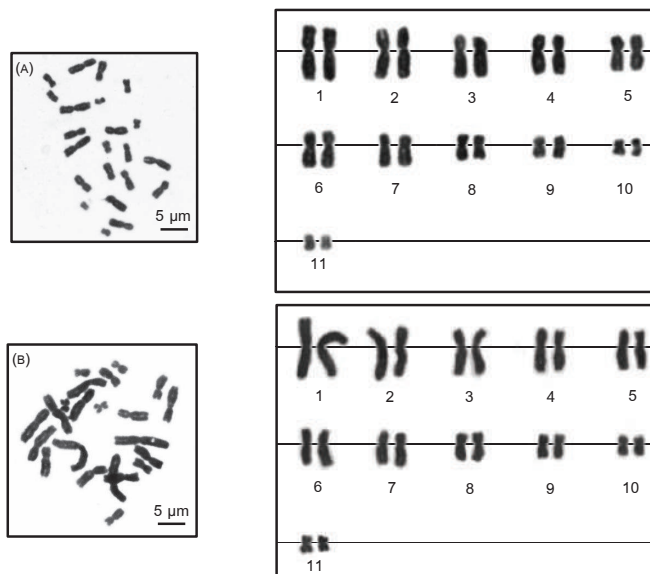


Figure 2 Metaphase chromosome plates and karyotypes of male (A) and female (B) *Limnonectes taylori*, 2n=22, by conventional staining technique

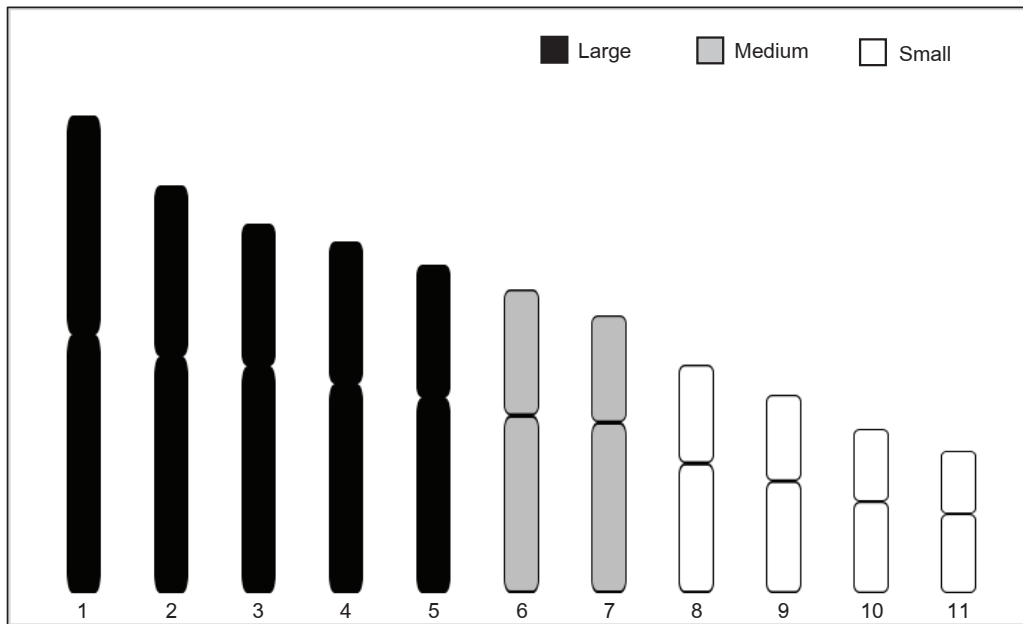


Figure 3 Idiogram of *Limnectes taylori*, $2n=22$, by conventional staining technique

Table 2 Mean length of the short arm chromosome (Ls), long arm chromosome (LI), total arm chromosome (LT), relative length (RL), centromeric index (CI) and standard deviation (SD) of RL, CI from metaphase chromosome in 20 cells of male and female *Limnectes taylori*, $2n=22$

Pair	Ls	LI	LT	RL \pm SD	CI \pm SD	Size	Type
1	3.174	3.736	6.910	0.147 \pm 0.005	0.541 \pm 0.016	Large	Metacentric
2	2.471	3.419	5.890	0.125 \pm 0.008	0.581 \pm 0.022	Large	Metacentric
3	2.054	3.284	5.338	0.114 \pm 0.004	0.615 \pm 0.017	Large	Submetacentric
4	2.055	3.022	5.077	0.108 \pm 0.004	0.595 \pm 0.021	Large	Metacentric
5	1.921	2.817	4.737	0.101 \pm 0.005	0.595 \pm 0.019	Large	Metacentric
6	1.814	2.568	4.381	0.093 \pm 0.004	0.587 \pm 0.029	Medium	Metacentric
7	1.561	2.463	4.024	0.086 \pm 0.006	0.613 \pm 0.020	Medium	Submetacentric
8	1.426	1.860	3.304	0.070 \pm 0.004	0.569 \pm 0.036	Small	Metacentric
9	1.248	1.614	2.864	0.061 \pm 0.005	0.565 \pm 0.035	Small	Metacentric
10	1.053	1.322	2.375	0.050 \pm 0.004	0.559 \pm 0.045	Small	Metacentric
11	0.914	1.143	2.057	0.044 \pm 0.004	0.557 \pm 0.054	Small	Metacentric

วิจารณ์และสรุปผล

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าลักษณะแคโรไทป์ของกบหัวยขาป้อมเหนือ มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 22 แท่ง สอดคล้องกับรายงานการศึกษาที่ผ่านมา⁵ จากความสอดคล้องของ 2 รายงานการศึกษานี้ สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานส่วนหนึ่งสำหรับประกอบการศึกษาด้านอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง ทั้งในด้านการระบุชนิด รวมถึงความสัมพันธ์ในระดับ

อนุกรมวิธานและวิวัฒนาการของกบหัวยขาป้อมเหนือที่อยู่ต่างกลุ่มประชากรกัน

โครโมโซมของกบหัวยขาป้อมเหนือมี 3 ขนาด คือ โครโมโซมขนาดใหญ่ 10 แท่ง โครโมโซมขนาดกลาง 4 แท่ง และโครโมโซมขนาดเล็ก 8 แท่ง โดยทั้งหมดเป็นโครโมโซมชนิดที่มี 2 แขน มีจำนวนโครโมโซมพื้นฐานเท่ากับ 44 ทั้งในเพศผู้และเพศเมีย ไม่พบความแตกต่างของรูปร่างโครโมโซม

เพศ เมื่อเปรียบเทียบกับแคริโอไทป์ของกบหัวขำปุมเหนือ กับกบชนิดอื่นในสกุลเดียวกัน พบว่ากบหัวขำปุมเหนือ มีจำนวนโครโมโซมน้อยที่สุดในสกุล *Limnonectes* ซึ่งเท่ากับ กบ *L. kuhlii*⁸ ขณะที่กบชนิดอื่น ได้แก่ *L. blythii*, *L. modestus* และ *L. gruniens* มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 24 แห่ง^{6,7} ซึ่งมากกว่ากบหัวขำปุมเหนือ 2 แห่ง และในกบชนิด *L. pileatus* มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 26 แห่ง^{8,9} มากกว่ากบหัวขำปุมเหนือ 4 แห่ง แม้จะมีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์แตกต่างกัน แต่เมื่อพิจารณาที่ลักษณะของแคริโอไทป์ พบว่าโครโมโซมของกบในสกุลนี้มี การอนุรักษ์สูง คือโครโมโซม เป็นชนิดที่มี 2 แขน และโดยส่วนใหญ่เป็นแบบเมทาเซน ทริก หรือซับเมทาเซนทริก และไม่สามารถจำแนกความแตกต่าง ของรูปร่างโครโมโซมเพศได้ในทุกชนิด

เมื่อเปรียบเทียบกับแคริโอไทป์ของกบหัวขำปุมเหนือ กับกบชนิดอื่นในวงศ์เดียวกัน (วงศ์ Dicoglossidae) และ วงศ์อื่นในอันดับเดียวกัน (อันดับ Anura) พบว่ากบหัวขำปุมเหนือมีจำนวนโครโมโซมน้อยที่สุด เมื่อพิจารณาที่ลักษณะของ แคริโอไทป์ พบว่ากบชนิดอื่นในวงศ์เดียวกันรวมถึงวงศ์อื่นๆ ในอันดับ Anura โดยส่วนใหญ่มีโครโมโซมเป็นแบบ 2 แขนทั้งหมด^{5-14, 16} ซึ่งจัดเป็นแคริโอไทป์แบบสมมาตร (symmetrical karyotype) คือ โครโมโซมเป็นแบบเมทาเซนทริก และ/หรือซับเมทา เซนทริก และไม่เป็นแบบไบโมดัล (non-bimodal karyotype) คือไม่มีโครโมโซมชุดใหญ่และ ชุดเล็กที่แตกต่างกันชัดเจน¹⁶ แสดงถึงลักษณะโครโมโซมที่มี การอนุรักษ์สูงในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในอันดับ Anura

การศึกษาในอนาคตควรมีการเพิ่มเทคนิคการย้อมสี โครโมโซมด้วยเทคนิคอื่นๆ เพิ่มเติม เพื่อ ตรวจสอบเอกลักษณ์ ของแคริโอไทป์ของกบหัวขำปุมเหนือและเอกลักษณ์เฉพาะ ของโครโมโซมเพศ เช่น เทคนิคการย้อมสีแบบซี (C-banding) เทคนิคการย้อมสีแบบจี (G-banding) หรือเทคนิคการศึกษา พันธุศาสตร์ระดับเซลล์เชิงโมเลกุล (molecular cytogenetics)

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากโครงการส่งเสริมการผลิตครูที่มีความสามารถพิเศษทางวิทยาศาสตร์และ คณิตศาสตร์ (สกว.) สถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยี (สสวท.) และได้รับอนุญาตการใช้สัตว์ทดลอง ตามมาตรฐานสถาบันพัฒนาการดำเนินการต่อสัตว์เพื่อ งานทางวิทยาศาสตร์ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (เลข ที่คำขอรับใบอนุญาตใช้สัตว์ U1-04491-2559)

เอกสารอ้างอิง

- David W. *Limnonectes*. Amphibiaweb. 2019. Available from: https://amphibiaweb.org/cgi-bin/amphib_query Accessed 19 February 2019.
- ประทีป ดั่งแคว ยอดชาย ช่วยเงิน อิงอร ไชยยศ ยุติ พลพิทักษ์ และศุภลักษณ์ ศิริ. บัญชีรายการ ทรัพยากรชีวภาพสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในประเทศไทย. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: สำนักงานพัฒนาเศรษฐกิจจากฐานชีวภาพ (องค์การมหาชน); 2559. หน้า 165-233.
- Matsui M, Panha S, Khonsue W, Kuraishi N. Two new species of the "kuhlii" complex of the genus *Limnonectes* from Thailand (Anura: Dicoglossidae). *Zootaxa* 2010; 2615: 1-22.
- Patawang I, Tanomtong A, Phimphan S, Chuaynkern Y, Chuaynkern C, Phaengphairee PH, Khruenat W, Nithikulworawong N. The identification of sex-chromosomes and karyological analysis of rice frog, *Fejervarya limnocharis* (Anura, Ranidae) from Northeast Thailand. *Cytologia* 2014;79(2): 141-150.
- Phimphan S, Aiumsumang S. Chromosomal characteristics of Taylor's stream frog (*Limnonectes taylori*) (Amphibia, Anura) from Thailand. *Nucleus* 2019;doi:10.1007/s1 3237-019-00291-2.
- ชัช ดอนสกุล และอัจฉริยา รังษิรุจิ. แคริโอไทป์ของ เซลล์ตับในกบภูเขา เขียดบัว เขียดกาญจนบุรี เขียด น้ำนอง และอึ่งเพ้า. ใน: เอกสารการประชุมทางวิชาการ ของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 43 สาขา สัตวแพทยศาสตร์ สาขาวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ; 2548. หน้า 544-551.
- Nasaruddin, Suriana, Adi DA, Salamansyah. The karyotype of seven species of amphibians (Anuran order) from South-east Sulawesi. *Veteriner* 2009;10(2): 77-86.
- Supaprom T. Cytogenetics of amphibians in Thailand. Ph.D. dissertation, Mahidol university; 2003.
- Supaprom T, Baimai V. Karyotypes of ten species of ranid frogs (Anura: Ranidae) from Thailand. *Amphibia Reptilia* 2004; 25(1): 104-111.
- Saba N, Tripathi N. Preliminary cytogenetic study and report of ZZ/ZW sex chromosomes in the bullfrog, *Hoplobatrachus tigerinus* (Anura, Amphibia) from high altitude area of Jammu and Kashmir, India. *Nucleus* 2014; 57(1): 55-59.

11. Shanthi PA, Singh P, Barh D, Venkatachalaiah G. Comparative karyology based systematics of *Euphlyctis hexadactylus* and *E. cyanophlyctis*. International Journal of Integrative Biology 2009; 9(1): 6-9.
12. Kour P, Tripath NK, Poonam I, Jangral S. Karyological analysis of Indian skittering frog, *Euphlyctis cyanophlyctis* from Jammu and Kashmir (India). International Journal of Recent Scientific Research 2015; 6(2): 2719-2724.
13. Joshy SH, Kuramoto M. Comparative chromosome studies of five species of the genus *Fejervarya* (Anura: Ranidae) from South India. Cytologia 2008; 73(3): 243-250.
14. Suttichaiya A, Khammanichanh A, Patawang I, Sriuttha M, Tanamtong A, Neeratanaphan L. Chromosome aberrations of East asian bullfrog (*Hoplobatrachus rugulosus*) around a gold mine area with arsenic contamination. EnvironmentAsia 2016; 9(1): 60-69.
15. อลงกลด แทนอมทอง กฤษณ์ ปิ่นทอง และ อีสสระปะทะวัง. พันธุศาสตร์ระดับเซลล์. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2562. หน้า 492-505.
16. ประวีร์ณ์ สุพรรณอ่วม. วิวัฒนาการของโครโมโซมของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในประเทศไทย. วารสารวิทยาศาสตร์ มข. 2561; 46(4): 654-663.