

พันธุศาสตร์เซลล์ของลิงแสม (*Macaca fascicularis*) ในประเทศไทย ด้วยวิธีการย้อมแถบสีแบบธรรมดา

อลงกลด แทนอมทอง¹ สัมภาษณ์ คุณสุข² วิวรรณ แก่นสา³

มหาวิทยาลัยขอนแก่น อำเภอเมือง ขอนแก่น 40002

และ เรื่องวิทย์ บรรจงรัตน์⁴

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พญาไท กรุงเทพฯ 10300

รับเมื่อ 8 มีนาคม 2548 ตอรับเมื่อ 15 กรกฎาคม 2548

บทคัดย่อ

การศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ของลิงแสมในประเทศไทย ใช้ตัวอย่างสัตว์เพศผู้ 2 ตัว และเพศเมีย 2 ตัว จากสวนสัตว์นครราชสีมา เตรียมโครโมโซมด้วยการเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาว เก็บเกี่ยวเซลล์ด้วยเทคนิคโคลชิซิน-ไฮโปโทนิก-ฟิกเซชัน-แอร์ตรายิ่ง ทำการย้อมสีแบบธรรมดาด้วยสีจิมซ่า ผลการศึกษาพบว่าลิงแสมมีจำนวนโครโมโซม 2n (diploid) เท่ากับ 42 แท่ง มีจำนวนโครโมโซมพื้นฐาน (NF) เท่ากับ 83 ในเพศผู้ และ 84 ในเพศเมีย โครโมโซมร่างกายประกอบด้วยโครโมโซมชนิดเมทาเซนทริกขนาดใหญ่ 6 แท่ง ซับเมทาเซนทริกขนาดใหญ่ 8 แท่ง เมทาเซนทริก ขนาดกลาง 4 แท่ง ซับเมทาเซนทริกขนาดกลาง 12 แท่ง เมทาเซนทริกขนาดเล็ก 8 แท่ง และ ซับเมทาเซนทริกขนาดเล็ก 2 แท่ง โครโมโซมคู่ที่ 13 จัดเป็น satellite chromosome โครโมโซมเอ็กซ์เป็นชนิดเมทาเซนทริกขนาดกลาง และโครโมโซมวายเป็นชนิดเทโลเซนทริกขนาดเล็ก มีสูตรคาริโอไทป์ ดังนี้

$$\text{ลิงแสมเพศเมีย } 2n (42) = L_6^m + L_8^{sm} + M_6^m + M_{12}^{sm} + S_8^m + S_2^{sm}$$

$$\text{ลิงแสมเพศผู้ } 2n (42) = L_6^m + L_8^{sm} + M_5^m + M_{12}^{sm} + S_8^m + S_2^{sm} + S_1^t$$

คำสำคัญ : พันธุศาสตร์เซลล์ / โครโมโซม / คาริโอไทป์ / ลิงแสม

1 ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

2 อาจารย์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

3 นักศึกษาปริญญาโท ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

4 ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์

Cytogenetics of Long-tailed Macaque, *Macaca fascicularis* (Primate, Cercopithecidae) in Thailand by Using Conventional Staining

Alongkoad Tanomtong ¹, Sumpars Khunsook ², Wiwat Kaensa ³,

Khon Kaen University, Maung, Khon Kaen 40002

and Rongvit Bunjongrat ⁴

Chulalongkorn University, Phayathai, Bangkok 10300

Received 8 March 2005 ; accepted 15 July 2005

Abstract

This paper presents a research study of Cytogenetics of long-tailed macaque (*Macaca fascicularis*) in Thailand. Blood samples of 2 male and 2 female long-tailed macaques from Nakhonratchasima Zoo were collected and then subjected to cytogenetics studies by lymphocyte culture of whole blood. The cultured cells were examined by the Colchicine-hypotonic-fixation-air-drying technique followed by conventional staining with Giemsa. The results showed that the number of diploid chromosome of long-tailed macaque was determined to be $2n=42$, the fundamental numbers (NF) were 83 chromosomes in males and 84 in females. The type of autosome was 6 large metacentric, 8 large submetacentric, 4 medium metacentric, 12 medium submetacentric, 8 small metacentric and 2 small submetacentric chromosomes. In addition, a pair of chromosome No. 13 were clearly observable satellite chromosome. X-chromosome was the medium metacentric chromosome and Y-chromosome is a small telocentric chromosome. The karyotype formula for the female and male long-tailed macaque is as follows :

$$\text{Female long-tailed macaque } 2n (42) = L_6^m + L_8^{sm} + M_6^m + M_{12}^{sm} + S_8^m + S_2^{sm}$$

$$\text{Male long-tailed macaque } 2n (42) = L_6^m + L_8^{sm} + M_5^m + M_{12}^{sm} + S_8^m + S_2^{sm} + S_1^t$$

Keywords : Cytogenetics / Chromosome / Karyotype / Long-tailed Macaque (*Macaca fascicularis*)

¹ Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Science.

² Lecturer, Department of Biology, Faculty of Science.

³ Graduate Student, Department of Biology, Faculty of Science.

⁴ Assistant Professor, Department of Botany, Faculty of Science.

1. บทนำ

สัตว์ในอันดับ (order) โพรเมทา (primate) มีทั้งหมด 13 วงศ์ (family) 60 สกุล (genus) และ 232 ชนิด (species) [1] ในประเทศไทยพบสัตว์ในอันดับโพรเมทา 3 วงศ์ 5 สกุล และ 13 ชนิด เป็นลิงที่อยู่ในสกุล *Macaca* 5 ชนิด ได้แก่ ลิงเสน (stump-tailed macaque, *Macaca arctoides* Geoffroy, 1831) ลิงอ้ายเงี้ยวหรือวอกภูเขา (assam macaque, *Macaca assamensis* McClelland, 1839) ลิงแสมหรือลิงหางยาว (crab-eating or long-tailed macaque, *Macaca fascicularis* Raffles, 1821) ลิงวอก (rhesus monkey, *Macaca mulatta* Zimmermann, 1780) และลิงกัง (pig-tailed macaque, *Macaca nemestrina* Linnaeus, 1766) [2-4]

ลิงทั้ง 5 ชนิด จัดเป็นสัตว์ป่าคุ้มครองประเภทที่ 1 ของไทย ตามพระราชบัญญัติสงวนและคุ้มครองสัตว์ป่า พ.ศ. 2535 และสมัชชาการอนุรักษ์สิ่งแวดล้อมโลก (The world conservation congress, IUCN) จัดให้ลิงสกุล *Macaca* บางชนิด เช่น ลิงเสน อยู่ในสถานภาพสัตว์ที่มีแนวโน้มที่จะสูญพันธุ์ในอนาคตอันใกล้ นอกจากนี้ยังถูกจัดให้อยู่ในบัญชีหมายเลขสอง (appendix II) ของภาคีอนุสัญญาว่าด้วยการค้าระหว่างประเทศซึ่งชนิดของสัตว์ป่าและพืชป่าใกล้สูญพันธุ์ ซึ่งหมายถึงสัตว์ป่าและพืชป่าที่ยังไม่ถึงกับใกล้สูญพันธุ์จึงยังอนุญาตให้ค้าได้ แต่ต้องควบคุมการค้าขายเพื่อหลีกเลี่ยงการใช้ประโยชน์ที่ไม่สอดคล้องกับความอยู่รอดของชนิดพันธุ์นั้นๆ [5]

ลิงแสมสามารถที่จะจัดอนุกรมวิธานอยู่ในอาณาจักร (kingdom) สัตว์ (animalia) ไฟลัม (phylum) สัตว์มีกระดูกสันหลัง (chordata) ชั้น (class) สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (mammal) อันดับสัตว์จำพวกลิง (primate) วงศ์ Cercopithecidae วงศ์ย่อย Cercopithecinae สกุล *Macaca* ชนิด *Macaca fascicularis* [3] [4] ลักษณะที่สำคัญของลิงแสม ได้แก่ มีหางยาวกว่าความยาวหัวและลำตัวรวมกัน ลำตัวสีเทาถึงน้ำตาลแดง ขนบนกระหม่อมชี้ไปทางด้านหลังจนมักเห็นเป็นกระจุกแหลม อาศัยบนต้นไม้ ว่ายน้ำเก่ง อยู่เป็นฝูง 10-45 ตัว บางครั้งอาจมากถึง 200 ตัว พบได้ทั่วไปในประเทศไทยตั้งแต่ภาคเหนือและภาคอีสานตอนล่าง (จังหวัดนครสวรรค์และมหาสารคาม) จนถึงภาคใต้สุด (จังหวัดยะลา) ลิงแสมเป็นลิงที่สามารถปรับตัวได้ดี ดังนั้นจึงสามารถพบได้ในแหล่งอาศัยหลากหลายชนิด เช่น ป่าชายเลน ป่าดิบที่ 1 และ 2 หมู่บ้าน สวนสาธารณะ วัด ในป่าชายเลนริมทะเลทางภาคใต้ ภาคตะวันออก และป่าริมน้ำภาคตะวันตก [3-6] สำหรับการแพร่กระจายตัวของลิงแสมพบได้ในประเทศไทย พม่า มาเลเซีย เกาะสุมาตรา เกาะชวา เกาะบอร์เนียว และหมู่เกาะของประเทศฟิลิปปินส์ [3] [4]

ลิงในประเทศไทยถูกจัดอยู่ในสกุล *Macaca* ทั้ง 5 ชนิด จากการตรวจสอบเอกสารการศึกษา พบว่ามีรายงานการศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ของลิงสกุล *Macaca* ดังรายงานการศึกษาของ Chiarelli [7]; Hsu และ Benirschke [8]; Napier และ Napier [9]; Caballin และคณะ [10]; Small และ Stanyon [11]; Brown และคณะ [12]; Hirai และคณะ [13] สำหรับในประเทศไทยยังไม่มีรายงานการศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ของลิงแสมมาก่อน จึงควรที่จะต้องมีการศึกษาเพื่อทำการเปรียบเทียบกับรายงานการศึกษาที่มีมาก่อนหน้านี้ การศึกษาในครั้งนี้ใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาว (lymphocyte culture) และการย้อมสีโครโมโซมแบบธรรมดา (conventional staining) ผลจากการศึกษาจะทำให้ได้ข้อมูลพื้นฐานทางด้านพันธุศาสตร์เซลล์ของลิงแสมในประเทศไทย เพื่อที่จะนำไปใช้ในการเปรียบเทียบความสัมพันธ์ทางโครโมโซมของกลุ่มสัตว์จำพวกลิง (primate) ในประเทศไทยต่อไปในอนาคต

2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

ตัวอย่างเลือดที่ใช้ในการศึกษาได้จากลิงแสมเพศผู้ 2 ตัว และเพศเมีย 2 ตัว ที่เลี้ยงอยู่ในสวนสัตว์นครราชสีมา จังหวัดนครราชสีมา เป็นลิงที่ได้รับบริจาคมาจากจังหวัดมหาสารคาม มีอายุระหว่าง 2-4 ปี ทำการเจาะเก็บเลือดโดยใช้เทคนิคปราศจากเชื้อ จากเส้นเลือดดำบริเวณลำคอ เก็บในหลอดสุญญากาศขนาด 10 มล. ที่บรรจุสารเฮปาริน (heparin) เพื่อป้องกันการแข็งตัวของเลือด แล้วทำการแช่ในกระติกน้ำแข็งตลอดการเดินทางจนถึงห้องปฏิบัติการ การดำเนินการทดลองแบ่งออกได้เป็น 2 ส่วน ดังนี้

การเตรียมเซลล์

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด T-lymphocyte ที่ดัดแปลงมาจากวิธีการในมนุษย์ของ อมรา คัมภีรานนท์ [14] ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวจากเลือดปริมาณน้อย

การเพาะเลี้ยงเซลล์

เตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด RPMI 1640 ที่มีสารกระตุ้นการแบ่งเซลล์ คือ Phytohemagglutinin (PHA) ความเข้มข้นร้อยละ 2 นำอาหารแบ่งลงในขวดอาหารเลี้ยงเชื้อขวดละ 5 มล. จากนั้นนำเลือดลิงแสมจำนวน 0.5 มล. หยดลงในขวดเลี้ยงเลือด เขย่าให้สารละลายและเลือดเข้ากัน ปิดฝาขวดทลวมๆ แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 และทำการเขย่าเลือดทุกเช้าเย็น เมื่อครบเวลาเก็บเกี่ยวเซลล์ คือ ชั่วโมงที่ 72 ทำการหยุดสารละลายโคลชิซิน เขย่าเบาๆ ให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มต่ออีก 30 นาที

การเก็บเกี่ยวเซลล์

ทำการย้ายสารละลายเลือดจากขวดเพาะเลี้ยงเลือดลงในหลอดเซนตริฟิวส์ขนาด 12 มล. นำมาปั่นเหวี่ยงที่ 1,200 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที เซลล์เม็ดเลือดขาวจะตกตะกอนที่ก้นหลอด ทำการดูดส่วนใสด้านบนทิ้ง จากนั้นทำให้เซลล์ฟองตัว เพื่อที่โครโมโซมจะมีการกระจายตัวดี โดยทำการหยุด 0.075 M KCl 10 มล. ลงในตะกอนเซลล์ ทำการผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า แล้วบ่มต่อไปอีก 30 นาที เมื่อครบกำหนดทำการแยกเอา KCl ออก โดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1,200 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วทำการดูดส่วนใสทิ้ง ทำการตรึงเซลล์โดยการเติมน้ำยาตรึงเซลล์ ที่มีอัตราส่วนของ methanol : glacial acetic acid อัตราส่วน 3 : 1 ใช้หลอดหยดหยดน้ำยาตรึงเซลล์ที่ละลายพร้อมทั้งผสมเซลล์ให้เข้ากับสารละลายด้วยเครื่องเขย่า เติมนจนได้ปริมาตรประมาณ 8 มล. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1,200 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ทำการดูดส่วนด้านบนทิ้ง

ทำการเติมน้ำยาตรึงเซลล์ซ้ำอีก โดยค่อยๆ ลดปริมาตรน้ำยาตรึงเซลล์ที่ใช้แต่ละครั้งลง จำนวนครั้งขึ้นอยู่กับความใสของสารละลาย ทำซ้ำจนได้สารละลายที่ใสและมีตะกอนเซลล์ที่ก้นหลอด ทำการดูดสารละลายด้านบนทิ้งจนเกือบหมด แล้วทำการเติมน้ำยาตรึงเซลล์ลงไปอีก 1 มล. ทำการผสมให้เข้ากัน จากนั้นใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายตะกอนเซลล์เม็ดเลือดขาวปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงบนสไลด์ที่สะอาดและเย็นจัด ทำการฟุ้งสไลด์ให้แห้ง ย้อมสีโครโมโซมแบบดั้งเดิมด้วยสีจิมซาล์วร้อยละ 10 เป็นเวลา 15 นาที ทำการล้างสีออกด้วยน้ำประปา ฟุ้งสไลด์ให้แห้ง แล้วนำไปศึกษาต่อด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

การตรวจสอบโครโมโซม

ทำการคัดเลือกเซลล์ที่มีการแบ่งเซลล์ระยะเมทาเฟส (metaphase) ที่มีโครโมโซมไม่สั้นหรือยาวเกินไป และมีการกระจายตัวของโครโมโซมไม่ซ้อนทับกัน ถ่ายภาพโครโมโซมลงสแลมเพลตและเพตเมียเพตละ 20 เซลล์ โดยลึงแต่ละตัวทำการถ่ายภาพ 10 เซลล์/ตัว ศึกษาโครโมโซมตามแบบของกันยาร์ตน์ ไชยสุต [15] โดยการหาความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาว (length long, LI) ข้างสั้น (length short, Ls) ทำการคำนวณหาค่าความยาวของโครโมโซมแต่ละแท่ง (length total, LT) ค่า relative length (RL) และค่า centromeric index (CI) แล้วนำค่า LI, Ls, LT, RL และ CI ของโครโมโซมทั้ง 20 เซลล์ มาหาค่าเฉลี่ย (mean) นำค่า RL และ CI มาหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) นำค่า CI มากำหนดชนิดของโครโมโซม และนำค่า LT มากำหนดขนาดของโครโมโซม

ค่าความยาวของโครโมโซมแต่ละแท่ง (LT) = ความยาวแขนข้างยาว (LI) + แขนข้างสั้น (Ls)

ค่า relative length (RL) = LT/ความยาวทั้งหมดของโครโมโซมทุกคู่ (SLT)

ค่า centromeric index (CI) = LI / LT

การจับคู่ของโครโมโซม ยึดหลักดังต่อไปนี้

1. ทำการจับคู่ของโครโมโซม โดยดูจากความยาวและตำแหน่งของเซนโทรเมียร์ (centromere) ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกัน กำหนดหมายเลขโครโมโซมแต่ละแท่ง

2. วัดความยาวของโครโมโซมแต่ละแท่งจากภาพถ่าย

3. กำหนดชนิดของโครโมโซมจากค่า CI ดังต่อไปนี้

ค่า CI	ชนิดของโครโมโซม
0.500-0.599	เมทาเซนทริก (metacentric)
0.600-0.699	ซับเมทาเซนทริก (submetacentric)
0.700-0.899	อโครเซนทริก (acrocentric)
0.900-1.000	เทโลเซนทริก (telocentric)

4. กำหนดขนาดของโครโมโซม โดยกำหนดให้โครโมโซมคู่ที่ 1 เป็นโครโมโซมคู่ใหญ่สุด (large, L) โครโมโซมขนาดกลาง (medium, M) คือ โครโมโซมที่มีความยาวน้อยกว่าครึ่งหนึ่งของความยาวเฉลี่ยของโครโมโซมคู่ใหญ่สุด ร่วมกับโครโมโซมคู่เล็กสุด และโครโมโซมขนาดเล็ก (small, S) คือ โครโมโซมที่มีค่าความยาวน้อยกว่าครึ่งหนึ่งของความยาวเฉลี่ยของโครโมโซมคู่ใหญ่สุด

โครโมโซมขนาดใหญ่ (L) = โครโมโซมคู่ที่ 1

โครโมโซมขนาดกลาง (M) < (LT เฉลี่ยคู่ที่ 1 + LT เฉลี่ยคู่สุดท้าย) / 2

โครโมโซมขนาดเล็ก (S) < LT เฉลี่ยคู่ที่ 1 / 2

ทำการหาค่าจำนวนโครโมโซมพื้นฐาน (fundamental number, NF) ได้แก่ ค่าจำนวนแขนของโครโมโซมทั้งหมดในเซลล์ (chromosome complement หรือ diploid number)

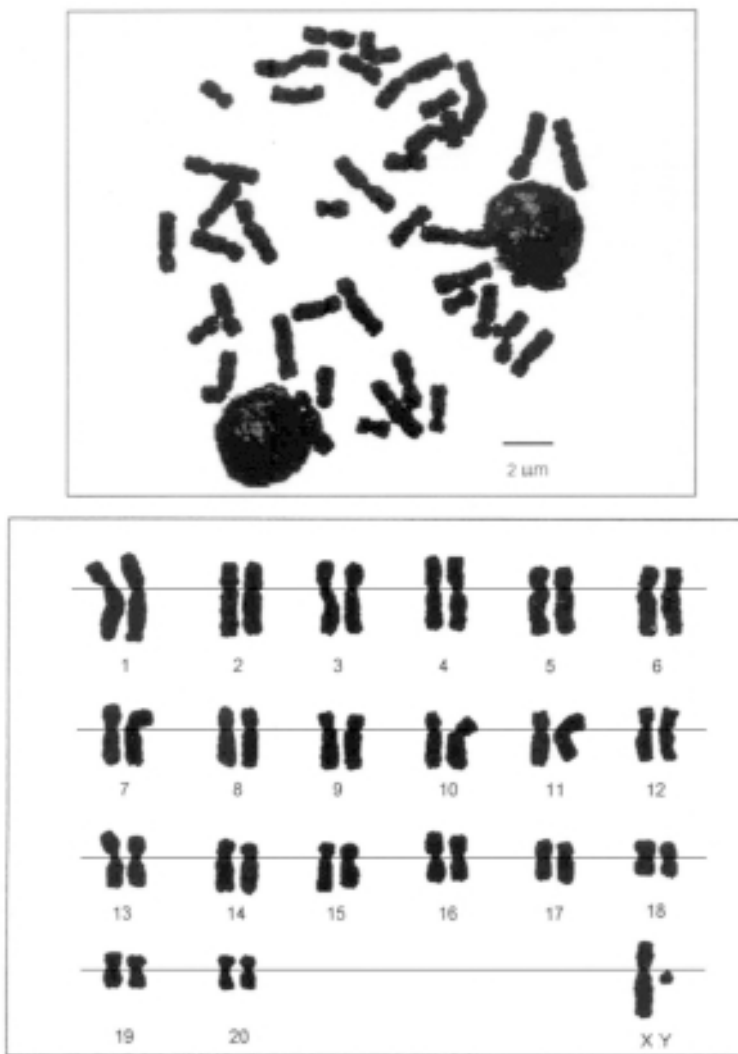
3. ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

การศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ของลิงแสม ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาว และจากการย้อมสีโครโมโซมแบบธรรมดา พบว่าลิงแสมมีจำนวนโครโมโซม 2n (diploid) เท่ากับ 42 แห่ง ประกอบด้วยโครโมโซมร่างกาย 40 แห่ง (20 คู่) และโครโมโซมเพศ 2 แห่ง (1 คู่) สอดคล้องกับรายงานการศึกษาของ Brown และคณะ [12]; Hirai และคณะ [13] ที่ได้รายงานการศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ของลิงแสม พบว่ามีจำนวนโครโมโซม 2n เท่ากับ 42 แห่ง เมื่อทำการเปรียบเทียบกับลิงที่อยู่ในวงศ์ย่อย Cercopithecinae ทั้งหมด พบว่ามีจำนวนโครโมโซมที่เท่ากันกับลิงสกุล *Macaca* อื่นๆ คือ ลิงวอก [9] [11] [12] ลิงกัง ลิงเสน ลิง celebes macaque (*M. nigra*) ลิง bonnet macaque (*M. radiata*) และลิงสกุล *Cercocebus* คือ sooty mangabey (*Cercocebus atys*) [12]

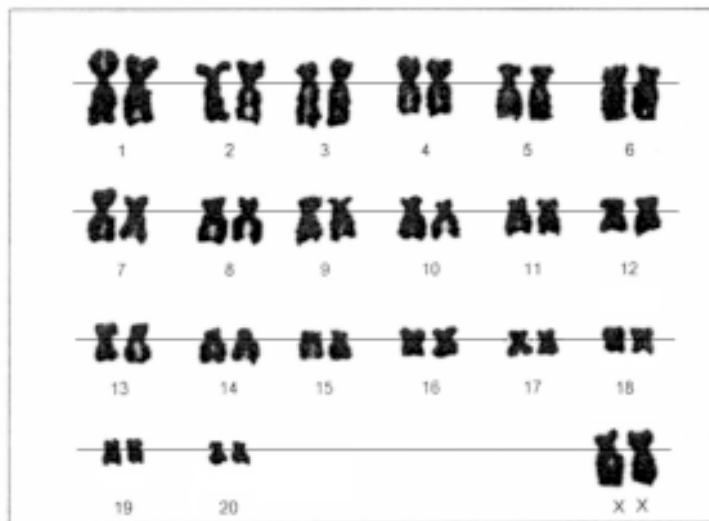
จากการศึกษาพบว่าลิงแสมมีจำนวนโครโมโซมพื้นฐานเท่ากับ 83 ในเพศผู้ และ 84 เพศเมีย ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการศึกษาของ Hirai และคณะ [13] ที่รายงานว่าลิงแสมมีจำนวนโครโมโซมพื้นฐานเท่ากับ 83 ในเพศผู้ และ 84 ในเพศเมีย โครโมโซมระยะเมทาเฟสและคาริโอไทป์ของลิงแสม ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา แสดงไว้ดังภาพที่ 1 และ 2

ลิงแสมมีโครโมโซมร่างกาย 2 ชนิด คือ ชนิดเมทาเซนทริก 18 แห่ง และซับเมทาเซนทริก 22 แห่ง และประกอบด้วยโครโมโซมทุกขนาด (ใหญ่ กลาง และเล็ก) มีโครโมโซมร่างกายชนิดเมทาเซนทริกขนาดใหญ่ กลาง และเล็ก เท่ากับ 6-4-8 แห่ง ตามลำดับ ชนิดซับเมทาเซนทริกขนาดใหญ่ กลาง และเล็ก เท่ากับ 8-12-2 แห่ง ตามลำดับ สอดคล้องกับรายงานการศึกษาของ Brown และคณะ [12]; Hirai และคณะ [13] ที่พบว่าลิงแสมมีโครโมโซมร่างกายชนิดเมทาเซนทริก 18 แห่ง และซับเมทาเซนทริก 22 แห่ง แต่ไม่ได้รายงานขนาดของโครโมโซม และเมื่อทำการเปรียบเทียบกับลิงที่อยู่ในสกุล *Macaca* ชนิดอื่นๆ ในประเทศไทย พบว่าลิงเสนว่ามีโครโมโซมร่างกายชนิดเมทาเซนทริก 12 แห่ง ชนิดซับเมทาเซนทริก 28 แห่ง [7] ชนิดเมทาเซนทริก 18 แห่ง ชนิดซับเมทาเซนทริก 22 แห่ง [12] ลิงกังมีโครโมโซมร่างกายชนิดเมทาเซนทริก 18 แห่ง ชนิดซับเมทาเซนทริก 22 แห่ง [12] และลิงวอกมีโครโมโซมร่างกายชนิดเมทาเซนทริก 18 แห่ง ชนิดซับเมทาเซนทริก 22 แห่ง [9] [11] [12] อิดิโอแกรม (idiogram) ของลิงแสมเป็นการเรียงลำดับของโครโมโซมร่างกาย จากขนาดใหญ่ไปขนาดเล็ก แสดงไว้ดังภาพที่ 3

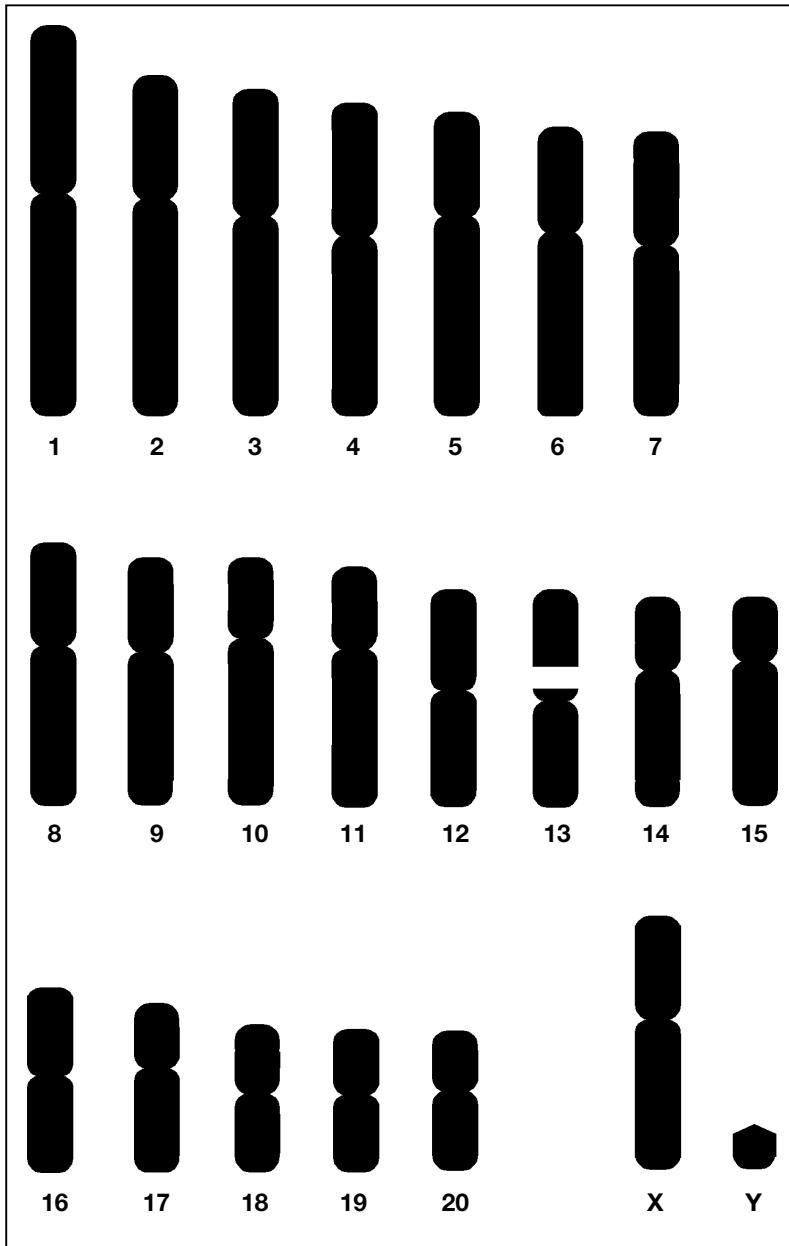
ลิงแสมมีโครโมโซมเอ็กซ์เป็นชนิดเมทาเซนทริกขนาดกลาง และมีโครโมโซมวายเป็นชนิดเทโลเซนทริกขนาดเล็กมากที่สุด สอดคล้องกับรายงานการศึกษาของ Brown และคณะ [12] ที่พบว่าลิงแสมมีโครโมโซมเอ็กซ์ชนิดเมทาเซนทริก และมีโครโมโซมวายชนิดเทโลเซนทริก แต่ไม่ได้ระบุขนาดของโครโมโซม Hirai และคณะ [13] พบว่าลิงแสมมีโครโมโซมเอ็กซ์ชนิดเมทาเซนทริกขนาดกลาง และมีโครโมโซมวายชนิดเทโลเซนทริกขนาดเล็ก เมื่อทำการเปรียบเทียบกับลิงที่อยู่ในสกุล *Macaca* ชนิดอื่นๆ ในประเทศไทย พบว่าลิงเสนมีโครโมโซมเอ็กซ์ชนิดซับเมทาเซนทริก และโครโมโซมวายชนิดซับเมทาเซนทริก แต่ไม่ได้ระบุขนาด [7] [12] ลิงวอกมีโครโมโซมเอ็กซ์ชนิดเมทาเซนทริก และโครโมโซมวายชนิดเมทาเซนทริก แต่ไม่ได้ระบุขนาด [12] มีโครโมโซมเอ็กซ์ชนิดเมทาเซนทริกขนาดกลาง และโครโมโซมวายชนิดเมทาเซนทริกขนาดเล็ก [9] [11] และลิงกังมีโครโมโซมเอ็กซ์ชนิดซับเมทาเซนทริก และโครโมโซมวายชนิดเทโลเซนทริก แต่ไม่ได้ระบุขนาด [12]



รูปที่ 1 เมทาเฟสโครโมโซม (กำลังขยาย 4,000 เท่า) และคาริโอไทป์ของลิงแสม (*Macaca fascicularis*) เพศผู้ 2n เท่ากับ 42 แห่ง ด้วยวิธีย้อมสีแบบธรรมดา



รูปที่ 2 เมทาเฟสโครโมโซม (กำลังขยาย 4,000 เท่า) และคาริโอไทป์ของลิงแสม (*Macaca fascicularis*) เพศเมีย $2n$ เท่ากับ 42 แท่ง ด้วยวิธีย้อมสีแบบธรรมดา



รูปที่ 3 อิติโอแกรมของลิงแสม (*Macaca fascicularis*) $2n$ เท่ากับ 42 แท่ง
จากโครโมโซมระยะเมทาเฟส ที่ย้อมสีแบบธรรมดา

จากรายงานการศึกษา ยังแสดงให้เห็นว่าโครโมโซมเพศของลิงสกุล *Macaca* มีความแปรผันทั้งรูปร่างและขนาดที่แตกต่างกัน โดยโครโมโซมเอ็กซ์เป็นชนิดเมทาเซนทริกหรือซับเมทาเซนทริก โครโมโซมวายเป็นชนิดเมทาเซนทริก ซับเมทาเซนทริก หรือเทโลเซนทริก ดังรายงานการศึกษาของ Brown และคณะ [12] ซึ่งพบว่าลิงสกุล *Macaca* ได้แก่ ลิงแสม ลิงเสน ลิงวอก ลิง celebes macaque (*M. nigra*) ลิง bonnet macaque (*M. radiata*) มีความแปรผันของโครโมโซมเอ็กซ์ และโครโมโซมวาย Napier และ Napier [9] พบว่าโครโมโซมวายของลิงสกุล *Macaca*

มีขนาดเล็กมาก และมีรูปร่างแตกต่างกัน บางครั้งไม่สามารถบอกตำแหน่งของเซนโทรเมียร์ (centromere) และจำแนกชนิดของโครโมโซมได้ชัดเจน Hirai และคณะ [13] พบว่าโครโมโซมวายของลิงสกุล *Macaca* มีความแปรผันทั้งขนาดและรูปร่าง ซึ่งพบได้ในลิงวอก ลิงกัง ลิงญี่ปุ่น (Japanese macaque, *M. fuscata*) และลิงไต้หวัน (Taiwan macaque, *M. cyclopis*) Stanyon [16] รายงานพบความแตกต่างในการติดแถบสีซี (C-banding) ของโครโมโซมวายในลิงสกุล *Macaca* และลิงสกุล *Cercocebus* ได้แก่ ลิงญี่ปุ่น และลิง black mangabey (*Cercocebus atterimus* or *Lophocebus atterimus*) นอกจากนี้ Makino และ Takagi [17] ศึกษาความแปรผันของโครโมโซมวายในมนุษย์ พบว่าเป็นโครโมโซมชนิดอะโครเซนทริก ที่มีขนาดความยาวผันแปรในแต่ละบุคคล

ในการศึกษาค้างนี้พบโครโมโซมเครื่องหมายของลิงแสม คือ มี nucleolar organizer region (NORs) อยู่บนแขนข้างสั้นของโครโมโซมร่างกายชนิดเมทาเซนทริกคู่ที่ 13 (แสดงความเป็น satellite chromosome) เมื่อทำการเปรียบเทียบกับลิงที่อยู่ในวงศ์ย่อย Cercopithecinae พบว่าลิงแสม ลิงวอก ลิงเสน ลิง celebes crested ลิง bonnet และลิง mangabey พบ NORs บนแขนข้างสั้นของโครโมโซมร่างกายคู่ที่ 9 [12] สำหรับคู่ของ NORs ที่มีความแตกต่างกันเนื่องมาจากวิธีการจัดคาร์ิโอไทป์ ซึ่งในการศึกษาค้างนี้ยึดหลักการของ Nash และ O'Brien [19]; Wada และคณะ [20] ที่ได้รายงานการจัดคาร์ิโอไทป์โดยเรียงลำดับจากโครโมโซมขนาดใหญ่สุดไปยังเล็กสุด โดยไม่ยึดว่าเป็นโครโมโซมชนิดใด และวางโครโมโซมเพศไว้มุมล่างขวาสุด

รายงานของ Jones และคณะ [18] พบว่าลิงสกุล *Macaca* ลิงบาบูน (baboon) และชะนี มี NORs บนโครโมโซมร่างกาย 1 คู่ รายงานของ Stanyon [16] พบ NORs อยู่บนแขนข้างสั้นของโครโมโซม 1 คู่ คือ คู่ที่ 13 ในลิงญี่ปุ่น และลิง black mangabey ซึ่งเป็นลิงในวงศ์เดียวกัน แต่มีขนาดของ NORs แตกต่างกัน เมื่อตรวจดูเซลล์ระยะเมทาเฟสของลิงสกุล *Macaca* ในประเทศไทย จะสังเกตเห็นโครโมโซมเครื่องหมาย คือ โครโมโซมคู่ที่ 1 เป็นชนิดเมทาเซนทริกขนาดใหญ่ที่สุดเห็นได้อย่างเด่นชัด นอกจากนี้โครโมโซมวายเป็นโครโมโซมเครื่องหมายที่สามารถจำแนกชนิดของลิงในสกุล *Macaca* ออกจากกันได้ โดยลิงวอกมีโครโมโซมวายชนิดเมทาเซนทริก ลิงเสนมีโครโมโซมวายชนิดซับเมทาเซนทริก ลิงแสมและลิงกังมีโครโมโซมวายชนิดเทโลเซนทริก ซึ่งสอดคล้องกับรายงานศึกษาของ Napier และ Napier [9]; Brown และคณะ [12]; Hirai และคณะ [13]; Small และ Stanyon [16]

จากการศึกษาในค้างนี้พบว่าลิงแสมมีจำนวนโครโมโซม ชนิดของโครโมโซมร่างกาย และโครโมโซมเพศที่เหมือนกันกับรายงานที่มีมาก่อนหน้านี้ ลิงแสมมี NORs อยู่บนแขนข้างสั้นของโครโมโซมคู่ที่ 13 สำหรับการศึกษา ค้างนี้เป็นรายงานครั้งแรกของการจัดขนาดของโครโมโซมร่างกายและการสร้างสูตรคาร์ิโอไทป์ของลิงแสม ผลที่ได้จากการศึกษาในค้างนี้สามารถที่จะใช้เป็นแหล่งอ้างอิงข้อมูลพื้นฐานทางพันธุศาสตร์เซลล์ของลิงแสมในประเทศไทย เพื่อที่จะนำไปใช้ประโยชน์ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของโครโมโซม ของสัตว์ในกลุ่มไพรเมทของประเทศไทยต่อไปในอนาคต

จากการนำเซลล์ที่อยู่ในระยะเมทาเฟสของลิงแสมเพศผู้และเพศเมียอย่างละ 20 เซลล์ มาทำการวัดขนาดของโครโมโซมที่มีหน่วยเป็นเซนติเมตร พบว่าโครโมโซมของลิงแสมมีค่าเฉลี่ยความยาวของแขนโครโมโซมข้างสั้น (Ls) ความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาว (Ll) ความยาวของโครโมโซมแต่ละคู่ (LT) ค่า relative length (RL) ค่า centromeric index (CI) ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ของค่า RL และ CI และทำการกำหนดขนาดและชนิดของโครโมโซม แสดงไว้ดังตารางที่ 1 สูตรคาร์ิโอไทป์ของลิงแสมเพศผู้และเพศเมีย เป็นดังนี้

$$\text{ลิงแสม } 2n (42) = L_6^m + L_8^{sm} + M_4^m + M_{12}^{sm} + S_8^m + S_2^{sm} + \text{โครโมโซมเพศ}$$

ตารางที่ 1 ค่าเฉลี่ยความยาวของแขนโครโมโซมข้างสั้น (short arm; Ls) ความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาว (long arm; LI) ความยาวทั้งหมดของโครโมโซมแต่ละคู่ (total length; LT) ค่า relative length (RL) ค่า centromeric index (CI) ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) ของ RL และ CI จากเซลล์ระยะเมทาเฟสเพศผู้และเพศเมียเพศละ 20 เซลล์ ของลิงแสม 2n เท่ากับ 42 แท่ง

โครโมโซมคู่ที่	Ls	LI	LT	RL \pm SD	CI \pm SD	ขนาดของโครโมโซม	ชนิดของโครโมโซม
1	0.846	1.206	2.053	0.074 \pm 0.003	0.588 \pm 0.024	L	m
2	0.651	1.151	1.802	0.065 \pm 0.003	0.639 \pm 0.027	L	sm
3	0.605	1.044	1.649	0.060 \pm 0.004	0.633 \pm 0.012	L	sm
4	0.726	0.915	1.642	0.060 \pm 0.004	0.558 \pm 0.016	L	m
5	0.504	1.060	1.565	0.057 \pm 0.004	0.678 \pm 0.018	L	sm
6	0.532	0.978	1.510	0.055 \pm 0.004	0.648 \pm 0.028	L	sm
7	0.598	0.893	1.491	0.054 \pm 0.004	0.599 \pm 0.021	L	m
8	0.520	0.826	1.346	0.049 \pm 0.004	0.614 \pm 0.023	M	sm
9	0.481	0.808	1.288	0.047 \pm 0.004	0.627 \pm 0.016	M	sm
10	0.418	0.868	1.285	0.047 \pm 0.004	0.675 \pm 0.017	M	sm
11	0.417	0.821	1.238	0.045 \pm 0.004	0.663 \pm 0.024	M	sm
12	0.545	0.613	1.158	0.042 \pm 0.006	0.530 \pm 0.018	M	m
13	0.555	0.595	1.150	0.042 \pm 0.003	0.517 \pm 0.012	M	m
14	0.358	0.766	1.124	0.041 \pm 0.004	0.682 \pm 0.025	M	sm
15	0.328	0.758	1.086	0.039 \pm 0.003	0.698 \pm 0.010	M	sm
16	0.450	0.495	0.945	0.034 \pm 0.003	0.524 \pm 0.013	S	m
17	0.329	0.563	0.893	0.032 \pm 0.006	0.631 \pm 0.021	S	sm
18	0.357	0.388	0.745	0.027 \pm 0.003	0.521 \pm 0.010	S	m
19	0.348	0.368	0.716	0.026 \pm 0.003	0.513 \pm 0.013	S	m
20	0.310	0.401	0.711	0.026 \pm 0.005	0.564 \pm 0.174	S	m
X	0.531	0.765	1.296	0.047 \pm 0.004	0.590 \pm 0.126	M	m
Y	0.000	0.285	0.285	0.010 \pm 0.008	1.000 \pm 0.000	S	t

หมายเหตุ : L = โครโมโซมขนาดใหญ่ M = โครโมโซมขนาดกลาง S = โครโมโซมขนาดเล็ก

m = โครโมโซมชนิดเมทาเซนทริก sm = โครโมโซมชนิดซับเมทาเซนทริก และ

t = โครโมโซมชนิดเทโลเซนทริก

4. สรุปผลการทดลอง

การศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ของลิงแสมในประเทศไทย เตรียมโครโมโซมด้วยการเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาว ผลการศึกษาพบว่าลิงแสมมีจำนวนโครโมโซม 2n เท่ากับ 42 แท่ง มีจำนวนโครโมโซมพื้นฐานเท่ากับ 83 ในเพศผู้ และ 84 ในเพศเมีย โครโมโซมร่างกายประกอบด้วยโครโมโซมชนิดเมทาเซนทริกขนาดใหญ่ 6 แท่ง ซับเมทาเซนทริกขนาดใหญ่ 8 แท่ง เมทาเซนทริกขนาดกลาง 4 แท่ง ซับเมทาเซนทริกขนาดกลาง 12 แท่ง เมทาเซนทริกขนาดเล็ก 8 แท่ง และซับเมทาเซนทริกขนาดเล็ก 2 แท่ง โครโมโซมคู่ที่ 13 จัดเป็น satellite chromosome โครโมโซมเอ็กซ์เป็นชนิดเมทาเซนทริกขนาดกลาง และโครโมโซมวายเป็นชนิดเทโลเซนทริกขนาดเล็ก

5. กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้ทำการวิจัยขอขอบคุณองค์การสวนสัตว์ในพระบรมราชูปถัมภ์ ที่ได้สนับสนุนเงินทุนสำหรับการศึกษาในครั้งนี้ ขอขอบคุณท่านผู้อำนวยการองค์การสวนสัตว์ นายโสภณ ดำนุญ และผู้อำนวยการสวนสัตว์นครราชสีมา นาวาอากาศโทกระวี กริฑาพล ที่ได้อนุญาตทำการเจาะเก็บตัวอย่างเลือดลิงแสม ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่และพนักงานสวนสัตว์ทุกท่าน ที่ช่วยให้การศึกษาในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

6. เอกสารอ้างอิง

1. Wilson, D. E. and Cole, F. R., 2000, *Common Names of Mammals of the World*, Smithsonian Institution Press, Washington.
2. Groves, C., 2001, *Primate Taxonomy*, Smithsonian Institution Press, Washington and London.
3. Lekagul, B. and McNeely, J. A., 1977, *Mammals of Thailand*, 1sted, Kurusapha Ladprao Press, Bangkok, Thailand.
4. Lekagul, B. and McNeely, J. A., 1988, *Mammals of Thailand*, 2nded, Sahakarn Bhaet, Bangkok, Thailand.
5. จอห์น พาร์, 2546. *สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมในประเทศไทย*, สำนักพิมพ์สารคดี, กรุงเทพฯ.
6. Hamada, Y., Ohsawa, H., Urasopon, N., and Malaivijitnond, S., 2004, "Priliminary Report on the Distribution and Status of Macaques in Thailand," *Primate Research*, Vol. 20, pp. 97-108.
7. Chiarelli, B., 1962, "Comparative and Morphometric Analysis of Primate Chromosomes: The Chromosomes of Genera *Macaca*, *Papio*, *Theropithecus* and *Cercocebus*," *Caryologia*, Vol. 15, pp. 401-420.

8. Hsu, T. C. and Benirschke, K., 1967, *An Atlas of Mammalian Chromosomes*, Springer-Verlag Press, New York.
9. Napier, J. R. and Napier, P. H., 1976, *A Handbook of Living Primates*, John Wiley and Sons, New York.
10. Caballin, M. R., Miro, R., Ponsa, M., Florit, F., Massa, C., and Egozcue J., 1980, "Banding Patterns of the Chromosomes of *Cercopithecus petaurista* (Schreber, 1775): Comparison with Other Primate Species," *Folia primatal*, Vol. 34, pp. 278-285.
11. Small, M. F. and Stanyon, R., 1985, "High-resolution Chromosome of Rhesus Macaques (*Macaca mulatta*)," *American Journal of Primatol*, Vol. 9, pp. 63-67.
12. Brown, C. J., Dunbar, V. G., and Shafer, D. A., 1986, "A Comparison of the Karyotypes of Six Species of the Genus *Macaca* and a Species of the Genus *Cercocebus*," *Folia primatol*, Vol. 46, No. 3, pp. 164-172.
13. Hirai, S., Terao, K., Cho, F., and Honjo, S., 1991, "Chromosome Studies on Cynomolgus Monkeys (*Macaca fascicularis*)," *Primate Today* (Akiyoshi Ehara et al., eds), pp. 619-622.
14. อมรา คัมภีรานนท์, 2540, *พันธุศาสตร์ของเซลล์*, ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
15. กัณยรัตน์ ไชยสุต, 2532, *เซลล์พันธุศาสตร์และเซลล์อนุกรมวิธานของพืชสกุล Zephyranthes*, ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.
16. Stanyon, R., Ardito, G., Lamberti, L., and Bigatti, P., 1983, "The Banded Karyotype of *Macaca fuscata* Compared with *Cercocebus atterimus*," *Folia Primatol*, Vol. 41, pp. 137-146.
17. Makino, S. and Takagi, N., 1965, "Some Morphological Aspects of the Abnormal Human Y Chromosome," *Cytologia*, Vol. 30, pp. 274-291.
18. Jones, S., Martin, R., and Pilbeam, D., 1994, *The Cambridge Encyclopedia of Human Evolution*, Cambridge University Press, Cambridge.
19. Nash, W. G. and O'Brien, S. J., 1987, "A Comparative Chromosome Banding Analysis of Ursidae and their Relationship to Other Carnivores", *Cytogenet. Cell Genet.*, Vol. 45, pp. 206-212.
20. Wada, M. Y., Lim, Y., and Wurster-Hill, D. H., 1991, "Banded Karyotype of Wild Caught Male Korean Raccoon Dog, *Nyctereutes Procyonoides Koreensis*", *Genome*, Vol. 34, pp. 302-306.