

พันธุศาสตร์เซลล์ของลิงกัง (*Macaca nemestrina*) ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา
อลงกต แทนอมตอง^{a,*} สัมภาษณ์ คุณสุข^a วิวรรธน์ แก่นสา^a และเรืองวิทย์ บรรจงรัตน์^b

Cytogenetics of Pig-tailed Macaque (*Macaca nemestrina*) by Conventional Staining

Alongkoad Tanomtong^{a,*}, Sumpars Khunsook^a, Wiwat Kaensa^a and Rongvit Bunjongrat^b

^a ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ.ขอนแก่น 40002

^b ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร 10400

^a Department of Biology, Faculty of Science, Khon Khaen University, Khon Khaen 40002, Thailand.

^b Department of Botany, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10400, Thailand.

* Corresponding author. E-mail address: tanomtong@hotmail.com (A. Tanomtong)

Received 4 March 2005; accepted 21 November 2005

บทคัดย่อ

จำนวนโครโมโซมและลักษณะคาริโอไทป์เป็นข้อมูลที่สำคัญในการประกอบการจัดจำแนกกลุ่มของสัตว์ป่าในประเทศไทย มีรายงานการศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ของสัตว์ป่าน้อยมาก จึงควรที่จะต้องมีการศึกษาเพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐาน และประยุกต์ใช้ในการศึกษาวิจัยอื่นต่อไป การศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ของลิงกังในประเทศไทย มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาจำนวนโครโมโซมและลักษณะคาริโอไทป์ ใช้ตัวอย่างสัตว์จากสวนสัตว์นครราชสีมา เตรียมโครโมโซมด้วยการเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาว เก็บเกี่ยวเซลล์ด้วยเทคนิคโคลชิซิน-ไฮโปโทนิก-ฟิกเซชัน-แอร์ดรายอิ้ง ทำการย้อมสีแบบธรรมดา ผลการศึกษาพบว่า ลิงกังมีจำนวนโครโมโซม 2n (diploid) เท่ากับ 42 แท่ง มีจำนวนโครโมโซมพื้นฐานเท่ากับ 83 ในเพศผู้ และ 84 ในเพศเมีย โครโมโซมร่างกายประกอบด้วยโครโมโซมชนิดเมทาเซนตริกขนาดใหญ่ 6 แท่ง ซับเมทาเซนตริกขนาดใหญ่ 8 แท่ง เมทาเซนตริกขนาดกลาง 4 แท่ง ซับเมทาเซนตริกขนาดกลาง 12 แท่ง เมทาเซนตริกขนาดเล็ก 8 แท่ง และซับเมทาเซนตริกขนาดเล็ก 2 แท่ง โครโมโซมคู่ที่ 13 จัดเป็น satellite chromosome โครโมโซมเอ็กซ์เป็นชนิดซับเมทาเซนตริกขนาดกลาง และโครโมโซมวายเป็นชนิดเทโลเซนตริกขนาดเล็กมากที่สุด สรุปได้ว่าลิงกังมีสูตรคาริโอไทป์ ดังต่อไปนี้

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

คำสำคัญ: พันธุศาสตร์เซลล์, คาริโอไทป์, โครโมโซม, ลิงกัง

Abstract

Chromosome number and karyotype are important basic cytogenetics knowledge of wildlife animals. In Thailand, cytogenetics of a wildlife rare animal, pig-tailed macaque (*Macaca nemestrina*), has never been studied. This work, therefore primarily aimed to study the chromosome number and karyotype of pig-tailed macaque. This basic knowledge would lead to advance cytogenetic studies on this animal. Blood samples were taken from the species kept in Nakronratchasima Zoo. After the standard whole blood lymphocyte culture in presence of colchicine, the metaphase spreads were performed on microscopic slides and air-dried. Conventional Giemsa's staining were applied to stain chromosome. The results showed that the number of diploid chromosome of pig-tailed macaque was determined to be 2n=42, the fundamental number (NF) are 83 in males and 84 in females and males. The type of autosome is 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 with clearly observable satellite chromosome. X-chromosome is the medium submetacentric and Y-chromosome is a smallest telocentric chromosome. The karyotype formula for the pig-tailed macaque is as follows:

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

Keywords: cytogenetics, karyotype, chromosome, pig-tailed macaque

บทนำ

สัตว์ในอันดับ (order) ไพรเมท (primate) มีทั้งหมด 13 วงศ์ (family) 60 สกุล (genus) และ 232 ชนิด (species) (Wilson and Cole, 2000) ในประเทศไทยพบสัตว์ในอันดับไพรเมท 3 วงศ์ 5 สกุล และ 13 ชนิด เป็นลิงที่อยู่ในสกุล *Macaca* 5 ชนิด ได้แก่ ลิงเสน (stump-tailed macaque, *Macaca arctoides* Geoffroy, 1831) ลิงไอ้เงี้ยวหรือวอกภูเขา (assamese macaque, *Macaca assamensis* McClelland, 1839) ลิงแสมหรือลิงหางยาว (crab-eating macaque or long-tailed macaque, *Macaca fascicularis* Raffles, 1821) ลิงวอก (rhesus macaque, *Macaca mulatta* Zimmermann, 1780) และลิงกัง (pig-tailed macaque, *Macaca nemestrina* Linnaeus, 1766) (Rowe, 1996; Groves, 2001)

ลิงทั้ง 5 ชนิด จัดเป็นสัตว์ป่าคุ้มครองประเภทที่ 1 ของไทย ตามพระราชบัญญัติสงวนและคุ้มครองสัตว์ป่า พ.ศ. 2535 และสมัชชาการอนุรักษ์สิ่งแวดล้อมโลก (The World Conservation Congress, WCC) และลิงสกุล *Macaca* บางชนิด เช่น ลิงเสน จัดให้อยู่ในสถานภาพสัตว์ที่มีแนวโน้มที่จะสูญพันธุ์ในอนาคตอันใกล้ นอกจากนี้ ยังถูกจัดให้อยู่ในบัญชีหมายเลขสอง (appendix II) ของภาคีสัญญาว่าด้วยการค้าระหว่างประเทศ ซึ่งชนิดของสัตว์ป่าและพืชป่าใกล้สูญพันธุ์ ซึ่งหมายถึงสัตว์ป่าและพืชป่าที่ยังไม่ถึงกับใกล้สูญพันธุ์จึงยังอนุญาตให้ค้าได้ แต่ต้องควบคุมการค้าขายเพื่อหลีกเลี่ยงการใช้ประโยชน์ที่ไม่สอดคล้องกับความอยู่รอดของชนิดพันธุ์นั้นๆ (พาร์ จอห์น, 2546)

ลิงกังสามารถจัดอนุกรมวิธานอยู่ในอาณาจักร (kingdom) สัตว์ (animalia) ไฟลัม (phylum) สัตว์มีกระดูกสันหลัง (chordata) ชั้น (class) สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (mammal) อันดับไพรเมท วงศ์ Cercopithecidae วงศ์ย่อย Cercopithecinae สกุล *Macaca* และชนิด *Macaca nemestrina* ลิงกังในประเทศไทยมี 2 ชนิดย่อย (subspecies) ได้แก่ *M. n. nemestrina* (Linnaeus, 1766) มีการแพร่กระจายตั้งแต่ละติจูด $7^{\circ} 30' N$ ลงมา และ *M. n. leonina* (Blyth, 1863) มีการแพร่กระจายตั้งแต่ละติจูด $8^{\circ} N$ ขึ้นไป สำหรับข้อแตกต่างระหว่างลิงกังทั้งสองชนิดย่อย คือ ชนิดย่อย *M. n. nemestrina* จะมีหางที่โค้งไปข้างหลังและชี้ลง และชนิดย่อย *M. n. leonina* จะมีหางที่โค้งขึ้นไปบนหลัง ลักษณะที่สำคัญของ ลิงกัง ได้แก่ มีหางสั้นกว่าครึ่งหนึ่งของความยาวหัวและลำตัว มีสีสองแบบ คือ แบบลำตัวด้านบนสีน้ำตาลแกมเทา และแบบลำตัวด้านบนสีน้ำตาลแกมแดงกระหม่อมสีน้ำตาลเข้มคล้ายใส่หมวก แก้มมีแสงกลาง อาหารที่กิน ได้แก่ ผลไม้ แมลง สัตว์เลื้อยคลานขนาดเล็ก และยอดอ่อนต้นไม้อาหารแพร่กระจายตัวของลิงกังพบได้ในประเทศไทย พม่า มาเลเซีย แคว้นอัสสัม เกาะบอร์เนียว และเกาะสุมาตรา (วรเรน บรอดเคลแมน, 2524; Lekagul and McNeely, 1977, 1988)

ลิงในประเทศไทยถูกจัดอยู่ในสกุล *Macaca* ทั้ง 5 ชนิด จากการตรวจสอบเอกสารการศึกษา พบว่ามีรายงานการศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ของลิงสกุล *Macaca* ดังรายงานการศึกษาของ ชิอาเรลลี (Chiarelli, 1962) ทสึและเบนชิกิ (Hsu and Benirschke, 1967) นาเปียร์และนาเปียร์ (Napier and Napier, 1976) คาบาลลินและคณะ (Caballin et al., 1980) สมอลล์และสแตนยอน (Small and Stanyon, 1985) บราวน์และคณะ (Brown et al., 1986) ฮิไรและคณะ (Hirai et al., 1991) สำหรับในประเทศไทยยังไม่มีรายงานการศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ของลิงกังมาก่อน จึงควรมีการศึกษาเพื่อเปรียบเทียบกับรายงานการศึกษาที่มีมาก่อนหน้านี้ การศึกษาในครั้งนี้ใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาว (lymphocyte culture) และการย้อมสีโครโมโซมแบบธรรมดา (conventional staining) ผลจากการศึกษาจะให้ข้อมูลพื้นฐานทางด้านพันธุศาสตร์เซลล์ของลิงกังในประเทศไทยเพื่อนำไปใช้เปรียบเทียบความสัมพันธ์ทางโครโมโซมของกลุ่มสัตว์อันดับไพรเมทในประเทศไทยต่อไปในอนาคต

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

ตัวอย่างเลือดที่ใช้ในการศึกษาได้จากลิงกังเพศผู้ 2 ตัว และเพศเมีย 2 ตัว ที่เลี้ยงอยู่ในสวนสัตว์นครราชสีมา จังหวัดนครราชสีมา เป็นลิงกังที่อยู่ในชนิดย่อย *M. n. nemestrina* ไม่ทราบแหล่งที่มาเนื่องจากเป็นลูกลิงที่เกิดในสวนสัตว์ เจาะเก็บเลือดโดยใช้เทคนิคปราศจากเชื้อจากเส้นเลือดดำบริเวณลำคอ เก็บในหลอดสุญญากาศ ขนาด 10 มล. ที่บรรจุสารเฮปารินเพื่อป้องกันการแข็งตัวของเลือด แล้วแช่ในกระติกน้ำแข็งตลอดการเดินทางจนถึงห้องปฏิบัติการ การทดลองแบ่งออกได้เป็น 2 ส่วน ดังนี้

การเตรียมเซลล์

เพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดที-ลิมโฟไซต์ ที่ดัดแปลงจากวิธีการในมนุษย์ของ อมรา คัมภีรานนท์ (2540) ด้วยการเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวจากเลือดปริมาณน้อย

การเพาะเลี้ยงเซลล์

เตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดอาร์พีเอ็มไอ 1640 ที่มีสารกระตุ้นการแบ่งเซลล์ คือ ไฟโตฮีมีคอลลูตินิน ความเข้มข้น 2% แบ่งอาหารลงในขวดอาหารเลี้ยงเลือดขวดละ 5 มล. จากนั้นหยุดเลือดถึงกึ่งจำนวน 0.5 มล. ลงในขวดเลี้ยงเลือด เขย่าให้สารละลายและเลือดเข้ากัน ปิดฝาขวดหลวม ๆ แล้วบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% และเขย่าเลือดทุกเช้าเย็น เมื่อครบเวลาเก็บเกี่ยวเซลล์ คือ ชั่วโมงที่ 72 หยุดสารละลายโคลชิซินเขย่าเบา ๆ ให้เข้ากัน แล้วบ่มในตู้บ่มต่ออีก 30 นาที

การเก็บเกี่ยวเซลล์

ย้ายสารละลายเลือดจากขวดเพาะเลี้ยงเลือดลงในหลอดเซนตริฟิวซ์ขนาด 12 มล. บันทึวงวดที่ 1,200 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที เซลล์เม็ดเลือดขาวจะตกตะกอนอยู่ที่ก้นหลอด แล้วดูดส่วนใสด้านบนทิ้ง จากนั้นทำให้เซลล์ฟองตัวเพื่อให้โครโมโซมมีการกระจายตัวดี โดยหยุด 0.075 โมลาร์ โปแตสเซียมคลอไรด์จำนวน 10 มล. ลงในตะกอนเซลล์ ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า แล้วบ่มต่อไปอีก 30 นาที เมื่อครบกำหนดแยกเอาโปแตสเซียมคลอไรด์ออก โดยปั่นเหวี่ยงที่ 1,200 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วดูดส่วนใสด้านบนทิ้ง ตรึงเซลล์โดยการเติมน้ำยาตรึงเซลล์ ที่มีอัตราส่วนของเมทานอล: กรดอะซิติกเข้มข้น อัตราส่วน 3 : 1 ใช้หลอดหยุดหยดน้ำยาตรึงเซลล์ที่ละหยดพร้อมกับผสมเซลล์ให้เข้ากับสารละลายด้วยเครื่องเขย่า เติมน้ำยาตรึงเซลล์ประมาณ 8 มล. บันทึวงวดที่ 1,200 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสด้านบนทิ้ง

เติมน้ำยาตรึงเซลล์ซ้ำอีก โดยค่อย ๆ ลดปริมาณน้ำยาตรึงเซลล์ที่ใช้แต่ละครั้งลง จำนวนครั้งขึ้นอยู่กับความใสของสารละลาย ทำซ้ำจนได้สารละลายที่ใสและมีตะกอนเซลล์ที่ก้นหลอด ดูดสารละลายส่วนใสด้านบนทิ้งจนเกือบหมด แล้วเติมน้ำยาตรึงเซลล์ลงไปอีก 1 มล. ผสมให้เข้ากันจากนั้นใช้ไมโครไปเปิดดูดสารละลายตะกอนเซลล์เม็ดเลือดขาวปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงบนสไลด์ที่สะอาดและเย็นจัด ผึ่งสไลด์ให้แห้ง ย้อมสีโครโมโซมแบบธรรมดาด้วยสีจิมซาส์ 10% เป็นเวลา 15 นาที ล้างสีออกด้วยน้ำประปา ผึ่งสไลด์ให้แห้ง แล้วนำไปศึกษาต่อด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

การตรวจสอบโครโมโซม

คัดเลือกเซลล์ที่มีการแบ่งเซลล์ระยะเมทาเฟส (metaphase) ที่มีโครโมโซมไม่สั้นหรือยาวเกินไป และมีการกระจายตัวของโครโมโซมไม่ซ้อนทับกัน ถ่ายภาพโครโมโซมลิงกิงเพศผู้และเพศเมียเพศละ 20 เซลล์ โดยถ่ายภาพ 10 เซลล์/ตัว ศึกษาโครโมโซมตามแบบของกันยาร์ตัน ไฮยสูต (2532) โดยหาความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาว (length long, L₁) ข้างสั้น (length short, L_s) คำนวณหาค่าความยาวของโครโมโซมแต่ละแท่ง (length total, LT) ค่า relative length (RL) และค่า centromeric index (CI) แล้วนำค่า L₁, L_s, LT, RL และ CI ของโครโมโซมทั้ง 20 เซลล์ มาหาค่าเฉลี่ย (mean) นำค่า RL และ CI มาหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) นำค่า CI มากำหนดชนิดของโครโมโซม และนำค่า LT มากำหนดขนาดของโครโมโซม

$$\text{ค่าความยาวของโครโมโซมแต่ละแท่ง (LT)} = \text{ความยาวแขนข้างยาว (L}_1\text{)} + \text{แขนข้างสั้น (L}_s\text{)}$$

$$\text{ค่า relative length (RL)} = \text{LT/ความยาวทั้งหมดของโครโมโซมทุกคู่ } (\sum \text{LT})$$

$$\text{ค่า centromeric index (CI)} = \text{L}_1 / \text{LT}$$

การจับคู่ของโครโมโซมยึดหลักดังต่อไปนี้

1. จับคู่ของโครโมโซม 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 โครโมโซมที่มีความยาวน้อยกว่าครึ่งหนึ่งของความยาวเฉลี่ยของโครโมโซมคู่ใหญ่สุดรวมกับโครโมโซมคู่เล็กสุด และโครโมโซมขนาดเล็ก (small, S) คือ โครโมโซมที่มีค่าความยาวน้อยกว่าครึ่งหนึ่งของความยาวเฉลี่ยของโครโมโซมคู่ที่ใหญ่สุด

$$\text{โครโมโซมขนาดใหญ่ (L)} = \text{โครโมโซมคู่ที่ 1}$$

$$\text{โครโมโซมขนาดกลาง (M)} < (\text{LT เฉลี่ยคู่ที่ 1} + \text{LT เฉลี่ยคู่สุดท้าย}) / 2$$

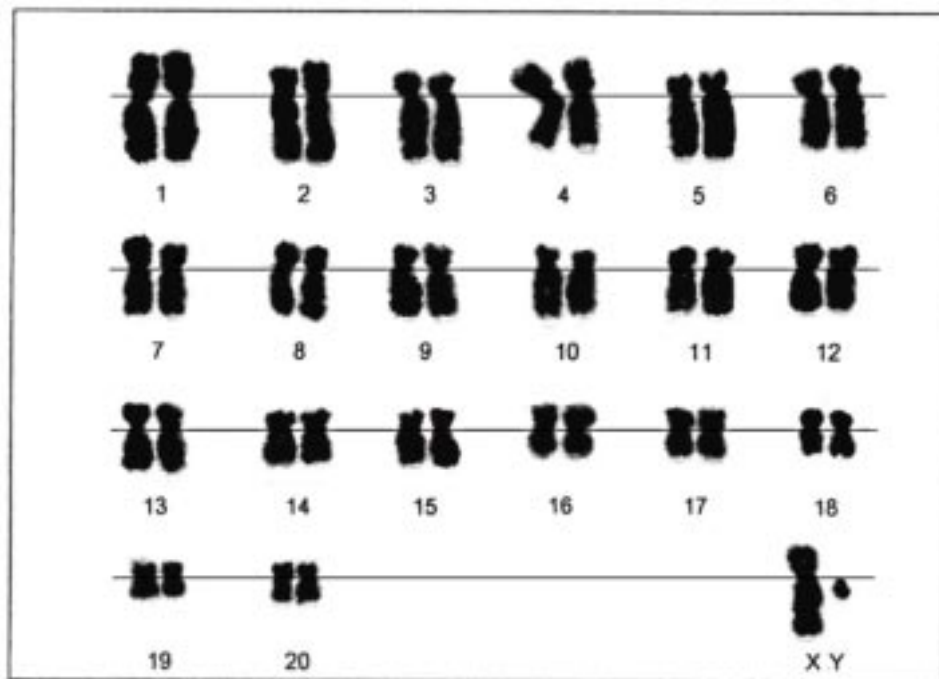
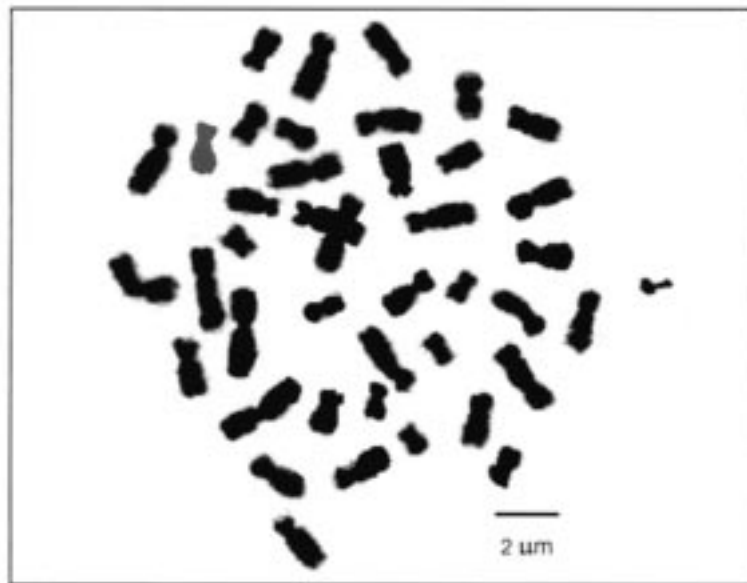
$$\text{โครโมโซมขนาดเล็ก (S)} < \text{LT เฉลี่ยคู่ที่ 1} / 2$$

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

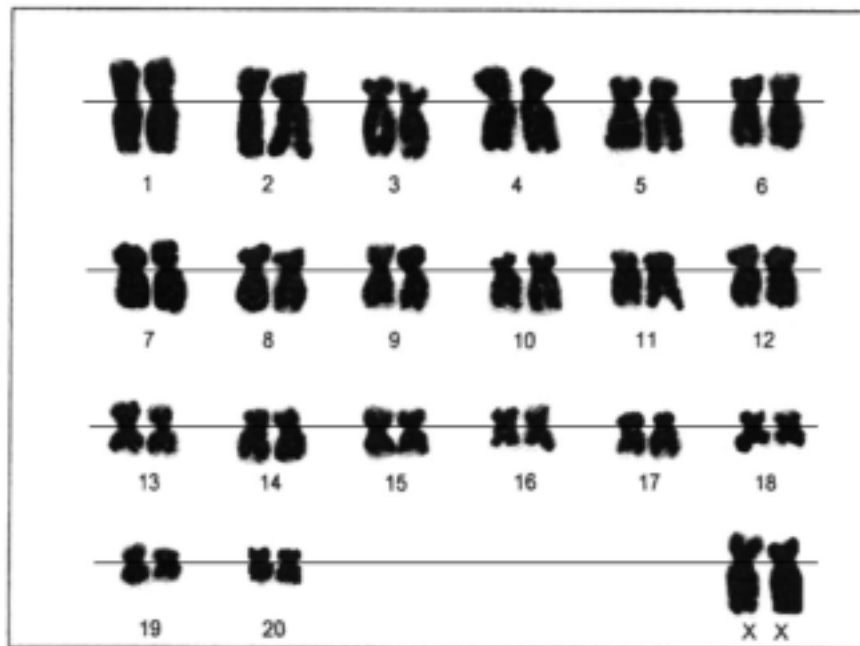
ผลและวิจารณ์ผลการศึกษา

การศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ของลิงกังด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวและจากการย้อมสีโครโมโซมแบบธรรมดาพบว่า ลิงกังมีจำนวนโครโมโซม $2n$ (diploid) เท่ากับ 42 แท่ง ประกอบด้วยโครโมโซมร่างกาย 40 แท่ง (20 คู่) และโครโมโซมเพศ 2 แท่ง (1 คู่) สอดคล้องกับรายงานการศึกษาของ บราวน์และคณะ (Brown et al., 1986) ที่ได้รายงานการศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ของลิงกังว่ามีจำนวนโครโมโซม $2n$ เท่ากับ 42 แท่ง เมื่อเปรียบเทียบกับลิงที่อยู่ในวงศ์ย่อย Cercopithecinae ทั้งหมดพบว่า มีจำนวนโครโมโซมที่เท่ากัน ดังรายงานของ บราวน์และคณะ (Brown et al., 1986) ที่พบว่าลิงสกุล *Macaca* ได้แก่ ลิงเสน ลิงแสม ลิงวอก ลิง celebes macaque (*M. nigra*) ลิง bonnet macaque (*M. radiata*) และลิงสกุล *Cercocebus* 1 ชนิด คือ ลิง sooty mangabey (*Cercocebus atys*) มีจำนวนโครโมโซม $2n$ เท่ากับ 42 แท่ง ประกอบด้วยโครโมโซมร่างกาย 40 แท่ง และโครโมโซมเพศ 2 แท่ง ฮีโรและคณะ (Hirai et al., 1991) รายงานว่า ลิงแสมมีจำนวนโครโมโซม $2n$ เท่ากับ 42 แท่ง ชีอาเรลลี (Chiarelli, 1962) รายงานว่า ลิงเสนมีจำนวนโครโมโซม $2n$ เท่ากับ 42 แท่ง และนาเปียร์และนาเปียร์ (Napier and Napier, 1976) สمولล์และสแตนยอน (Small and Stanyon, 1985) รายงานว่า ลิงวอกมีจำนวนโครโมโซม $2n$ เท่ากับ 42 แท่ง

จากการศึกษาพบว่า ลิงกังมีจำนวนโครโมโซมพื้นฐาน (fundamental number, FN) เท่ากับ 83 ในเพศผู้และ 84 ในเพศเมีย เมื่อทำการเปรียบเทียบกับลิงสกุล *Macaca* ในประเทศไทย พบว่าลิงเสนมีจำนวนโครโมโซมพื้นฐานเท่ากับ 84 ทั้งในเพศผู้และเพศเมีย (Brown et al., 1986) ลิงแสมมีจำนวนโครโมโซมพื้นฐานเท่ากับ 83 ในเพศผู้และ 84 ในเพศเมีย (Hirai et al., 1991) และลิงวอกมีจำนวนโครโมโซมพื้นฐานเท่ากับ 84 ทั้งในเพศผู้และเพศเมีย (Napier and Napier, 1976; Small and Stanyon, 1985; Brown et al., 1986) โครโมโซมระยะเมทาเฟสและคาริโอไทป์ของลิงกัง ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา แสดงไว้ดังภาพที่ 1 และ 2



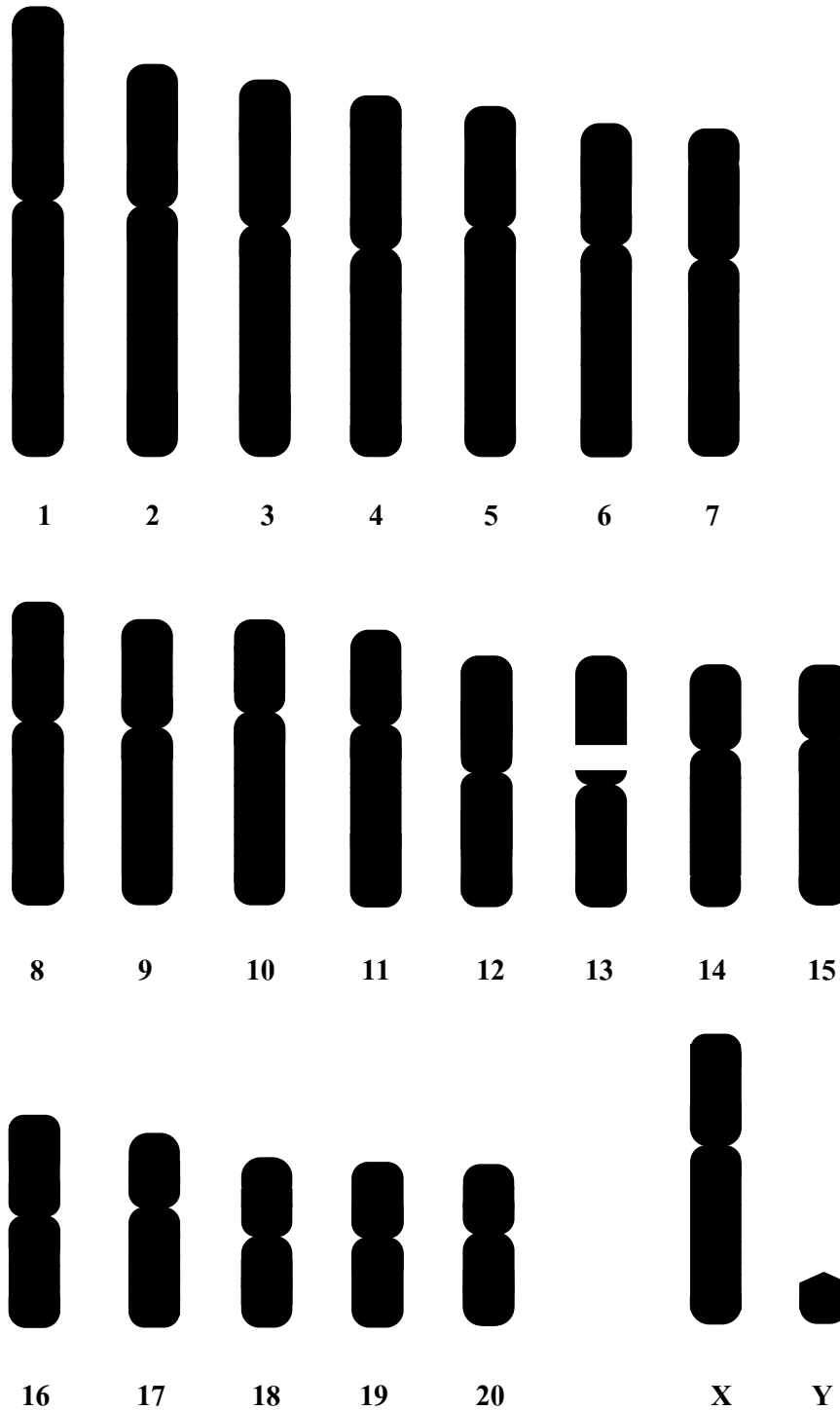
ภาพที่ 1 เมทาเฟสโครโมโซม และคาริโอไทป์ของลิงกังเพศผู้ $2n$ เท่ากับ 42 แห่ง ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา



ภาพที่ 2 เมทาเฟสโครโมโซม และคาริโอไทป์ของลิงกังเพศเมีย $2n$ เท่ากับ 42 แท่ง ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา

ลิงกังมีโครโมโซมร่างกาย 2 ชนิด คือ ชนิดเมทาเซนทริก 18 แท่ง และซับเมทาเซนทริก 22 แท่ง สอดคล้องกับรายงานการศึกษาของ บราวน์และคณะ (Brown et al., 1986) ที่พบว่า ลิงกังมีโครโมโซมร่างกายชนิดเมทาเซนทริก 18 แท่ง และซับเมทาเซนทริก 22 แท่ง เมื่อทำการเปรียบเทียบกับลิงที่อยู่ในสกุล *Macaca* พบว่า บราวน์และคณะ (Brown et al., 1986) รายงานว่า ลิงเสน ลิงแสม และลิงวอกมีโครโมโซมร่างกายชนิดเมทาเซนทริก 18 แท่ง ชนิดซับเมทาเซนทริก 22 แท่ง ฮีโรและคณะ รายงานว่าลิงแสมมีโครโมโซมร่างกายชนิดเมทาเซนทริก 18 แท่ง ชนิดซับเมทาเซนทริก 22 แท่ง และนาเปียและนาเปีย (Napier and Napier, 1976) สمولล์และสแตนยอน (Small and Stanyon, 1985) รายงานว่าลิงวอกมีโครโมโซมร่างกายชนิดเมทาเซนทริกจำนวน 18 แท่ง และชนิดซับเมทาเซนทริกจำนวน 22 แท่ง

จากการศึกษาพบว่า โครโมโซมร่างกายของลิงกังที่เป็นชนิดเมทาเซนทริก 18 แท่ง และซับเมทาเซนทริก 22 แท่ง ประกอบด้วยโครโมโซมทุกขนาด (ใหญ่ กลาง และเล็ก) โดยมีโครโมโซมร่างกายชนิดเมทาเซนทริกขนาดใหญ่ กลาง และเล็ก เท่ากับ 6-4-8 แท่ง ตามลำดับ ชนิดซับเมทาเซนทริกขนาดใหญ่ กลาง และเล็ก เท่ากับ 8-12-2 แท่ง ตามลำดับ อิดิโอแกรม (idiogram) ของลิงกังแสดงให้เห็นถึงการค่อยๆ ลดขนาดของโครโมโซมร่างกายลง จากขนาดใหญ่ไปขนาดเล็ก แสดงไว้ดังภาพที่ 3



ภาพที่ 3 อิดิโอแกรมของลิงกัง 2n เท่ากับ 42 แท่ง จากโครโมโซมระยะเมทาเฟส ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา โครโมโซมคู่ที่ 13 แสดง satellite chromosome

ลิงกังมีโครโมโซมเอ็กซ์เป็นชนิดซั่มเมทาเซนทริกขนาดกลาง และมีโครโมโซมวายเป็นชนิดเทโลเซนทริกขนาดเล็กมากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับลิงที่อยู่ในสกุล *Macaca* พบว่า ชิอาเรลลี (Chiarelli, 1962) รายงานว่า ลิงเสน มีโครโมโซมเอ็กซ์เป็นชนิดซั่มเมทาเซนทริก และโครโมโซมวายเป็นชนิดซั่มเมทาเซนทริก ฮีไรและคณะ (Hirai et al., 1991) รายงานว่า ลิงแสมมีโครโมโซมเอ็กซ์เป็นชนิดเมทาเซนทริกขนาดกลาง และโครโมโซมวายเป็นชนิดเทโลเซนทริกขนาดเล็กที่สุด นาเปียและนาเปีย (Napier and Napier, 1976) สมอลล์และสแตนยอน (Small and Stanyon, 1985) รายงานว่า ลิงวอกมีโครโมโซมเอ็กซ์เป็นชนิดเมทาเซนทริกขนาดกลาง และโครโมโซมวายเป็นชนิดเมทาเซนทริกขนาดเล็กที่สุด

จากรายงานการศึกษายังแสดงให้เห็นว่าโครโมโซมเพศของลิงสกุล *Macaca* มีความแปรผันทั้งรูปร่างและขนาดที่แตกต่างกัน โดยโครโมโซมเอ็กซ์เป็นชนิดเมทาเซนทริกหรือซั่มเมทาเซนทริก โครโมโซมวายเป็นชนิดเมทาเซนทริก ซั่มเมทาเซนทริก หรือเทโลเซนทริก ดังรายงานการศึกษาของ บราวน์และคณะ (Brown et al., 1986) ซึ่งพบว่า ลิงสกุล *Macaca* ได้แก่ ลิงเสน ลิงแสม ลิงวอก ลิงกัง ลิง *celebes macaque* และลิง *bonnet macaque* มีความแปรผันของโครโมโซมเอ็กซ์ และโครโมโซมวาย นาเปียและนาเปีย (Napier and Napier, 1976) พบว่าโครโมโซมวายของลิงสกุล *Macaca* มีขนาดเล็กมากและมีรูปร่างแตกต่างกัน บางครั้งไม่สามารถบอกตำแหน่งของเซนโทรเมียร์ (centromere) และจำแนกชนิดของโครโมโซมได้ชัดเจน ฮีไรและคณะ (Hirai et al., 1991) พบว่า โครโมโซมวายของลิงสกุล *Macaca* มีความแปรผันทั้งขนาดและรูปร่าง ซึ่งพบได้ในลิงวอก ลิงกัง ลิงญี่ปุ่น (*Japanese macaque, M. fuscata*) และลิงไต้หวัน (*Taiwanese macaque, M. cyclopis*) สแตนยอนและคณะ (Stanyon et al., 1983) รายงานความแตกต่างในการติดแถบสีซี (C-band) ของโครโมโซมวายในลิงสกุล *Macaca* และลิงสกุล *Cercocebus* ได้แก่ ลิงญี่ปุ่น และลิง *black mangabey (Cercocebus aterrimus or Lophocebus aterrimus)* นอกจากนี้ มาคิโนและทากากิ (Makino and Takagi, 1965) ศึกษาความแปรผันของโครโมโซมวายในมนุษย์พบว่า เป็นโครโมโซมชนิดอะโครเซนทริก ที่มีขนาดความยาวผันแปรในแต่ละบุคคล

ในการศึกษาครั้งนี้พบโครโมโซมเครื่องหมาย (chromosome marker) ของลิงกัง คือ มี nucleolar organizer region (NORs) อยู่บนแขนข้างสั้นของโครโมโซมร่างกายชนิดเมทาเซนทริกคู่ที่ 13 เพียงคู่เดียวเมื่อทำการเปรียบเทียบกับลิงที่อยู่ในวงศ์ย่อย Cercopithecinae พบว่า บราวน์และคณะ (Brown et al., 1986) รายงานว่า ลิงวอกธรรมดา ลิงแสม ลิงเสน ลิง *celebes macaque* ลิง *bonnet macaque* และลิง *sooty mangabey* พบ NORs บนแขนข้างสั้นของโครโมโซมร่างกายคู่ที่ 9 เพียงคู่เดียว สำหรับคู่ของ NORs ที่มีความแตกต่างกันเนื่องมาจากวิธีการจัดคาร์ิโอไทป์ ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ยึดหลักการของ นาชและโอไบรอัน (Nash and O'Brien, 1987) วาดะและคณะ (Wada et al., 1991) ที่ได้รายงานการจัดคาร์ิโอไทป์โดยเรียงลำดับจากโครโมโซมขนาดใหญ่ที่สุดไปยังเล็กสุด โดยไม่ยึดว่าเป็นโครโมโซมชนิดใด และวางโครโมโซมเพศไว้มุมล่างขวาสุด

จากรายงานของ โจนส์และคณะ (Jones et al., 1994) พบว่า ลิงสกุล *Macaca* ลิงบาบูน (*baboon*) และชะนี มี NORs บนโครโมโซมร่างกาย 1 คู่ รายงานของ สแตนยอนและคณะ (Stanyon et al., 1983) พบ NORs อยู่บนแขนข้างสั้นของโครโมโซม 1 คู่ คือ คู่ที่ 13 ในลิงญี่ปุ่น ลิง *black mangabey* ซึ่งเป็นลิงในวงศ์เดียวกัน แต่มีขนาดของ NORs แตกต่างกันเมื่อตรวจดูเซลล์ระยะเมทาเฟสของลิงสกุล *Macaca* ในประเทศไทย จะสังเกตเห็นโครโมโซมเครื่องหมาย คือ โครโมโซมคู่ที่ 1 เป็นชนิดเมทาเซนทริกขนาดใหญ่ที่สุดเห็นได้อย่างเด่นชัด นอกจากนี้โครโมโซมวายเป็นโครโมโซมเครื่องหมายที่สามารถจำแนกชนิดของลิงในสกุล *Macaca* ออกจากกันได้ สอดคล้องกับรายงานการศึกษาของ นาเปียและนาเปีย (Napier and Napier, 1976) สมอลล์และสแตนยอน (Small and Stanyon, 1985) บราวน์และคณะ (Brown et al., 1986) ฮีไรและคณะ (Hirai et al., 1991)

จากการนำเซลล์ที่อยู่ในระยะเมทาเฟสของลิงกังเพศผู้และเพศเมียอย่างละ 20 เซลล์ มาทำการวัดขนาดของโครโมโซมที่มีหน่วยเป็นเซนติเมตร พบว่าโครโมโซมของลิงกังมีค่าเฉลี่ยความยาวของแขนโครโมโซมข้างสั้น (Ls) ความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาว (Li) ความยาวของโครโมโซมแต่ละคู่ (LT) ค่า relative length (RL) ค่า centromeric index (CI) ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ของค่า RL และ CI และทำการกำหนดขนาดและชนิด

ของโครโมโซม แสดงไว้ดังตารางที่ 1 สูตรคาร์ิโอไทป์ของลิงกังเพศผู้และเพศเมีย ดังนี้

$$\text{ลิงกังเพศผู้ } 2n (42) = L_6^m + L_8^{sm} + M_4^m + M_{13}^{sm} + S_8^m + S_2^{sm} + S_1^t$$

$$\text{ลิงกังเพศเมีย } 2n (42) = L_6^m + L_8^{sm} + M_4^m + M_{14}^{sm} + S_8^m + S_2^{sm}$$

ตารางที่ 1 ค่าเฉลี่ยความยาวของแขนโครโมโซมข้างสั้น (length short; Ls) ความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาว (length long; Ll) ความยาวทั้งหมดของโครโมโซมแต่ละคู่ (length total; LT) ค่า relative length (RL) ค่า centromeric index (CI) ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) ของ RL และ CI จากเซลล์ระยะเมทาเฟส (กำลังขยาย 3,800 เท่า) เพศผู้และเพศเมียเพศละ 20 เซลล์ ของลิงกัง 2n เท่ากับ 42

โครโมโซม คู่ที่	Ls	Ll	LT	RL±SD	CI±SD	ขนาดของ โครโมโซม	ชนิดของ โครโมโซม
1	0.785	1.133	1.918	0.075±0.003	0.591±0.026	L	m
2	0.580	1.050	1.631	0.064±0.003	0.644±0.024	L	sm
3	0.563	1.020	1.583	0.062±0.003	0.644±0.011	L	sm
4	0.669	0.855	1.525	0.060±0.003	0.561±0.016	L	m
5	0.478	1.018	1.496	0.058±0.003	0.680±0.029	L	sm
6	0.503	0.916	1.419	0.055±0.002	0.646±0.025	L	sm
7	0.560	0.839	1.399	0.055±0.002	0.600±0.018	L	m
8	0.475	0.751	1.225	0.048±0.004	0.613±0.021	M	sm
9	0.447	0.765	1.212	0.047±0.002	0.631±0.020	M	sm
10	0.394	0.816	1.210	0.047±0.002	0.674±0.016	M	sm
11	0.397	0.790	1.187	0.046±0.003	0.666±0.016	M	sm
12	0.521	0.589	1.110	0.043±0.004	0.530±0.014	M	m
13	0.522	0.580	1.102	0.043±0.003	0.526±0.015	M	m
14	0.343	0.751	1.094	0.043±0.003	0.686±0.020	M	sm
15	0.320	0.743	1.063	0.042±0.005	0.699±0.010	M	sm
16	0.445	0.482	0.926	0.036±0.002	0.520±0.014	S	m
17	0.324	0.559	0.883	0.034±0.004	0.633±0.018	S	sm
18	0.352	0.380	0.732	0.029±0.004	0.520±0.011	S	m
19	0.343	0.363	0.706	0.028±0.004	0.514±0.014	S	m
20	0.308	0.395	0.703	0.027±0.003	0.563±0.015	S	m
X	0.457	0.751	1.208	0.047±0.004	0.622±0.014	M	sm
Y	0.000	0.269	0.269	0.011±0.006	1.000±0.000	S	t

หมายเหตุ: L = โครโมโซมขนาดใหญ่, M = โครโมโซมขนาดกลาง, S = โครโมโซมขนาดเล็ก, m = โครโมโซมชนิดเมทาเซนทริก,

sm = โครโมโซมชนิดซับเมทาเซนทริก, t = โครโมโซมชนิดเทโลเซนทริก

โครโมโซมขนาดใหญ่มีค่า LT มากกว่า 1.310

โครโมโซมขนาดกลางมีค่า LT น้อยกว่า 1.310 และมากกว่า 0.959

โครโมโซมขนาดเล็กมีค่า LT น้อยกว่า 0.959

สรุปผลการศึกษา

ลิงกังมีจำนวนโครโมโซม $2n$ เท่ากับ 42 แท่ง มีจำนวนโครโมโซมพื้นฐานเท่ากับ 83 ในเพศผู้และ 84 ในเพศเมีย โครโมโซมร่างกายประกอบด้วยโครโมโซมชนิดเมทาเซนทริกขนาดใหญ่ 6 แท่ง ซับเมทาเซนทริกขนาดใหญ่ 8 แท่ง เมทาเซนทริกขนาดกลาง 4 แท่ง ซับเมทาเซนทริกขนาดกลาง 12 แท่ง เมทาเซนทริกขนาดเล็ก 8 แท่ง และซับเมทาเซนทริกขนาดเล็ก 2 แท่ง โครโมโซมคู่อีกรวม 13 จัดเป็น satellite chromosome โครโมโซมเอ็กซ์เป็นชนิดซับเมทาเซนทริกขนาดกลาง และโครโมโซมวายเป็นชนิดเทโลเซนทริกขนาดเล็กมากที่สุด

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้ทำการวิจัยขอขอบคุณองค์การสวนสัตว์ในพระบรมราชูปถัมภ์ที่สนับสนุนเงินทุนสำหรับการศึกษา ในครั้งนี้ ขอขอบคุณท่านผู้อำนวยการองค์การสวนสัตว์ นายโสภณ ดำนุ้ย และผู้อำนวยการสวนสัตว์นครราชสีมา นาวาอากาศโทกระวี กรีทาพล ที่ได้อนุญาตทำการเจาะเก็บตัวอย่างเลือดลิงกัง ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่และพนักงาน สวนสัตว์ทุกท่าน ที่ช่วยให้การศึกษาในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- กันยารัตน์ ไชยสุด. (2532). *เซลล์พันธุศาสตร์และเซลล์อนุกรมวิธานของพืชสกุล Zephyranthes*. กรุงเทพฯ: ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- บรอดเคลแมน, วรเรน. (2524). *สัตว์จำพวกลิงในประเทศไทย*. (นัยพินิจ คชภักดี, ผู้แปล). กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์คุรุสภาลาดพร้าว.
- พาร์, จอห์น. (2546). *สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมในประเทศไทย*. (ธีรภัทร ประยูรสิทธิ, ผู้แปล). กรุงเทพฯ: สารคดี.
- อมรา คัมภีรานนท์. (2540). *พันธุศาสตร์ของเซลล์*. กรุงเทพฯ: ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- Brown, C. J., Dunbar, V. G., & Shafer, D. A. (1986). A comparison of the karyotypes of six species of the genus *Macaca* and a species of the genus *Cercocebus*. *Folia Primatologica*, 46, 164–172.
- Caballin, M. R., Miro, R., Ponsa, M., Florit, F., Massa, C., & Egozcue, J. (1980). Banding patterns of the chromosomes of *Cercopithecus petaurista* (Schreber, 1775): comparison with other primate species. *Folia Primatologica*, 34, 278–285.
- Chiarelli, B. (1962). Comparative and morphometric analysis of primate chromosomes: the chromosomes of genera *Macaca*, *Papio*, *Theropithecus* and *Cercocebus*. *Caryologia*, 15, 401–420.
- Groves, C. (2001). *Primate taxonomy*. Washington, DC: Smithsonian Institution Press.
- Hirai, S., Terao, K., Cho, F., & Honjo, S. (1991). Chromosome studies on cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *Primate Today*, 24, 619–622.
- Hsu, T. C., & Benirschke, K. (1967). *An atlas of mammalian chromosomes*. New York: Springer-Verlag Press.
- Jones, S., Martin, R., & Pilbeam, D. (1994). *The Cambridge encyclopedia of human evolution*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Lekagul, B., & McNeely, J. A. (1977). *Mammals of Thailand*. Bangkok, Thailand: Kurusapha Ladprao Press.
- Lekagul, B., & McNeely, J. A. (1988). *Mammals of Thailand* (2nd ed.). Bangkok, Thailand: Sahakam Bhaet.
- Makino, S., & Takagi, N. (1965). Some morphological aspects of the abnormal human Y chromosome. *Cytologia*, 30, 274–291.

- Napier, J. R., & Napier, P. H. (1976). *A handbook of living primates*. New York: Wiley.
- Nash, W. G., & O'Brien, S. J. (1987). A comparative chromosome banding analysis of Ursidae and their relationship to other carnivores. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 45, 206-212.
- Rowe, N. (1996). *The pictorial guide to the living primates*. Charlestown, RI: Pogonias Press.
- Small, M. F., & Stanyon, R. (1985). High-resolution chromosome of rhesus macaques (*Macaca mulatta*). *American Journal of Primatology*, 9, 63-67.
- Stanyon, R., Ardito, G., Lamberti, L., & Bigatti, P. (1983). The banded karyotype of *Macaca fuscata* compared with *Cercocebus aterrimus*. *Folia Primatologica*, 41, 137-146.
- Wada, M. Y., Lim, Y., & Wurster-Hill, D. H. (1991). Banded karyotype of wild caught male Korean raccoon dog, *Nyctereutes procyonoides koreensis*. *Genome*, 34, 302-306.
- Wilson, D. E., & Cole, F. R. (2000). *Common names of mammals of the world*. Washington, DC: Smithsonian Institution Press.