นิพนธ์ต้นฉบับ

การศึกษาคาริโอไทป์ของอีเห็นเครือ (*Paguma lavata*) ด้วยเทคนิคการย้อมสีแบบธรรมดา และแถบสีแบบจี

อลงกลด แทนออมทอง[1] วิวรรธน์ แก่นสา[2] และ เรืองวิทย์ บรรจงรัตน์[3]

Abstract

Tanomtong, A.[1], Kaensa, W.[1] and Bunjongrat, R.[2]

A study on karyotype of masked palm civet (*Paguma lavata*) by conventional staining and G-banding method

Songklanakarin J. Sci. Technol., 2006, 28(4) : 753-764

This is a karyotypic study of the masked palm civet, *Paguma lavata* (Carnivora, Viverridae). Blood samples were taken from one male and two females kept in Khao Khiew Open Zoo. After the standard whole blood lymphocyte culture at 37ºC for 72 h. in presence of colchicine, metaphase spreads were prepared on microscopic slides and air-dried. Conventional staining and G-banding method were applied to stain the chromosome. The results showed that the number of diploid chromosomes of masked palm civet was 2n = 44, the fundamental number (NF) was 72 in the male and female. The type of autosomes were 2 large metacentric, 6 large submetacentric, 6 large acrocentric, 2 large telocentric, 2 medium metacentric, 2 medium submetacentric, 2 medium acrocentric, 8 medium telocentric, 2 small metacentric, 2 small submetacentric, 2 small acrocentric and 6 small telocentric chromosomes. In addition, there was a pair of chromosome 17

[1]Genetics Program, Department of Biology, Faculty of Science, Khon Kaen University, Muang, Khon Kaen 40002, Thailand. [2]Genetics Program, Department of Botany, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Phayathai, Bangkok 10330, Thailand.

[1]วท.ม.(พันธุศาสตร์) ผู้ช่วยศาสตราจารย์ [2]นักศึกษาหลักสูตร วท.ม. สาขาพันธุศาสตร์ ภาควิชาชีวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น 40002 [3]วท.ม.(พันธุศาสตร์), ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สาขาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พญาไท กรุงเทพฯ 10330

Corresponding e-mail: tanomtong@hotmail.com

รับต้นฉบับ 2 พฤศจิกายน 2548 รับลงพิมพ์ 20 ธันวาคม 2548

with clearly observable satellite chromosome. X-chromosome is a large submetacentric and Y chromosome is the smallest submetacentric chromosome. From the G-banding technique, the number of bands and locations of G-band in masked palm civet was 141 and each chromosome pair could be clearly differentiated. The karyotype formula for the male and female masked palm civet is as follows:

$$2n\ (44) = L^m_2+L^{sm}_6+L^a_6+L^t_2+M^m_2+M^{sm}_2+M^a_2+M^t_8+S^m_2+S^{sm}_2+S^a_2+S^t_6 + \text{Sex-chromosome}$$

Key words : karyotype, masked palm civet (*Paguma lavata*), conventional staining, G-banding

บทคัดย่อ

อลงกลด แทนออมทอง วิวรรธน์ แก่นสา และ เรืองวิทย์ บรรจงรัตน์

การศึกษาคาริโอไทป์ของอีเห็นเครือ (*Paguma lavata*) ด้วยเทคนิคการย้อมสีแบบธรรมดาและแถบสีแบบจี

ว. สงขลานครินทร์ วทท. 2549 28(4) : 753-764

การศึกษาคาริโอไทป์ของอีเห็นเครือ ใช้ตัวอย่างสัตว์เพศผู้ 1 ตัว และเพศเมีย 2 ตัว จากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว เตรียมโครโมโซมด้วยการเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 72 ชม. เก็บเกี่ยวเซลล์ด้วยเทคนิคโคลชิซิน-ไฮโปโทนิค-ฟิกเซชั่น-แอร์ดาร์ยอิง ย้อมสีโครโมโซมด้วยเทคนิคการย้อมสีแบบธรรมดาและการย้อมแถบสีแบบจี ผลการศึกษาพบว่าอีเห็นเครือมีจำนวนโครโมโซม 2n (diploid) เท่ากับ 44 แท่ง มีจำนวนโครโมโซมพื้นฐาน (NF) เท่ากับ 72 ในเพศเมียและเพศผู้ โครโมโซมร่างกายประกอบด้วยโครโมโซมชนิดเมทาเซนทริกขนาดใหญ่ 2 แท่ง ซับเมทาเซนทริกขนาดใหญ่ 6 แท่ง อะโครเซนทริกขนาดใหญ่ 6 แท่ง เทโลเซนทริกขนาดใหญ่ 2 แท่ง เมทาเซนทริกขนาดกลาง 2 แท่ง ซับเมทาเซนทริกขนาดกลาง 2 แท่ง อะโครเซนทริกขนาดกลาง 2 แท่ง เทโลเซนทริกขนาดกลาง 8 แท่ง เมทาเซนทริกขนาดเล็ก 2 แท่ง ซับเมทาเซนทริกขนาดเล็ก 2 แท่ง อะโครเซนทริกขนาดเล็ก 2 แท่ง เทโลเซนทริกขนาดเล็ก 6 แท่ง โครโมโซมคู่ที่ 17 จัดเป็น satellite chromosome โครโมโซมเอ็กซ์เป็นชนิดซับเมทาเซนทริกขนาดใหญ่ และโครโมโซมวายเป็นชนิดซับเมทาเซนทริกขนาดเล็กมากที่สุด การย้อมสีโครโมโซมแบบแถบสีจี พบว่าอีเห็นเครือมีจำนวนแถบสีที่เกิดขึ้นทั้งหมด 141 แถบสี และสามารถที่จะแยกความแตกต่างของโครโมโซมแต่ละคู่ได้อย่างชัดเจน อีเห็นเครือมีสูตรคาริโอไทป์ ดังต่อไปนี้

$$2n\ (44) = L^m_2+L^{sm}_6+L^a_6+L^t_2+M^m_2+M^{sm}_2+M^a_2+M^t_8+S^m_2+S^{sm}_2+S^a_2+S^t_6 + \text{โครโมโซมเพศ}$$

Wilson และ Cole (2000) รายงานว่าสัตว์กินเนื้อทั่วโลกมีอยู่ 11 วงศ์ 23 วงศ์ย่อย 129 สกุล 271 ชนิด Hickman และ Robert (1994) ยังรายงานว่าสัตว์ที่อยู่ในอันดับกินเนื้อที่มีอยู่ 11 วงศ์ ได้แก่ วงศ์สุนัข วงศ์หมี วงศ์แรคคูนและสัตว์ที่ใกล้เคียง วงศ์อีเห็น ชะมด หมีขอ วงศ์ไฮยีนา วงศ์เสือ แมว วงศ์พังพอน วงศ์วีซึล แบดเจอร์ สะคัง นาก วงศ์วอลรัส วงศ์สิงโตทะเล และวงศ์แมวน้ำ

สัตว์ในวงศ์อีเห็น ชะมด และหมีขอ (Viverridae) ทั่วโลกมีอยู่ทั้งสิ้น 6 วงศ์ย่อย 20 สกุล และ 38 ชนิด (Wilson and Cole, 2000) สำหรับในประเทศไทยพบทั้งหมด 3 วงศ์ย่อย 9 สกุล และ 11 ชนิด ได้แก่ วงศ์ย่อย Paradoxurinae ประกอบด้วย หมีขอหรือบินตุรง (binturong, *Arctictis binturong*) อีเห็นข้างลายหรืออีเห็นธรรมดา (Asian palm civet, *Paradoxurus hermaphroditus*) อีเห็นเครือ (masked palm civet, *Paguma lavata*) อีเห็นหน้าขาวหูด่าง (small-toothed palm civet, *Arctogalidia trivirgata*) วงศ์ย่อย Viverrinae ประกอบด้วยชะมดแปลงลายแถบ (banded linsang, *Prionodon linsang*) ชะมดแปลงลายจุด (spotted linsang, *Prionodon pardiccolor*) ชะมดแผงสันหางดำ (large-spotted civet, *Viverra megaspila*) ชะมดแผงหางปล้อง (large Indian civet, *Viverra zibetha*) และชะมดเช็ด (small

Indian civet, *Viverricular indica*) และวงศ์ย่อย Hemigalinae ประกอบด้วย อีเห็นน้ำ (otter civet, *Cynogale bennettii*) และอีเห็นลายลาด (banded palm civet, *Hemigalus derbyanus*) (สมชาย, 2540; โอภาส, 2541; Lekagul and McNeely, 1977, 1988; Wilson and Cole, 2000)

Lekagul และ McNeely (1977, 1988) รายงานว่าอีเห็นเครือทั่วโลกมีทั้งหมด 14 ชนิดย่อย สำหรับในประเทศไทยพบได้ 2 ชนิดย่อย ได้แก่ *Paguma lavata robusta* และ *Paguma lavata intrudens* อีเห็นเครือมีขนาดที่ค่อนข้างใหญ่กว่าอีเห็นชนิดอื่นๆ มีม่านตาเป็นสีน้ำตาลแกมแดง อีเห็นเครือมีสีสันผันแปรมาก บางตัวมีสีค่อนข้างขาว บางตัวมีสีน้ำตาลไหม้ บางตัวมีหน้าสีขาวนวล ไม่มีจุดหรือแถบสีดำตามลำตัว แต่บางตัวมีสีน้ำตาลที่รอบๆ ขอบตา มีหนวดเป็นเส้นยาวสีขาวบริเวณปากและแก้ม หลังหูและหลังคอมักมีสีเข้ม ตัวผู้มักมีขนาดใหญ่กว่าตัวเมียเล็กน้อย ความยาวลำตัวและหัว 50-76 ซม. ความยาวหาง 50-63 ซม. น้ำหนักตัวประมาณ 3-5 กก. พบอยู่ได้หลายสภาพตั้งแต่ชายป่าใกล้บ้านมนุษย์จนถึงป่าดงดิบ ออกหากินเวลากลางคืน พบบนต้นไม้มากกว่าบนพื้นดิน กินอาหารได้ทั้งพืชและสัตว์ ได้แก่ ผลสุกของพวกไทร มะเดื่อ นก แมลง ซากสัตว์ เป็นต้น ตั้งท้องนานประมาณ 60 วัน ออกลูกครั้งละ 2-4 ตัว อายุยืนประมาณ 15 ปี ในสภาพกรงเลี้ยง (Lekagul and McNeely, 1977, 1988)

จากการตรวจสอบเอกสารการศึกษา พบว่า มีรายงานการศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ของสัตว์ที่อยู่ในวงศ์ย่อย Paradoxurinae คือ อีเห็นเครือ อีเห็นธรรมดา และหมีขอ ดังรายงานการศึกษาของ Ray-Chaudhuri และคณะ (1966); Wurster และ Benirschke (1967, 1968); Wada และคณะ (1983); Wang และคณะ (1984); Masashi และ Harumi (1993) (Table 1) สำหรับในประเทศไทยยังไม่มีรายงานการศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ของอีเห็นเครือมาก่อน จึงควรที่จะต้องมีการศึกษาเพื่อทำการเปรียบเทียบกับรายงานการศึกษาที่มีมาก่อนหน้านี้ การศึกษาในครั้งนี้ใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาว การย้อมสีโครโมโซมแบบธรรมดาและแถบสีแบบจี ผลจากการศึกษาจะทำให้ได้ข้อมูลพื้นฐานทางด้านพันธุศาสตร์เซลล์ของอีเห็นเครือในประเทศไทย เพื่อที่จะนำไปใช้ในการเปรียบเทียบความสัมพันธ์ทางโครโมโซมของสัตว์ในวงศ์อีเห็น ชะมด และหมีขอ ในประเทศไทยต่อไปในอนาคต

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

ตัวอย่างเลือดที่ใช้ในการศึกษา ได้จากอีเห็นเครือ

Table 1. Karyotypic studies of animal species in the subfamily Paradoxurinae (Carnivora, Viverridae).

Species	2n	NF	m+sm	a+sa	t+st	X	Y	Reference
Binturong (*Arctictis binturong*)	42	66 in male and female	22	18	-	m(M)	m(S)	Wurster and Benitrschke (1967, 1968)
Asian palm civet (*Paradoxurus hermaphroditus*)	42	-	20	-	20	m(M)	sm(S)	Ray-Chaudhuri *et al*. (1966)
	42	66 in male and female	22	18	-	m(M)	- (S)	Wurster and Benitrschke (1967, 1968)
Masked palm civet (*Paguma lavata*)	44	-	-	-	-	-	-	Wada *et al*. (1983)
	44	68 in male and female	22	20	-	m(M)	sm(S)	Wurster and Benitrschke (1967, 1968)
	44	69 in male 68 in female	24	18	-	m(-)	a(-)	Wang *et al*. (1984)
	44	66 in male and female	8	18	16	m(-)	m(-)	Masashi and Harumi (1993)

Remark : 2n = diploid number, NF = fundamental number, m = metacentric, sm =submetacentric, a = acrocentric, sa = subacrocentric, t = telocentric, st = subtelocentric, X = X-chromosome, Y = Y-chromosome, M = medium chromosome and S = small chromosome

เพศผู้ 1 ตัว และเพศเมีย 2 ตัว ที่เลี้ยงอยู่ในสวนสัตว์เปิดเขาเขียว ทำการเจาะเก็บเลือดโดยใช้เทคนิคปราศจากเชื้อ (aseptic technique) จากหลอดเลือดดำบริเวณลำคอ (jugular vein) เก็บในหลอดสุญญากาศ (vacuum tube) ขนาด 10 มล. ที่บรรจุสาร heparin เพื่อป้องกันการแข็งตัวของเลือด แล้วทำการแช่ในกระติกน้ำแข็งตลอดการเดินทางจนถึงห้องปฏิบัติการ การดำเนินการทดลองแบ่งออกได้เป็น 2 ส่วน คือ

1. การเตรียมเซลล์

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด T-lymphocyte ที่ดัดแปลงมาจากวิธีการในมนุษย์ของ อมรา (2540) ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวจากเลือดปริมาณน้อย (whole blood microculture)

1.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์

1) เตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด RPMI 1640 ที่มีสารกระตุ้นการแบ่งเซลล์ (mitogen) คือ PHA (phytohemagglutinin) ความเข้มข้น 2% นำ stock อาหารแบ่งลงในขวดอาหารเลี้ยงเม็ดเลือดขาวขวดละ 5 มล.

2) นำเลือดอีเห็นเครือจำนวน 0.5 มล. หยดลงในขวดเพาะเลี้ยง เขย่าให้สารละลายและเลือดเข้ากัน ปิดฝาขวดหลวมๆ นำไปบ่มในตู้อบ (incubator) ที่อุณหภูมิ 37ºC ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% และทำการเขย่าเลือดทุกเช้าและทุกเย็น

3) เมื่อครบเวลาเก็บเกี่ยวเซลล์คือ ชั่วโมงที่ 72 ทำการหยดสารละลาย Colchicine เขย่าเบาๆ ให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มต่ออีก 30 นาที

1.2 การเก็บเกี่ยวเซลล์

1) ทำการย้ายสารละลายเลือดจากขวดเพาะเลี้ยงเลือดลงในหลอดปั่นเหวี่ยง (graduated centrifuge) ขนาด 12 มล. นำมาปั่นเหวี่ยงที่ 1,200 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วทำการดูดส่วนใส (supernatant) ทิ้ง

2) ทำให้เซลล์พองตัว เพื่อที่โครโมโซมจะมีการกระจายตัวดี โดยทำการหยด 0.075 M KCl ที่เป็น hypotonic solution จำนวน 10 มล. ลงในตะกอนเซลล์ ทำการผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixture แล้วบ่มต่อไปอีก 30 นาที

3) เมื่อครบกำหนดทำการแยกเอา KCl ออก โดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1,200 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วทำการดูดส่วนใสทิ้ง

4) ทำการตรึงเซลล์ (fix) โดยการเติมน้ำยาตรึงเซลล์ที่แช่เย็นและเตรียมใหม่เสมอ (fresh cold fixative) ที่มีอัตราส่วนของ methanol : glacial acetic acid เป็น 3 : 1 ใช้หลอดหยด หยดน้ำยาตรึงเซลล์ทีละหยดพร้อมกับผสมเซลล์ให้เข้ากับสารละลายด้วย vortex mixture เติมจนได้ปริมาตรประมาณ 8 มล. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1,200 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ทำการดูดส่วนน้ำยาตรึงเซลล์ด้านบนทิ้ง

5) ทำซ้ำในข้อ 4 อีก โดยค่อยๆ ลดปริมาตรน้ำยาตรึงเซลล์ที่ใช้แต่ละครั้งลง จำนวนครั้งขึ้นอยู่กับความใสของสารละลาย ทำซ้ำจนได้สารละลายที่ใสและมีตะกอนเซลล์ที่ก้นหลอด ทำการดูดสารละลายด้านบนทิ้งจนเกือบหมด แล้วทำการเติมน้ำยาตรึงเซลล์ลงไปอีก 1 มล. ทำการผสมให้เข้ากัน

6) ใช้ micropipette ดูดสารละลายตะกอนเซลล์เม็ดเลือดขาวปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงบนสไลด์ที่สะอาดและเย็นจัด ทำการผึ่งสไลด์ให้แห้ง (air dry technique)

7) ย้อมสีโครโมโซมแบบธรรมดา (conventional staining) ด้วยสี Giemsa's 10% เป็นเวลา 15 นาที ทำการล้างสีออกด้วยน้ำประปา ผึ่งสไลด์ให้แห้ง แล้วนำไปศึกษาต่อด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงชนิดถ่ายรูปได้

2. การตรวจสอบโครโมโซม

ทำการคัดเลือกเซลล์ที่มีการแบ่งเซลล์ระยะเมทาเฟส (metaphase) ที่มีโครโมโซมไม่สั้นหรือยาวเกินไป และมีการกระจายตัวของโครโมโซมไม่ซ้อนทับกัน ถ่ายภาพโครโมโซมอีเห็นเครือเพศผู้และเพศเมียอย่างละ 20 เซลล์ นำภาพมาขยายที่ 3,800 เท่า ศึกษาโครโมโซมตามแบบของ กันยารัตน์ (2532) โดยใช้เวอร์เนียร์วัดความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาว (length long, Ll) ข้างสั้น (length short, Ls) ทำการคำนวณหาค่าความยาวของโครโมโซมแต่ละแท่ง (length total, LT) ค่า relative length (RL) และค่า centromeric index (CI) แล้วนำค่า Ll, Ls, LT, RL และ CI ของโครโมโซมทั้ง 20 เซลล์ มาหาค่าเฉลี่ย

(mean) นำค่า RL มาหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD)

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

ค่า relative length (RL) = LT/ความยาวของโครโมโซมทุกคู่ (ΣLT)

ค่า centromeric index (CI) = Ll /LT

การจับคู่ของโครโมโซมยึดหลัก ดังต่อไปนี้

1. ทำการจับคู่ของโครโมโซม โดยดูจากความยาวและตำแหน่งของเซนโทรเมียร์ (centromere) ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกัน กำหนดหมายเลขโครโมโซมแต่ละแท่ง

2. วัดความยาวของโครโมโซมแต่ละแท่งจากภาพถ่าย

3. กำหนดชนิดของโครโมโซมจากค่า CI ดังต่อไปนี้

ค่า CI	ชนิดของโครโมโซม
0.500-0.599	เมทาเซนทริก
0.600-0.699	ซับเมทาเซนทริก
0.700-0.899	อะโครเซนทริก
0.900-1.000	เทโลเซนทริก

4. กำหนดขนาดของโครโมโซม โดยกำหนดให้โครโมโซมคู่ที่ 1 เป็นโครโมโซมคู่ใหญ่สุด (large, L) โครโมโซมขนาดกลาง (medium, M) คือ โครโมโซมที่มีความยาวน้อยกว่าครึ่งหนึ่งของความยาวเฉลี่ยของโครโมโซมคู่ใหญ่สุดรวมกับโครโมโซมคู่เล็กสุด และโครโมโซมขนาดเล็ก (small, S) คือ โครโมโซมที่มีค่าความยาวน้อยกว่าครึ่งหนึ่งของความยาวเฉลี่ยของโครโมโซมคู่ที่ใหญ่สุด

โครโมโซมขนาดใหญ่ (L) = โครโมโซมคู่ที่ 1

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

โครโมโซมขนาดเล็ก (S) < LT เฉลี่ยคู่ที่ 1 / 2

3. การย้อมสีโครโมโซมแบบแถบสีจี

การย้อมสีโครโมโซมแบบแถบสีจี ดัดแปลงมาจากวิธีการในมนุษย์ของ อมรา (2540) ดังนี้

1) นำสไลด์ที่ต้องการย้อมมาทำให้แห้ง โดยใส่ในโถดูดความชื้น ทิ้งไว้ประมาณ 8-10 วัน หรืออบสไลด์ที่ความร้อน 70ºC เป็นระยะเวลา 24 ชม.

2) ทำการเตรียม trypsin EDTA ที่ความเข้มข้น 0.025%

3) นำสไลด์ที่แห้งมาแช่ในสารละลาย working trypsin ที่อุ่นใน water bath อุณหภูมิ 37ºC ในระยะเวลาที่เหมาะสม

4) หยุดการทำงานของ trypsin โดยใช้ 10% fetal calf serum (FCS) หรือ phosphase buffer ล้างสไลด์ให้ทั่ว

5) ล้าง FCS ด้วย methanol 50% จนทั่วสไลด์

6) ย้อมสีจิมซ่า 10% ประมาณ 20-30 นาที ทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วนำไปตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

ผลและวิจารณ์การศึกษา

การศึกษาคาริโอไทป์ของสัตว์มีรูปแบบการจัดคาริโอไทป์หลายรูปแบบ ซึ่งจะขึ้นอยู่กับความเหมาะสมและความสะดวก ดังรายงานของ Ray-Chaudhuri และคณะ (1966) ทำการจัดคาริโอไทป์ของอีเห็นข้างลายโดยเรียงลำดับของโครโมโซมตามชนิด จากโครโมโซมชนิดเมทาเซนทริก ซับเมทาเซนทริก ซับเทโลเซนทริก และเทโลเซนทริก และภายในชนิดเดียวกันก็เรียงจากขนาดใหญ่ไปยังขนาดเล็กสุด และวางโครโมโซมเพศไว้มุมล่างขวาสุดของภาพ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Fredga (1972) ที่ได้ศึกษาคาริโอไทป์ของพังพอน แต่สำหรับในรายงานของ Wurster และ Benirschke (1968) ทำการจัดคาริโอไทป์ของสัตว์อันดับกินเนื้อออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มแรกจะเรียงโครโมโซมจากขนาดใหญ่ไปเล็ก ของโครโมโซมชนิดเมเทาเซนทริกและซับเมทาเซนทริก กลุ่มที่สองจะเรียงโครโมโซมจากขนาดใหญ่ไปเล็กของโครโมโซมชนิดซับอะโครเซนทริกและอะโครเซนทริก สำหรับ satellite chromosome จะวางไว้มุมบนขวาสุด และวางโครโมโซมเพศไว้มุมล่างขวาสุด

ในรายงานของ Nash และ O'Brien (1987); Wada และคณะ (1991) ได้รายงานการจัดคาริโอไทป์ในสัตว์กลุ่มหมี (Usidae) ทำการจัดคาริโอไทป์เรียงลำดับจากโครโมโซมขนาดใหญ่สุดไปยังเล็กสุด โดยไม่ยึดว่าเป็นโครโมโซมชนิดใด และวางโครโมโซมเพศไว้มุมล่างขวาสุด

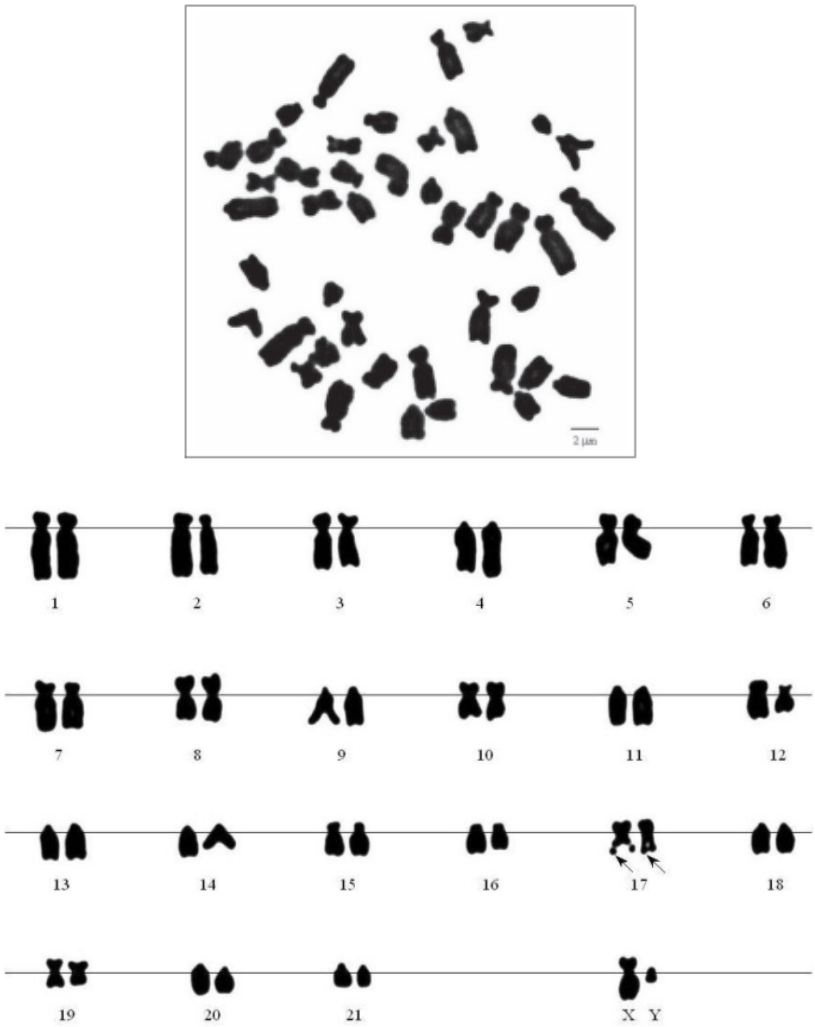

Figure 1. Metaphase chromosomes and karyotype of male masked palm civet (*Paguma lavata*) (diploid) = 44, by conventional staining method, satellite chromosome (arrows).

จากการศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ของอีเห็นเครือในครั้งนี้ ทำการจัดคาริโอไทป์ตามวิธีการของ Nash และ O'Brien (1987); Wada และคณะ (1991) เพื่อความสะดวกในการศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ของอีเห็นเครือ

การศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ของอีเห็นเครือ พบว่ามีจำนวนโครโมโซม 2n (diploid) เท่ากับ 44 แท่ง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการศึกษาของ Wurster และ Benirschke (1967, 1968); Wada และคณะ (1983); Wang และคณะ (1984); Masashi และ Harumi (1993) ที่ได้รายงานว่าอีเห็นเครือมีจำนวนโครโมโซม 2n เท่ากับ 44 แท่ง (Figure 1 and 2) เมื่อทำการเปรียบเทียบกับสัตว์ที่อยู่ในวงศ์ย่อยเดียวกัน คือ อีเห็นธรรมดาและหมีขอ พบว่ามีจำนวนโครโมโซมเท่ากับ 42 แท่ง (Wurster and Benirschke, 1967, 1968; Ray-Chaudhuri *et al*., 1966)

อีเห็นเครือมีจำนวนโครโมโซมพื้นฐาน (fundamental number; NF) เท่ากับ 72 ในเพศเมียและเพศผู้ ซึ่งแตกต่างจากรายงานการศึกษาของ Wurster และ Benirschke (1967, 1968) มีจำนวนโครโมโซมพื้นฐานเท่ากับ 68 ทั้งในเพศผู้และเพศเมีย Wang และคณะ (1984) มีจำนวนโครโมโซมพื้นฐานเท่ากับ 68 ในเพศเมีย

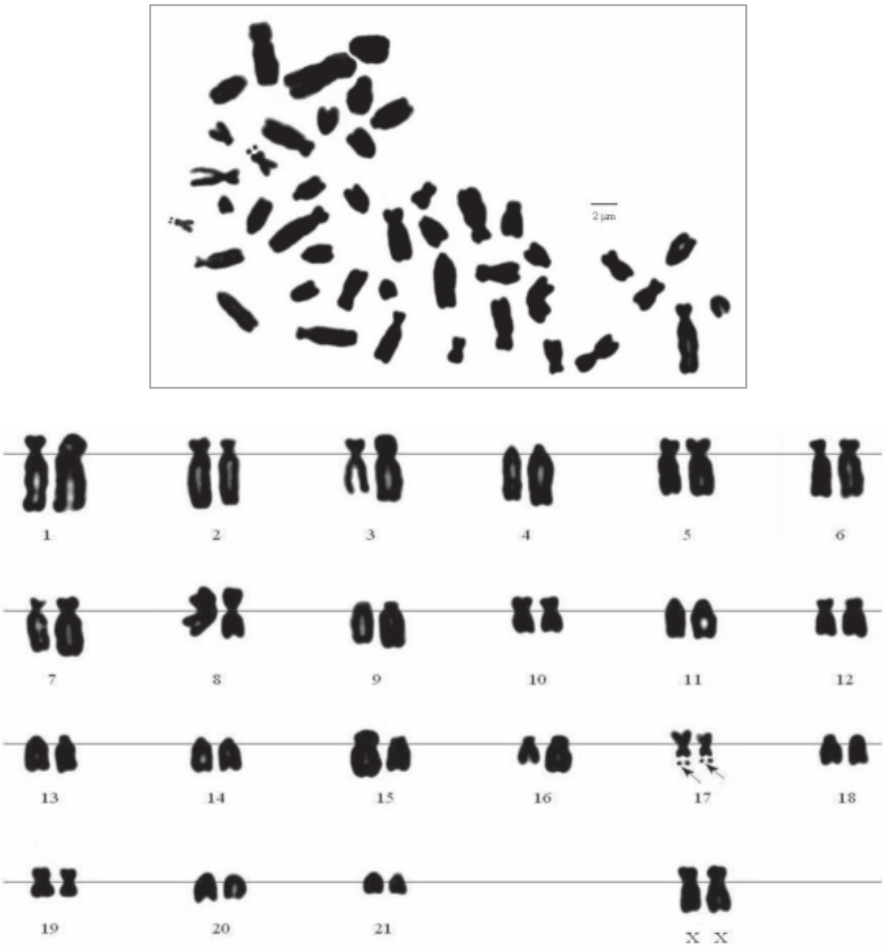

Figure 2. Metaphase chromosomes and karyotype of female masked palm civet (*Paguma lavata*) (diploid) = 44, by conventional staining method, satellite chromosome (arrows).

และ 69 ในเพศผู้ Masashi และ Harumi (1993) มีจำนวนโครโมโซมพื้นฐานเท่ากับ 66 ทั้งเพศผู้และเพศเมีย ความแตกต่างของจำนวนโครโมโซมพื้นฐานที่เกิดขึ้น เนื่องมาจากการกำหนดชนิด และการนับแขนของโครโมโซมที่มีความแตกต่างกัน

อีเห็นเครือมีโครโมโซมร่างกายที่ประกอบด้วยโครโมโซมชนิดเมทาเซนทริกขนาดใหญ่ 2 แท่ง ซับเมทาเซนทริกขนาดใหญ่ 6 แท่ง อะโครเซนทริกขนาดใหญ่ 6 แท่ง เทโลเซนทริกขนาดใหญ่ 2 แท่ง เมทาเซนทริกขนาดกลาง 2 แท่ง ซับเมทาเซนทริกขนาดกลาง 2 แท่ง อะโครเซนทริกขนาดกลาง 2 แท่ง เทโลเซนทริกขนาดกลาง 8 แท่ง เมทาเซนทริกขนาดเล็ก 2 แท่ง ซับเมทาเซนทริกขนาดเล็ก 2 แท่ง อะโครเซนทริกขนาดเล็ก 2 แท่ง เทโลเซนทริกขนาดเล็ก 6 แท่ง จะเห็นได้ว่าอีเห็นเครือมีโครโมโซมร่างกายทุกชนิด (เมทาเซนทริก ซับเมทาเซนทริก อะโครเซนทริก และเทโลเซนทริก) และทุกขนาด (ใหญ่ กลาง และเล็ก) ซึ่งแตกต่างกับรายงานการศึกษาของ Wurster และ Benirschke (1976, 1968) มีโครโมโซมร่างกายชนิดเมทาเซนทริกและซับเมทาเซนทริก 22 แท่ง ชนิดอะโครเซนทริกและซับอะโครเซนทริก 20 แท่ง Wang และคณะ (1984) มีโครโมโซมร่างกายชนิดเมทาเซนทริกและซับเมทาเซนทริก 24 แท่ง ชนิดอะโครเซนทริก 18 แท่ง Masashi และ Harumi (1993) มีโครโมโซมร่างกายชนิดเมทาเซนทริกและซับเมทาเซนทริก 8 แท่ง ชนิด

อะโครเซนทริก 18 แท่ง ชนิดซับเทโลเซนทริก 16 แท่ง

จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าอีเห็นเครือมีโครโมโซมเครื่องหมาย (chromosome marker) โดยพบว่าโครโมโซมคู่ที่ 17 (1 คู่) จัดเป็น satellite chromosome (มีบริเวณของ nucleolar organizer region, NOR) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการศึกษาของ Wurster และ Benirschke (1967, 1968); Wang และคณะ (1984); Masashi และ Harumi (1993) ที่ได้รายงานว่าอีเห็นเครือมีโครโมโซมที่เป็น satellite chromosome จำนวน 2 แท่ง (1 คู่) โครโมโซมคู่ที่ใหญ่ที่สุดของอีเห็นเครือ เป็นโครโมโซมร่างกายชนิดอะโครเซนทริก และโครโมโซมคู่ที่เล็กที่สุดเป็นโครโมโซมวายชนิดซับเมทาเซนทริก

จากการนำเซลล์ที่อยู่ในระยะเมทาเฟสของอีเห็นเครือเพศผู้และเพศเมียอย่างละ 20 เซลล์ มาทำการวัดขนาดของโครโมโซมที่มีหน่วยเป็นเซนติเมตร พบว่าโครโมโซมของอีเห็นเครือมีค่าเฉลี่ยความยาวของแขนโครโมโซมข้างสั้น (Ls) ความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาว (Ll) ความยาวของโครโมโซมแต่ละคู่ (LT) ค่า relative length (RL) ค่า centromeric index (CI) ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ของค่า RL (Table 2) และอิดิโอแกรมของอีเห็นเครือแสดงให้เห็นถึงการค่อยๆ ลดขนาดของโครโมโซมจากใหญ่สุดไปเล็กสุด (Figure 5)

Table 2. Mean of length, short arm chromosome (Ls); length, long arm chromosome (Ll); length, total arm chromosome (LT); relative length (RL); centromeric index (CI) and standard deviation (SD) of RL from metaphase chromosomes of 20 cells in male and female masked palm civet (*Paguma lavata*) 2n (diploid) = 44.

Chromosome Pair	Ls	Ll	LT	RL±SD	CI	Size of Chromosome	Type of Chromosome
1	0.31	0.96	1.27	0.074±0.0038	0.755	L	a
2	0.26	0.93	1.19	0.069±0.0035	0.781	L	a
3	0.32	0.73	1.05	0.061±0.0017	0.695	L	sm
4	0.06	0.98	1.05	0.061±0.0018	0.933	L	t
5	0.36	0.69	1.05	0.061±0.0019	0.657	L	sm
6	0.23	0.82	1.05	0.061±0.0024	0.780	L	a
7	0.28	0.64	0.93	0.054±0.0018	0.688	L	sm
8	0.39	0.51	0.90	0.052±0.0043	0.566	L	m
9	0.06	0.72	0.78	0.045±0.0025	0.923	M	t
10	0.34	0.44	0.78	0.045±0.0023	0.564	M	m
11	0.06	0.66	0.72	0.042±0.0019	0.916	M	t
12	0.22	0.45	0.67	0.039±0.0012	0.697	M	sm
13	0.05	0.59	0.64	0.037±0.0011	0.915	M	t
14	0.06	0.58	0.64	0.037±0.0017	0.906	M	t
15	0.14	0.50	0.64	0.037±0.0015	0.781	M	a
16	0.11	0.45	0.55	0.032±0.0011	0.818	S	a
17	0.18	0.37	0.55	0.032±0.0012	0.672	S	sm
18	0.04	0.51	0.55	0.032±0.0009	0.927	S	t
19	0.26	0.28	0.55	0.032±0.0014	0.509	S	m
20	0.04	0.43	0.47	0.027±0.0013	0.914	S	t
21	0.02	0.33	0.35	0.020±0.0012	0.942	S	t
X	0.33	0.51	0.84	0.049±0.0025	0.607	L	sm
Y	0.08	0.19	0.28	0.016±0.0019	0.678	S	sm

Remark: L = large chromosome (LT > 0.810), M = medium chromosome (LT = 0.635-0.810), S = small chromosome (LT < 0.635), m = metacentric chromosome, sm = submetacentric chromosome, a = acrocentric chromosome and t = telocentric chromosome

อีเห็นเครือมีโครโมโซมเอ็กซ์เป็นชนิดซับเมทาเซนทริกขนาดใหญ่ และโครโมโซมวายเป็นชนิดซับเมทาเซนทริกขนาดเล็กมากที่สุด ซึ่งแตกต่างกับรายงานการศึกษาของ Wurster และ Benirschke (1967, 1968) ที่พบว่าอีเห็นเครือมีโครโมโซมเอ็กซ์เป็นชนิดเมทาเซนทริกขนาดกลาง และโครโมโซมวายเป็นชนิดซับเมทาเซนทริกขนาดเล็ก Wang และคณะ (1984) มีโครโมโซมเอ็กซ์เป็นชนิดซับเมทาเซนทริก และโครโมโซมวายเป็นชนิดอะโครเซนทริก Masashi และ Harumi (1993) มีโครโมโซมเอ็กซ์และวายเป็นชนิดเมทาเซนทริก

แถบสีโครโมโซมที่พบปรากฏอยู่บนแท่งโครโมโซมใน 1 ชุดโครโมโซมแฮพลอยด์ (haploid) ประกอบด้วยโครโมโซมร่างกายและโครโมโซมเพศ (โครโมโซมเอ็กซ์และวาย) จากการย้อมแถบสีแบบจีในโครโมโซมระยะเมทาเฟสของอีเห็นเครือ พบว่ามีแถบสีบนโครโมโซม 141 แถบ (Figure 3 and 4) สามารถที่จะแยกความแตกต่างของโครโมโซมแต่ละคู่ได้อย่างชัดเจน ทำให้ง่ายต่อการจับคู่ของโครโมโซมคู่เหมือน อีเห็นเครือมีสูตรคาริโอไทป์ ดังนี้

สูตรคาริโอไทป์อีเห็นเครือเพศผู้ คือ

$$2n\ (44) = L^{m}_{2}+L^{sm}_{6}+L^{a}_{6}+L^{t}_{2}+M^{m}_{2}+M^{sm}_{2}+M^{a}_{2}+M^{t}_{8}+S^{m}_{2}+S^{sm}_{2}+S^{a}_{2}+S^{t}_{6}+X+Y$$

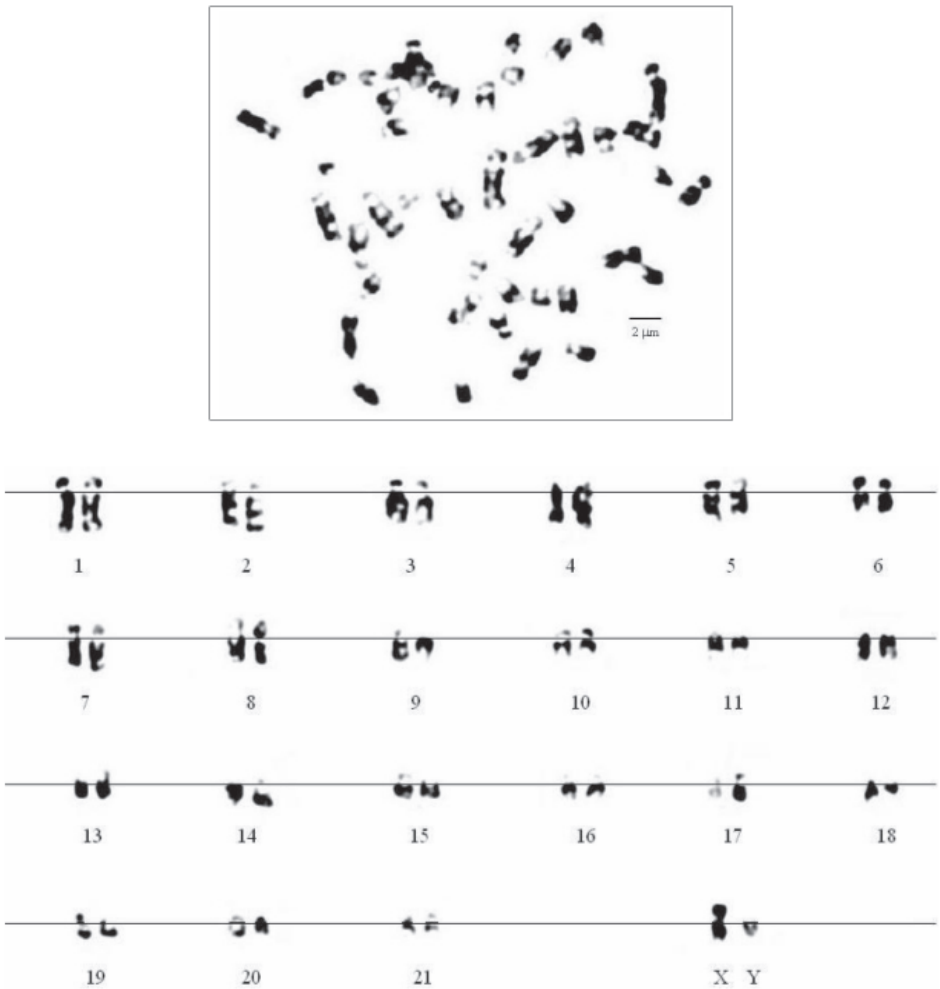

Figure 3. Metaphase chromosomes and karyotype of male masked palm civet (*Paguma lavata*) (diploid) = 44, by G-banding method.

หรือ $= L^m_2+L^{sm}_7+L^a_6+L^t_2+M^m_2+M^{sm}_2+M^a_2+M^t_8+S^m_2+S^{sm}_3+S^a_2+S^t_6$

สูตรคาริโอไทป์อีเห็นเครือเพศเมีย คือ

$2n\ (44) = L^m_2+L^{sm}_6+L^a_6+L^t_2+M^m_2+M^{sm}_2+M^a_2+M^t_8+S^m_2+S^{sm}_2+S^a_2+S^t_6+X+X$

หรือ $= L^m_2+L^{sm}_8+L^a_6+L^t_2+M^m_2+M^{sm}_2+M^a_2+M^t_8+S^m_2+S^{sm}_2+S^a_2+S^t_6$

สรุปผลการศึกษา

อีเห็นเครือมีจำนวนโครโมโซม 2n เท่ากับ 44 แท่ง มีจำนวนโครโมโซมพื้นฐานเท่ากับ 72 ในเพศเมียและเพศผู้ โครโมโซมร่างกายประกอบด้วยโครโมโซมชนิดเมทาเซนทริกขนาดใหญ่ 2 แท่ง ซับเมทาเซนทริกขนาดใหญ่ 6 แท่ง อะโครเซนทริกขนาดใหญ่ 6 แท่ง เทโลเซนทริกขนาดใหญ่ 2 แท่ง เมทาเซนทริกขนาดกลาง 2 แท่ง ซับเมทาเซนทริกขนาดกลาง 2 แท่ง อะโครเซนทริกขนาดกลาง 2 แท่ง เทโลเซนทริกขนาดกลาง 8 แท่ง เมทาเซนทริกขนาดเล็ก 2 แท่ง ซับเมทาเซนทริกขนาดเล็ก 2 แท่ง อะโครเซนทริกขนาดเล็ก 2 แท่ง เทโลเซนทริกขนาดเล็ก 6 แท่ง โครโมโซมคู่ที่ 17 จัดเป็น satellite chromosome โครโมโซมเอ็กซ์เป็นชนิดซับเมทาเซนทริกขนาดใหญ่ และโครโมโซมวายเป็นชนิดซับเมทาเซนทริกขนาดเล็กมากที่สุด การย้อมสีโครโมโซมแบบแถบสีจี พบ

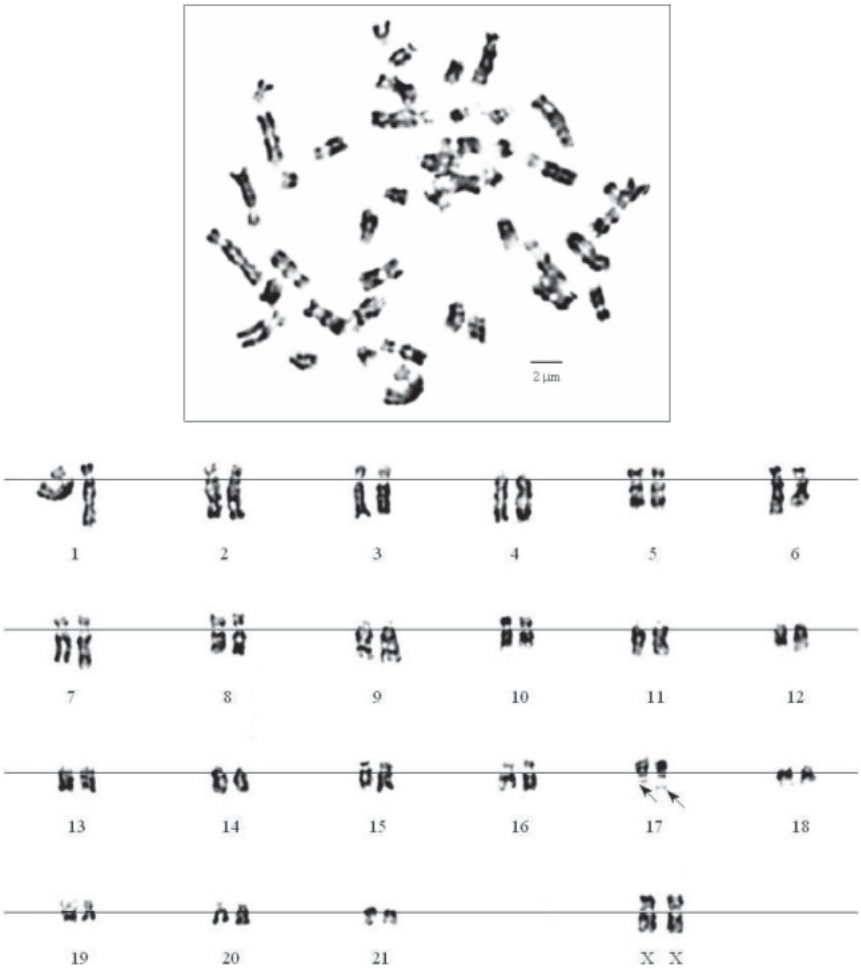

Figure 4. Metaphase chromosomes and karyotype of female masked palm civet (*Paguma lavata*) (diploid) = 44, by G-banding method.

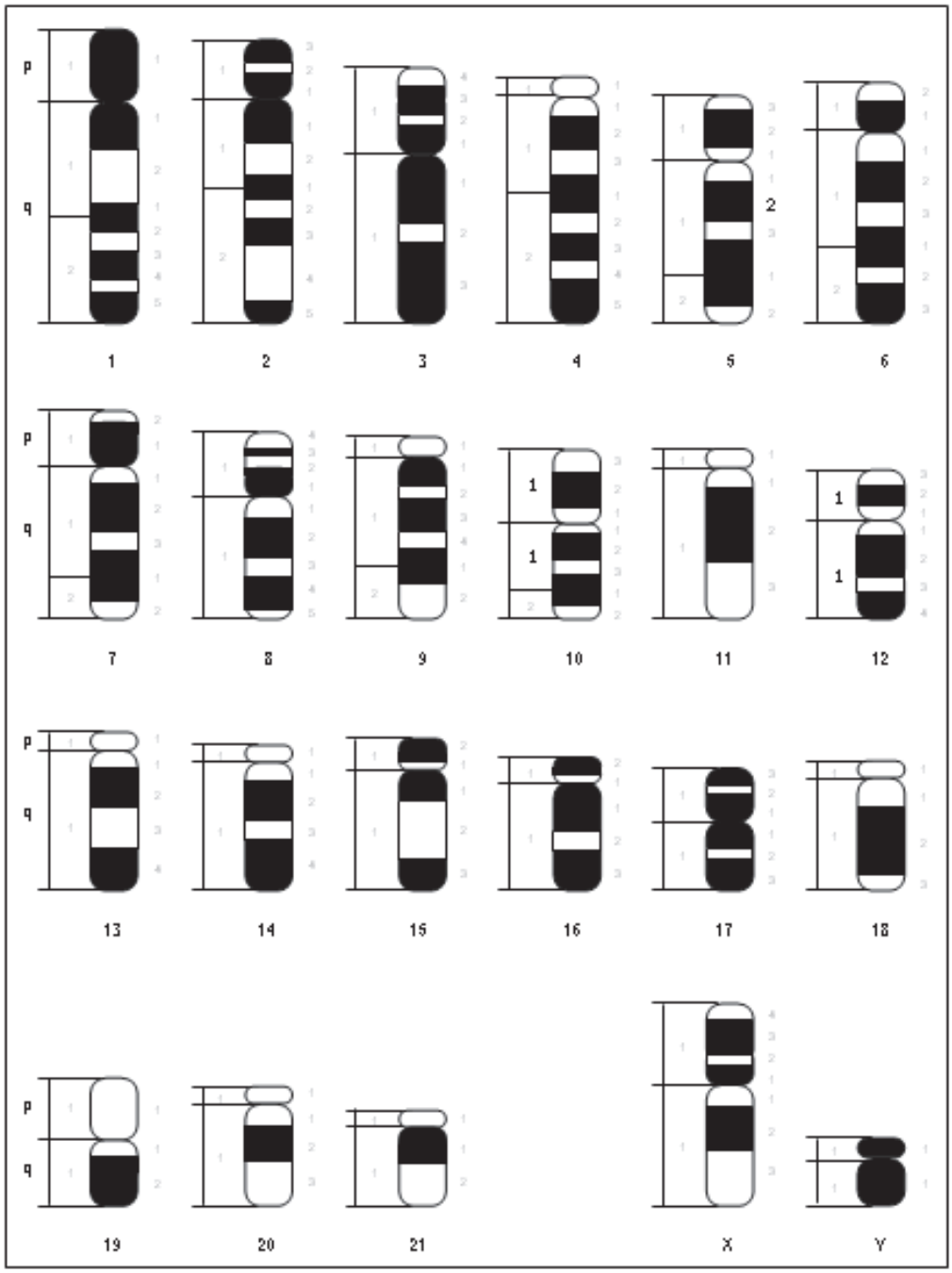

Figure 5. Idiogram of masked palm civet (*Paguma lavata*) 2n (diploid) = 44, by G-banding technique.

ว่ามีจำนวนแถบสีที่เกิดขึ้นทั้งหมด 141 แถบสี สามารถที่จะแยกความแตกต่างของโครโมโซมแต่ละคู่ได้อย่างชัดเจน อีเห็นเครือมีสูตรคาริโอไทป์ ดังนี้

$$2n\ (44) = L^{m}_{2}+L^{sm}_{6}+L^{a}_{6}+L^{t}_{2}+M^{m}_{2}+M^{sm}_{2}+M^{a}_{2}+M^{t}_{8}+S^{m}_{2}+S^{sm}_{2}+S^{a}_{2}+S^{t}_{6} + \text{โครโมโซมเพศ}$$

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้ทำการวิจัยขอขอบคุณองค์การสวนสัตว์ในพระบรมราชูปถัมภ์ ที่ได้สนับสนุนเงินทุนสำหรับการศึกษาในครั้งนี้ ขอขอบคุณ นายโสภณ ดำนุ้ย ผู้อำนวยการองค์การสวนสัตว์ในพระบรมราชูปถัมภ์ ขอขอบคุณ ท่านผู้อำนวยการสวนสัตว์เปิดเขาเขียว ที่ได้อนุญาตทำการเจาะเก็บตัวอย่างเลือดอีเห็นเครือ ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่และพนักงานสวนสัตว์ทุกท่าน ที่ช่วยให้การศึกษาในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

กันยารัตน์ ไชยสุต. 2532. เซลล์พันธุศาสตร์และเซลล์อนุกรมวิธานของพืชสกุล *Zephyranthes*. ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพมหานคร.

สมชาย เลี้ยงพรพรรณ. 2540. การอนุรักษ์ทรัพยากรสัตว์ป่าในประเทศไทย. ภาควิชาภูมิศาสตร์ คณะมนุษยศาสตร์และสังคมศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ, สงขลา.

อมรา คัมภิรานนท์. 2540. พันธุศาสตร์ของเซลล์. ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร.

โอภาส ขอบเขตต์. 2541. ทรัพยากรสัตว์ป่า. การอนุรักษ์ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อมของประเทศไทย. คณะวนศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร.

Fredge, K. 1972. Comparative chromosome studies in mongooses (Carnivora, Viverridae). Heredi. 71: 1-74.

Hickman, C.P. and Roberts, L.S. 1994. Biology of animals. Wm. C. Brown Communications, United Kingdom.

Lekagul, B. and McNeely, J.A. 1977. Mammals of Thailand. 1nd ed. Kurusapha Ladprao Press, Bangkok, Thailand.

Lekagul, B. and McNeely, J.A. 1988. Mammals of Thailand. 2nd ed. Sahakarn Bhaet, Bangkok, Thailand.

Masashi, H. and Harumi, T. 1993. Karyotype study of the masked palm civet, *Paguma lavata* in Japan (Viverridae). J. of the Mam. Soc. of Japan. 18: 39-42.

Nash, W.G. and O' Brien, S.J. 1987. A comparative chromosome banding analysis os Ursidae and their relationship to other carnivores. Cytogen. Cell Genet. 45: 206-212.

Ray-Chaudhuri, S.P., Ranjini, P.V. and Sharma, T. 1966. Somatic chromosome of the common palm civet, *Paradoxurus hermaphroditus* (Viverridae-Carnivora). Experi. 22(11): 740-741.

Wada, M.Y., Lim, Y. and Wurster-Hill, D.H. 1991. Banded karyotype of wild-caught male Korean raccoon dog, *Nyctereutes procyonoides koreensis*. Geno. 34: 302-306.

Wada, M.Y., Nakamura, A. and Yoshida, T.H. 1983. An easy technique to obtain the blood by the Clew-cutting from small mammals and bird, and karyotype of some animals from blood culture. Kromoso. 58(112): 971-976.

Wang, Z., Quan, G., Yie, Z. and Wang, S. 1984. Karyotype of three species of Carnivora. Ac. Zoo. Sin. 30: 188-195.

Wilson, D.E. and Cole, F.R. 2000. Common names of mammals of the world. Smithsonian Institution, United States of America.

Wurster, D.H. and Benirschke, K. 1967. Chromosome numbers in thirty species of Carnivora, Mammal. Chromo. News. 8: 195-216.

Wurster, D.H. and Benirschke, K. 1968. Comparative cytogenetic studies in the Order Carnivora. Chromosoma (Berl.). 24: 336-382.