

พันธุศาสตร์เซลล์ของหมีควาย (*Ursus thibetanus*) ในประเทศไทย

Cytogenetics of Asiatic Black Bear, *Ursus thibetanus*

(Carnivora, Ursidae) in Thailand

อลงกต แทนออมทอง (Alongkoad Tanomtong)* วิวรรธน์ แก่นสา (Wiwat Kaensa)**
อมรัตน์ ทองดุษฎี (Thomrat Hongdul)*** เรืองวิทย์ บรรจงรัตน์ (Roungvit Bunjonrat)****

บทคัดย่อ

การศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ของหมีควายในประเทศไทย ใช้ตัวอย่างสัตว์จากสวนสัตว์เปิด เขาเขียว เติร์มโครโมโซมด้วยการเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บเกี่ยวเซลล์ด้วยเทคนิคโคลชิซิน-ไฮโปโทนิค-ฟิกเซชัน-แอร์ดาร์ยอ้ง ย้อมด้วยสีจิมซ่า ผลการศึกษาพบว่าหมีควายมีจำนวนโครโมโซม 2n (diploid) เท่ากับ 74 แห่ง มีจำนวนโครโมโซมพื้นฐานเท่ากับ 84 ในเพศเมีย และ 83 ในเพศผู้ โครโมโซมร่างกายประกอบด้วยโครโมโซมชนิดเมทาเซนทริกขนาดใหญ่ 2 แห่ง ที่โลเซนทริกขนาดใหญ่ 22 แห่ง ซับเมทาเซนทริกขนาดกลาง 6 แห่ง และเทโลเซนทริกขนาดกลาง 42 แห่ง โครโมโซมเอ็กซ์เป็นชนิดซับเมทาเซนทริกขนาดใหญ่มากที่สุด และโครโมโซมวายเป็นชนิดที่โลเซนทริกขนาดกลาง โครโมโซมคู่ที่ 25 จัดเป็น satellite chromosome สามารถตรวจสอบด้วยการย้อมสีแบบ Ag-NOR-banding หมีควายมีสูตรคาริโอไทป์ ดังต่อไปนี้

สูตรคาริโอไทป์ของหมีควาย คือ

$$2n (74) = L^m_2 + L^l_{22} + M^{sm}_6 + M^t_{42} + \text{โครโมโซมเพศ}$$

Abstract

Cytogenetics studies of Asiatic black bear (*Ursus thibetanus*) in Thailand. Blood samples were taken from the two subspecies kept in Khoa Kheow Open Zoo, Chonburi province. 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 Asiatic black bear (*Ursus thibetanus*) was determined to be $2n=74$, the fundamental number (NF) are 83 chromosomes in male and 84 in female. The type of autosome are 2 large metacentric, 22 large telocentric, 6 medium submetacentric and 42 medium telocentric chromosomes. X chromosome is the largest submetacentric and Y chromosome is a medium telocentric chromosome. In addition, a pair of chromosome 25 with clearly observable satellite chromosome is detected by Ag-NOR-banding.

The karyotype formula for the Asiatic black bear (*Ursus thibetanus*) is as follows :

$$2n (74) = L^m_2 + L^l_{22} + M^{sm}_6 + M^t_{42} + \text{sex-chromosome}$$

คำสำคัญ: พันธุศาสตร์เซลล์, คาร์ิโอไทป์, หมีควาย

Keywords : cytogenetics, karyotype, Asiatic Black Bear (*Ursus thibetanus*)

* ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สาขาพันธุศาสตร์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

** นักศึกษาปริญญาโท สาขาพันธุศาสตร์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

*** นักศึกษาปริญญาโท สาขาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**** ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สาขาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทนำ

หมีควาย (Asiatic black bear) สามารถที่จะจัดจำแนกอนุกรมวิธานได้ดังนี้ จัดอยู่ในอาณาจักร (kingdom) สัตว์ (animalia) ไฟลัม (phylum) สัตว์มีกระดูกสันหลัง (chordata) ชั้น (class) สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (mammal) อันดับ (order) สัตว์กินเนื้อ (carnivora) วงศ์ (family) หมี (Ursidae) วงศ์ย่อย (subfamily) Ursinae สกุล (genus) *Ursus* ชนิด (species) *Ursus thibetanus* (Lekagul and McNeely, 1977, 1988) สัตว์ในวงศ์หมีทั่วโลกมีอยู่ทั้งสิ้น 2 วงศ์ย่อย 6 สกุล และ 9 ชนิด สำหรับในประเทศไทยพบทั้งหมด 1 วงศ์ย่อย 2 สกุล และ 2 ชนิด ได้แก่ วงศ์ย่อย Ursinae ประกอบด้วยหมีหมา (*Helarctor malayanus*) และหมีควาย (*Ursus thibetanus*) (Lekagul and McNeely, 1977, 1988; Hickman and Roberts, 1994; Wilson and Cole, 2000)

หมีควายเป็นหมีที่มีขนาดใหญ่มากที่สุดในประเทศไทย ขนตามลำตัวหยาบยาวสีดำ บริเวณอกใต้ลำคอจะมีสีขาวรูปตัววีมองเห็นได้อย่างชัดเจน มีใบหูเล็ก ปลายจมูกมีสีดำ ปากค่อนข้างยาว หางสั้น เล็บเท้ามีขนาดใหญ่และแข็งแรง ชอบหากินอยู่ตามภูเขาป่าสูง ชอบออกหากินตอนกลางคืน ขึ้นต้นไม้เก่งและว่ายน้ำได้ดี ชอบอาศัยอยู่โดดเดี่ยวตามลำพัง บางครั้งอาจพบอยู่รวมกัน 2-3 ตัว มีนิสัยดุร้าย ผสมพันธุ์ประมาณเดือนกันยายน ตั้งท้องนาน 6 เดือน ออกลูกครั้งละ 1-2 ตัว มีอายุยืนประมาณ 30-40 ปี อาหารที่หมีควายชอบ ได้แก่ ตัวอ่อนของผึ้ง น้ำผึ้ง ใบไม้อ่อน ผลไม้ หน่อไม้ และแมลงต่าง ๆ การแพร่กระจายพบในทวีปเอเชีย ตั้งแต่ประเทศอัฟกานิสถาน ไปจนถึงเทือกเขาหิมาลัย พม่า อินโดจีน จีน เกาหลี ญี่ปุ่น ไต้หวัน และประเทศไทย (โอภาส ขอบเขตต์, 2535; Lekagul and McNeely, 1977, 1988)

จากการตรวจสอบเอกสารงานวิจัย พบว่ามีรายงานการศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ของสัตว์ในวงศ์หมีทั่วโลก ดังรายงานของ Wurster and Benirschke (1967, 1968); Tsuchiya et al. (1978); Tsuchiya (1979); Tsuchiya et al. (1979); Nash and O'Brien

(1987); Nash et al. (1998) สำหรับในประเทศไทย ยังไม่มีรายงานการศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ของหมีควายมาก่อน จึงควรที่จะต้องมีการศึกษาเพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐาน และนำไปประยุกต์ใช้ในการศึกษาวิจัยอื่น ๆ ต่อไป การศึกษาในครั้งนี้ใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาว (lymphocyte culture) การย้อมสีโครโมโซมแบบธรรมดา (conventional staining) และการย้อมสีเพื่อตรวจสอบโครโมโซมที่มีรอยคอดที่สอง (Ag-NOR-banding) เพื่อทำการเปรียบเทียบกับรายงานการศึกษาที่มีมาก่อนหน้านี้

วิธีดำเนินการศึกษา

ตัวอย่างเลือดที่ใช้ในการศึกษาได้จากหมีควายเพศผู้ 2 ตัว และเพศเมีย 2 ตัว ที่เลี้ยงอยู่ในสวนสัตว์เปิดเขาเขียว จังหวัดชลบุรี ทำการเจาะเก็บเลือดโดยใช้เทคนิคปราศจากเชื้อ (aseptic technique) จากเส้นเลือดดำบริเวณลำคอ (jugular vein) เก็บในหลอดสูญญากาศ (vacuum tube) ขนาด 10 มิลลิลิตร ที่บรรจุสารเฮปาริน (heparin) เพื่อป้องกันการแข็งตัวของเลือด แล้วทำการแช่ในกระติกน้ำแข็งตลอดการเดินทางจนถึงห้องปฏิบัติการ การดำเนินการทดลองแบ่งออกได้เป็น 2 ส่วน ดังนี้

การเตรียมเซลล์

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

การเพาะเลี้ยงเซลล์

1. เตรียม stock อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด RPMI 1640 ในอาหารเพาะเลี้ยง 100 มล. ประกอบด้วยสารกระตุ้นการแบ่งเซลล์ (mitogen) คือ PHA (Phytohemagglutinin) ความเข้มข้น 2% จำนวน 2 มล. fetal calf serum 20 มล. และ Penicillin/streptomycin 2 มล. นำ stock อาหารแบ่งลงในขวดอาหารเลี้ยงเชื้อขวดละ 5 มิลลิลิตร

2. นำเลือดหมีควายจำนวน 0.5 มิลลิลิตร หยดลงในขวดเลี้ยงเลือด เขย่าให้สารละลายและเลือดเข้ากัน ปิดฝาขวดหลวม ๆ นำไปบ่มในตู้บ่ม (incubator) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% และทำการเขย่าเลือดทุกเช้าเย็น

3. เมื่อครบเวลาเก็บเกี่ยวเซลล์ คือ ชั่วโมงที่ 72 ทำการหยดสารละลาย Colchicine เขย่าเบา ๆ ให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มต่ออีก 30 นาที

การเก็บเกี่ยวเซลล์

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

2. ทำให้เซลล์พองตัวเพื่อที่โครโมโซมจะมีการกระจายตัวดี 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) โดยการเติม fresh cold fixative ที่มีอัตราส่วนของ methanol : glacial acetic acid เป็น 3 : 1 (ต้องนำไปแช่เย็นและเตรียมใหม่ก่อนใช้ทุกครั้ง) ใช้หลอดหยด หยด fresh cold fixative ที่ละลายพร้อม กับผสมเซลล์ให้เข้ากับสารละลายด้วย vortex mixture เติมนจนได้ปริมาตรประมาณ 8 มล. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1,200 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ทำการดูดส่วน fixative ด้านบนทิ้ง

5. ทำซ้ำในข้อ 4 อีก โดยค่อย ๆ ลดปริมาตร fixative ที่ใช้แต่ละครั้งลง จำนวนครั้งขึ้นอยู่กับความใสของสารละลาย ทำซ้ำจนได้สารละลายที่ใสและมีตะกอนเซลล์ที่ก้นหลอด ทำการดูดสารละลายด้านบนทิ้งจนเกือบหมด แล้วทำการเติม fixative ลงไปอีก 1 มล. ทำการผสมให้เข้ากัน

6. ใช้ micropipette ดูดสารละลายตะกอนเซลล์เม็ดเลือดขาวปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงบน สไลด์ที่สะอาดและเย็นจัด ทำการฟุ้งสไลด์ให้แห้ง (air dry technique)

7. ย้อมสีโครโมโซมแบบดั้งเดิม (conventional staining) ด้วยสี Giemsa 10% เป็นเวลา 15 นาที ทำการล้างสีออกด้วยน้ำประปา ฟุ้งสไลด์ให้แห้ง แล้วนำไปศึกษาต่อด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

การตรวจสอบโครโมโซม

ทำการคัดเลือกเซลล์ที่มีการแบ่งเซลล์ระยะเมทาเฟส (metaphase) ที่มีโครโมโซมไม่สั้นหรือยาวเกินไป และมีการกระจายตัวของโครโมโซมไม่ซ้อนทับกัน ถ่ายภาพโครโมโซมหมีควายเพศผู้และเพศเมียอย่างละ 20 เซลล์ ศึกษาโครโมโซมตามแบบของ กันยาร์ตัน ไฮยสุต (2532) โดยการหาความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาว (length long, Ll) ข้างสั้น (length short, Ls) ทำการคำนวณหาค่าความยาวของโครโมโซมแต่ละแห่ง (length total, Lt) ค่า relative length (RL) และค่า centromeric index (CI) แล้วนำค่า Ll, Ls, Lt, RL และ CI ของโครโมโซมทั้ง 20 เซลล์ มาหาค่าเฉลี่ย (mean) จากนั้นนำค่า CI มากำหนดชนิดของโครโมโซม และนำค่า Lt มากำหนดขนาดของโครโมโซม

การย้อมสีโครโมโซมด้วยวิธี Ag-NOR-banding (Silver staining)

1. ทิ้งสไลด์ที่ทำการหยดเซลล์แล้วที่อุณหภูมิห้อง 3 วัน

2. ทำการผสมสารละลาย Colloidal developer 20 ไมโครลิตร และ Silver nitrate 40 ไมโครลิตร นำมาหยดลงบนสไลด์ที่เตรียมไว้ ทำการปิดทับด้วยกระดาษปิดสไลด์

3. นำแผ่นสไลด์วางบน Hot pate ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ในที่มืดเป็นเวลา 1 นาที

4. ล้างสไลด์ด้วยน้ำกลั่น จากนั้นทำการย้อมสไลด์ด้วยสี Giemsa's 10% เป็นระยะเวลา 10 นาที ล้างด้วยน้ำไหลผ่าน ฟุ้งสไลด์ให้แห้งแล้วนำไปดูใต้กล้องจุลทรรศน์

ผลและวิจารณ์การศึกษา

การศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ของหมีควาย ผลการศึกษาพบว่าหมีควายมีจำนวนโครโมโซม 2n (diploid) เท่ากับ 74 แท่ง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการศึกษาของ Wurster and Benirschke (1967, 1968); Tsuchiya et al. (1978); Tsuchiya (1979); Tsuchiya et al. (1979); Nash and O'Brien (1987); Nash et al. (1998) ที่รายงานว่าหมีควายมีจำนวนโครโมโซม 2n เท่ากับ 74 โครโมโซมระยะเมทาเฟสและคริโอไทป์ของหมีควาย แสดงไว้ดังภาพที่ 1 และ 2

หมีควายมีจำนวนโครโมโซมพื้นฐาน (fundamental number; NF) เท่ากับ 84 ในเพศเมีย และ 83 ในเพศผู้ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการศึกษาของ Wurster and Benirschke (1967, 1968) ที่รายงานว่าหมีควายเพศเมียที่เลี้ยงในสหรัฐอเมริกา มีจำนวนโครโมโซมพื้นฐานเท่ากับ 84 และอิดิโอแกรม (idiogram) ของหมีควายแสดงถึงการค่อย ๆ ลดขนาดลงของโครโมโซมจากโครโมโซมแท่งใหญ่ไปหาแท่งเล็ก แสดงดังภาพที่ 4

หมีควายมีโครโมโซมร่างกาย (autosome) ประกอบด้วยโครโมโซมชนิดเมทาเซนตริก (metacentric) ขนาดใหญ่ 2 แท่ง เทโลเซนตริก (telocentric) ขนาดใหญ่ 22 แท่ง ซับเมทาเซนตริก (submetacentric) ขนาดกลาง 6 แท่ง และเทโลเซนตริกขนาดกลาง 42 แท่ง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการศึกษาของ Wurster and Benirschke (1967, 1968) ที่รายงานว่าหมีควายมีโครโมโซมร่างกายชนิด เมทาเซนตริก และซับเมทาเซนตริก (submetacentric) 8 แท่ง ชนิดอะโครเซนตริก (acrocentric) และซับอะโครเซนตริก (subacrocentric) 64 แท่ง แต่แตกต่างกับรายงานการศึกษาของ Tsuchiya et al. (1978); Tsuchiya (1979); Tsuchiya et al. (1979) ที่รายงานว่าหมีควายมีโครโมโซมร่างกายชนิดเมทาเซนตริก ซับเมทาเซนตริก ซับเทโลเซนตริก 10 แท่ง และอะโครเซนตริก 62 แท่ง

โครโมโซมเพศ (sex-chromosome) ของหมีควาย พบว่าโครโมโซมเอ็กซ์ (X-chromosome) เป็น

ชนิดซับเมทาเซนตริกขนาดใหญ่มากที่สุด และโครโมโซมวาย (Y-chromosome) เป็นชนิดเทโลเซนตริกขนาดกลาง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการศึกษาของ Wurster and Benirschke (1967, 1968) ที่รายงานว่าหมีควายเพศเมียมีโครโมโซมเอ็กซ์เป็นชนิดเมทาเซนตริก หรือซับเมทาเซนตริกขนาดใหญ่ แต่แตกต่างกับรายงานการศึกษาของ Tsuchiya et al. (1978); Tsuchiya (1979); Tsuchiya et al. (1979) ที่รายงานว่าหมีควายมีโครโมโซมเอ็กซ์เป็นชนิดเมทาเซนตริกขนาดใหญ่ และโครโมโซมวายเป็นชนิดอะโครเซนตริกขนาดเล็ก

ค่าเฉลี่ยความยาวของแขนโครโมโซมข้างสั้น (Ls) ความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาว (Ll) ความยาวของโครโมโซมแต่ละคู่ (LT) เป็นเซนติเมตร ค่า relative length (RL) ค่า centromeric index (CI) ของหมีควายเพศผู้และเพศเมียเพศละ 20 เซลล์ ขนาดและชนิดของโครโมโซมร่างกายและโครโมโซมเพศ แสดงดังตารางที่ 1 และ 2

สามารถที่จะตรวจพบเครื่องหมายทางพันธุกรรม (genetic marker) โดยโครโมโซมคู่ที่ 25 (2 แท่ง) ของหมีควายเป็นโครโมโซมร่างกายชนิดเทโลเซนตริกขนาดกลาง จัดเป็น satellite chromosome ได้แก่ โครโมโซมที่มีบริเวณรอยคอดที่สอง (secondary constriction) หรือมีบริเวณที่เรียกว่า nucleolar organizer region (NOR) สามารถที่จะทำตรวจสอบ satellite chromosome ด้วยการย้อมสีแบบ Ag-NOR-banding (silver staining) โดยบริเวณที่เป็นรอยคอดที่สองจะติดสีดำทึบ สามารถมองเห็นได้อย่างชัดเจน แสดงไว้ดังภาพที่ 4 ซึ่งแตกต่างกับรายงานการศึกษาของ Wurster and Benirschke (1967, 1968) ที่รายงานว่าหมีควายมี satellite chromosome จำนวน 4 แท่ง (2 คู่)

การศึกษาเปรียบเทียบจำนวนโครโมโซมของสัตว์ที่อยู่ในวงศ์เดียวกันกับหมีควาย ได้แก่ วงศ์ Ursidae และสกุลเดียวกัน (สกุล *Ursus*) คือ หมีดำของอเมริกา หมีสีน้ำตาล และหมีขาวทั่วโลก พบว่ามีจำนวนโครโมโซม 2n เท่ากับ 74 แท่ง ที่เท่ากัน (Nash and O'Brien,

1987) และเมื่อทำการเปรียบเทียบโครโมโซมร่างกายพบว่าหมีควายจะมีชนิดของโครโมโซมร่างกายที่เหมือนกับหมีสีน้ำตาล และหมีดำของอเมริกา (Wurster and Benirschke, 1967, 1968; Tsuchiya et al., 1978; Tsuchiya, 1979; Tsuchiya et al., 1979) แต่จะแตกต่างกันกับหมีขาวขั้วโลก โดย Wurster and Benirschke (1967, 1968) ได้รายงานว่ามีขาวขั้วโลกมีโครโมโซมร่างกายชนิดเมทาเซนทริก และซับเมทาเซนทริก 12 แห่ง อะโครเซนทริก และซับอะโครเซนทริก 60 แห่ง สำหรับโครโมโซมเพศ พบว่าหมีในสกุล *Ursus* มีชนิดและขนาดของโครโมโซมเพศที่คล้ายกัน คือ มีโครโมโซมเอ็กซ์เป็นชนิดเมทาเซนทริก หรือซับเมทาเซนทริกขนาดใหญ่ และโครโมโซมวายเป็นชนิดทีโลเซนทริก หรืออะโครเซนทริกขนาดเล็ก (Wurster and Benirschke, 1967, 1968)

จากรายงานการศึกษาของ Nash and O'Brien (1987) พบว่าหมีทั่วโลก 6 สกุล 8 ชนิด มีจำนวนโครโมโซมแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มแรกมีจำนวนโครโมโซม $2n$ เท่ากับ 42 ได้แก่ *Ailuropoda melanoleuca* (หมีแพนด้ายักษ์) กลุ่มที่สองมีจำนวนโครโมโซม $2n$ เท่ากับ 52 ได้แก่ *Tremarctos ornatus* (Spectacled bear) กลุ่มที่สามมีจำนวนโครโมโซม $2n$ เท่ากับ 74 ได้แก่ *Helarctos malayanus* (หมีหมา), *Melursus ursinus* (Sloth bear), *Ursus americanus* (หมีดำของอเมริกา), *U. arctos* (หมีสีน้ำตาล), *U. maritimus* (หมีขาวขั้วโลก) และ *U. thibetanus* (หมีควาย) สำหรับหมีอีกหนึ่งชนิด คือ *Ailurus fulgens* (หมีแพนดาแดง) ไม่ถูกจัดอยู่ใน 3 กลุ่มดังกล่าว โดย Nowak (1999) รายงานว่ามีจำนวนโครโมโซม $2n$ เท่ากับ 36

จากการศึกษาของ Nash et al. (1998) ได้วิเคราะห์โครโมโซมของสัตว์ในวงศ์หมี ร่วมกับสัตว์กินเนื้อ และมนุษย์ ด้วยเทคนิค High-resolution trypsin G-banded และ molecular phylogeny เพื่อทำการศึกษาวิวัฒนาการของหมี พบว่าโครโมโซมของหมีทั่วโลกจะมีความคล้ายคลึงกันอย่างมากมีแบบแผน คาดว่าเป็นการ

เปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในระดับของโครโมโซม เกิดจากการแตกหักแยกออกจากกันของโครโมโซม (chromosome fission) และการรวมตัวกันของโครโมโซม (chromosome fusion) ซึ่งจะมีผลต่อคาริโอไทป์ที่แตกต่างกันของหมีทั่วโลกออกเป็น 3 รูปแบบ รูปแบบแรกเกิดจากการแตกหักแยกออกจากกันของโครโมโซมที่มี 2 แขน (โครโมโซมชนิดเมทาเซนทริก หรือซับเมทาเซนทริก) ทำให้ได้จำนวนโครโมโซม $2n$ เท่ากับ 74 ได้แก่ หมีควาย, หมีขาวขั้วโลก, หมีหมา, Sloth bear, หมีสีน้ำตาล และหมีดำของอเมริกา รูปแบบที่สองเกิดจากการรวมตัวกันของโครโมโซมที่มี 2 แขน ทำให้ได้จำนวนโครโมโซม $2n$ เท่ากับ 42 ได้แก่ หมีแพนด้ายักษ์ รูปแบบที่สามเกิดจากการรวมตัวกันของโครโมโซมที่มี 1 แขน (อะโครเซนทริก หรือทีโลเซนทริก) ทำให้ได้จำนวนโครโมโซม $2n$ เท่ากับ 52 ได้แก่ Spectacled bear

จากการศึกษาพบว่าหมีควายมีสูตรคาริโอไทป์ ดังต่อไปนี้

สูตรคาริโอไทป์ของหมีควายเพศผู้ คือ

$$2n (74) = L^m_2 + L^l_{22} + M^{sm}_6 + M^t_{42} + X + Y$$

$$\text{หรือ} = L^m_2 + L^{sm}_1 + L^l_{22} + M^{sm}_6 + M^t_{43}$$

สูตรคาริโอไทป์ของหมีควายเพศเมีย คือ

$$2n (74) = L^m_2 + L^l_{22} + M^{sm}_6 + M^t_{42} + X + X$$

$$\text{หรือ} = L^m_2 + L^{sm}_2 + L^l_{22} + M^{sm}_6 + M^t_{42}$$

หมายเหตุ : L = โครโมโซมขนาดใหญ่,

M = โครโมโซมขนาดกลาง, m = โครโมโซมชนิดเมทาเซนทริก, sm = โครโมโซมชนิดซับเมทาเซนทริก, t = โครโมโซมชนิดทีโลเซนทริก, X = โครโมโซมเอ็กซ์ และ Y = โครโมโซมวาย

สรุปผลการศึกษา

หมีควายมีจำนวนโครโมโซม $2n$ เท่ากับ 74 แห่ง มีจำนวนโครโมโซมพื้นฐานเท่ากับ 84 ในเพศเมีย และ 83 ในเพศผู้ โครโมโซมร่างกายประกอบด้วยโครโมโซมชนิดเมทาเซนทริกขนาดใหญ่ 2 แห่ง ทีโลเซนทริกขนาดใหญ่ 22 แห่ง ซับเมทาเซนทริกขนาดกลาง 6 แห่ง และทีโลเซนทริกขนาดกลาง 42 แห่ง โครโมโซม

เอ็กซ์เป็นชนิดซั่มเมทาเซนทริกขนาดใหญ่มากที่สุด และโครโมโซมวายเป็นชนิดเทโลเซนทริกขนาดกลางโครโมโซมคู่ที่ 25 จัดเป็น satellite chromosome สามารถตรวจสอบด้วยการย้อมสีแบบ Ag-NOR-banding

กิตติกรรมประกาศ

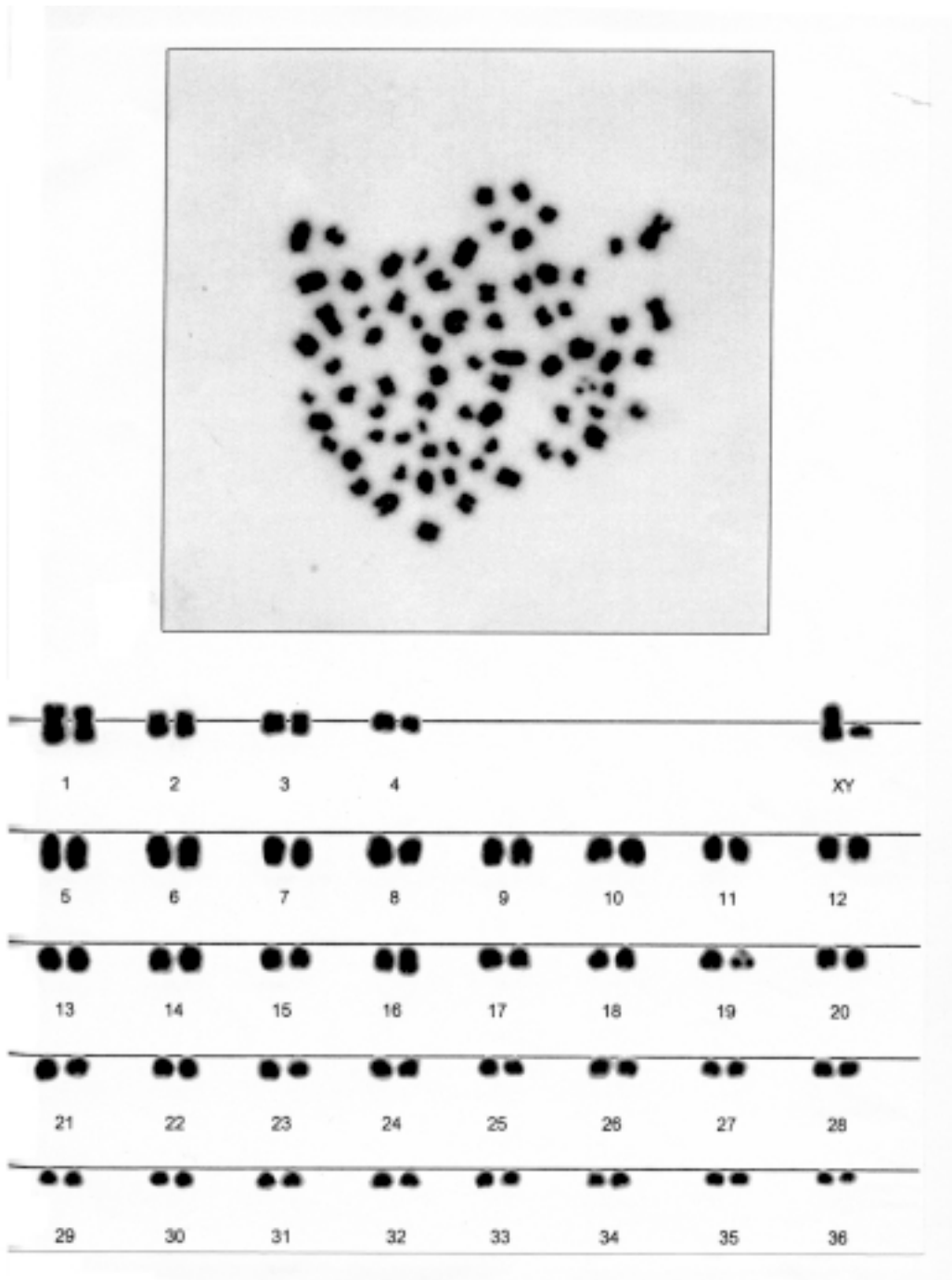
คณะผู้ทำการวิจัยขอขอบคุณองค์การสวนสัตว์ในพระบรมราชูปถัมภ์ ที่ได้สนับสนุนเงินทุนสำหรับการศึกษาในครั้งนี้ ขอขอบคุณท่านผู้อำนวยการองค์การสวนสัตว์ นายโสภณ ดำนุ้ย และผู้อำนวยการสวนสัตว์เปิดเขาเขียว เจ้าหน้าที่และพนักงานทุกท่านที่ช่วยให้การศึกษาในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

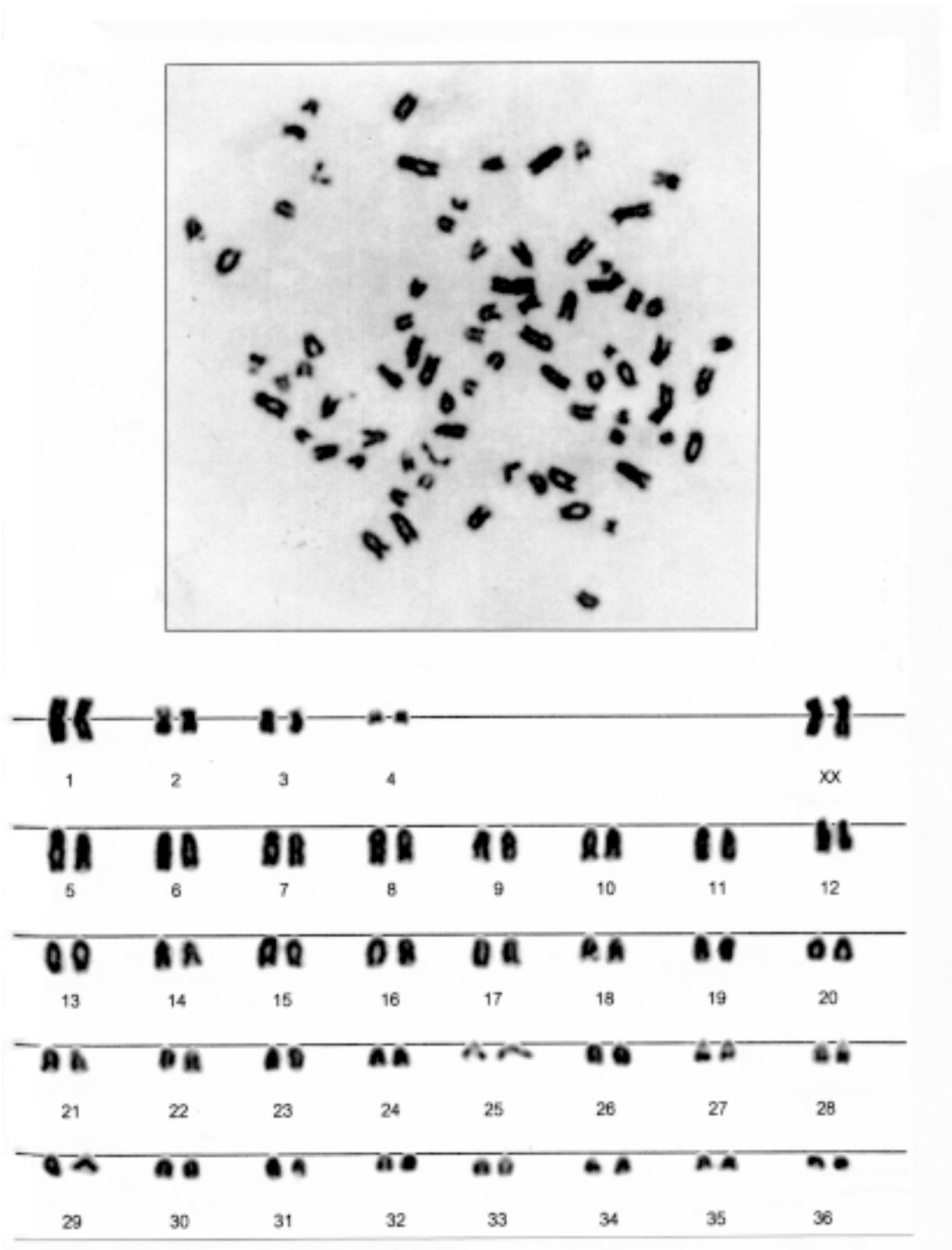
- กันยารัตน์ ไชยสุต. 2532. เซลล์พันธุศาสตร์และเซลล์อนุกรมวิธานของพืชสกุล *Zephyranthes*. ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.
- โอภาส ขอบเขตต์. 2535. ทรัพยากรสัตว์ป่า. การอนุรักษ์ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อมของประเทศไทย. คณะวนศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร.
- อมรา คัมภีรานนท์. 2540. พันธุศาสตร์ของเซลล์. ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- 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**. 1nded. Kurusapha Ladprao Press: Bangkok, Thailand.
- Nash, W.G. and O'Brien, S.J. 1987. A comparative

chromosome banding analysis of the Ursidae and their relationship to other carnivore. **Cytogenet. Cell Genet.** 45: 206-212.

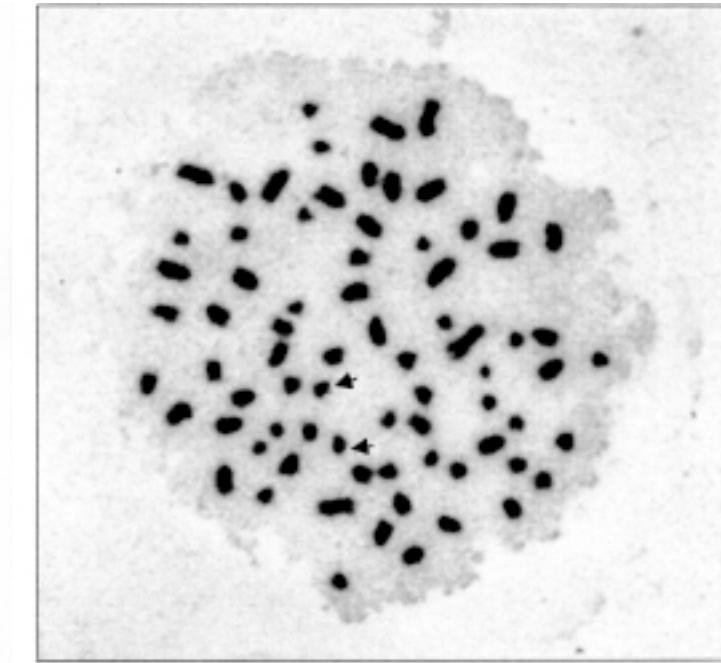
- Nask, W.G., Wienberg, J., Ferguson-Smith, M.A., Menninger, J.C. and O'Brien, S.J. 1998. Comparative genomics tracking chromosome evolution in the family Ursidae using Reciprocal chromosome painting. **Cytogenet. Cell Genet.** 83: 182-192.
- Tsuchiya, K., Hori, H. and Gohda, K. 1978. Chromosome of 2 bear species from Japan (Ursidae; Carnivora). **Higuma.** 6: 12-13.
- Tsuchiya, K. 1979. A contribution to the chromosome study in Japanese mammals. **Proceedings of the Japan Academy, Series B.** 55: 191-195.
- Tsuchiya, K., Hori, H. and Gohda, K. 1979. A karyotype study of 2 species of bears indigenous to Japan. **Chromosome Information Service.** 26: 23-24.
- 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, Mamma. **Chromosoma Newsletter.** 8: 195-216.
- Wurster, D.H. and Benirschke, K. 1968. Comparative cytogenetic studies in the Order Carnivora. **Chromosoma.** 24: 336-382.



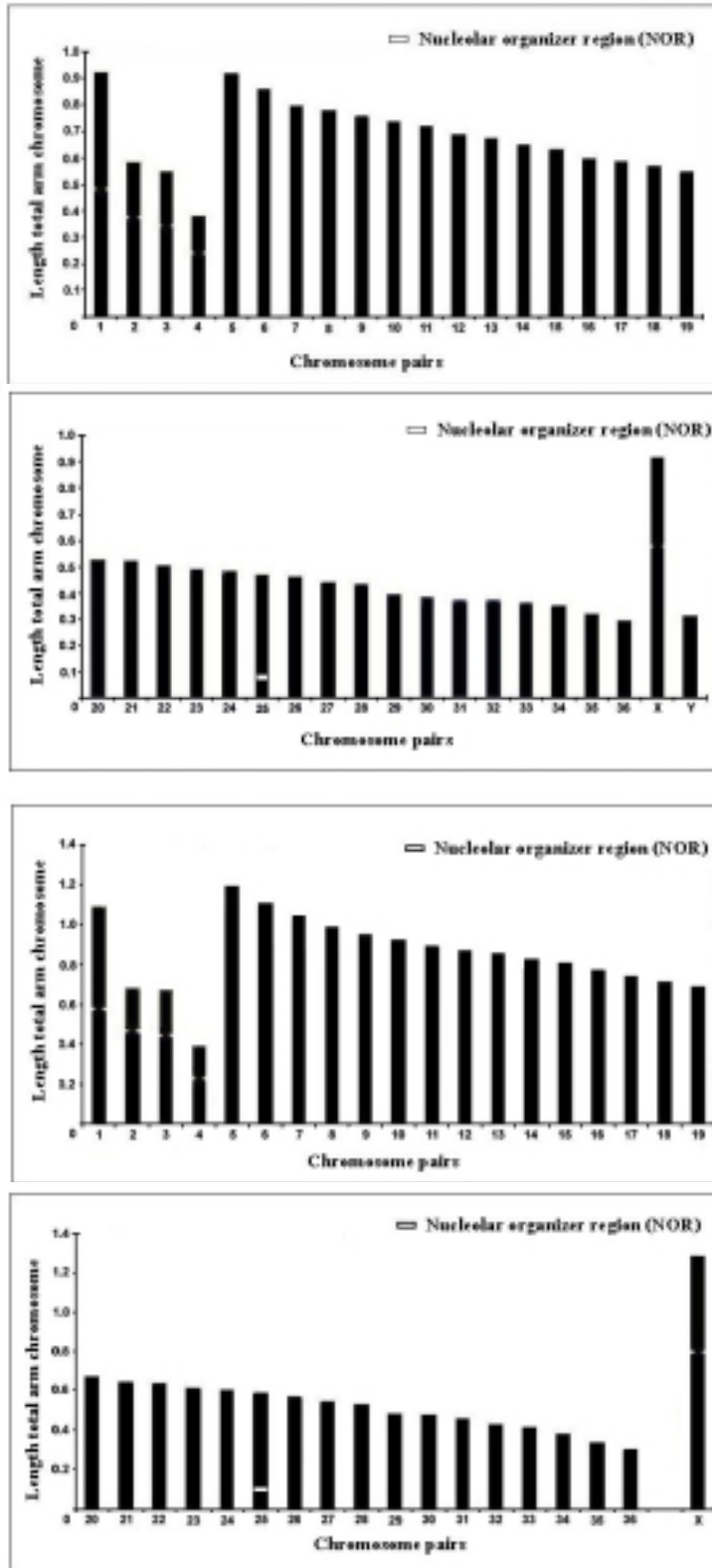
ภาพที่ 1 โครโมโซมจากเซลล์ระยะเมทาเฟส และคาริโอไทป์ของหมีควาย (*Ursus thibetanus*) เพศผู้ $2n$ (diploid) = 74 แท่ง



ภาพที่ 2 โครโมโซมจากเซลล์ระยะเมทาเฟส และคาริโอไทป์ของหมีควาย (*Ursus thibetanus*) เพศเมีย $2n$ (diploid) = 74 แท่ง



ภาพที่ 3 โครโมโซมจากเซลล์ระยะเมทาเฟสจากการย้อมสี Ag-NOR-banding (silver staining) ของหมีควาย (*Ursus thibetanus*) ลูกศรชี้แสดง satellite chromosome



ภาพที่ 4 อีดีโอแกรมของหมีควาย (*Ursus thibetanus*) เพศผู้ (ภาพบน) และเพศเมีย (ภาพล่าง)
 $2n$ (diploid) = 74 แท่ง

ตารางที่ 1 ค่าเฉลี่ย (mean) ความยาวของแขนโครโมโซมข้างสั้น (Ls) ข้างยาว (LI) ความยาวของโครโมโซมแต่ละคู่ (LT) เป็นเซนติเมตร ค่าเฉลี่ย relative length (RL) centromeric index (CI) ขนาดและชนิดโครโมโซมของหมีควาย (*Ursus thibetanus*) เพศผู้จาก 20 เซลล์

โครโมโซมคู่ที่	Ls	LI	LT	RL	CI	ขนาดโครโมโซม	ชนิดโครโมโซม
1	0.440	0.480	0.920	0.071	0.521	L	m
2	0.205	0.373	0.578	0.045	0.645	M	sm
3	0.200	0.345	0.545	0.042	0.633	M	sm
4	0.135	0.243	0.378	0.029	0.642	M	sm
5	0.000	0.915	0.915	0.071	1.000	L	t
6	0.000	0.858	0.858	0.066	1.000	L	t
7	0.000	0.793	0.793	0.061	1.000	L	t
8	0.000	0.778	0.778	0.060	1.000	L	t
9	0.000	0.755	0.755	0.059	1.000	L	t
10	0.000	0.733	0.733	0.057	1.000	L	t
11	0.000	0.718	0.718	0.056	1.000	L	t
12	0.000	0.688	0.688	0.053	1.000	L	t
13	0.000	0.673	0.673	0.052	1.000	L	t
14	0.000	0.648	0.648	0.050	1.000	L	t
15	0.000	0.630	0.630	0.049	1.000	L	t
16	0.000	0.595	0.595	0.046	1.000	M	t
17	0.000	0.585	0.585	0.045	1.000	M	t
18	0.000	0.565	0.565	0.044	1.000	M	t
19	0.000	0.545	0.545	0.042	1.000	M	t
20	0.000	0.525	0.525	0.041	1.000	M	t

ตารางที่ 1 ค่าเฉลี่ย (mean) ความยาวของแขนโครโมโซมข้างสั้น (Ls) ข้างยาว (LI) ความยาวของโครโมโซมแต่ละคู่ (LT) เป็นเซนติเมตร ค่าเฉลี่ย relative length (RL) centromeric index (CI) ขนาดและชนิดโครโมโซมของหมีควาย (*Ursus thibetanus*) เพศผู้จาก 20 เซลล์ (ต่อ)

โครโมโซม คู่ที่	Ls	LI	LT	RL	CI	ขนาด โครโมโซม	ชนิด โครโมโซม
21	0.000	0.520	0.520	0.040	1.000	M	t
22	0.000	0.505	0.505	0.039	1.000	M	t
23	0.000	0.490	0.490	0.038	1.000	M	t
24	0.000	0.483	0.483	0.037	1.000	M	t
25	0.000	0.470	0.470	0.036	1.000	M	t
26	0.000	0.458	0.458	0.035	1.000	M	t
27	0.000	0.438	0.438	0.034	1.000	M	t
28	0.000	0.430	0.430	0.033	1.000	M	t
29	0.000	0.395	0.395	0.031	1.000	M	t
30	0.000	0.385	0.385	0.030	1.000	M	t
31	0.000	0.370	0.370	0.029	1.000	M	t
32	0.000	0.370	0.370	0.029	1.000	M	t
33	0.000	0.360	0.360	0.028	1.000	M	t
34	0.000	0.350	0.350	0.027	1.000	M	t
35	0.000	0.320	0.320	0.025	1.000	M	t
36	0.000	0.293	0.293	0.023	1.000	M	t
X	0.335	0.580	0.915	0.071	0.634	L	sm
Y	0.000	0.310	0.310	0.024	1.000	M	t

L = โครโมโซมขนาดใหญ่

M = โครโมโซมขนาดกลาง

m = โครโมโซมชนิดเมทาเซนทริก

sm = โครโมโซมชนิดซับเมทาเซนทริก

t = โครโมโซมชนิดทีโลเซนทริก

ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ย (mean) ความยาวของแขนโครโมโซมข้างสั้น (Ls) ข้างยาว (LI) ความยาวของโครโมโซมแต่ละคู่ (LT) เป็นเซนติเมตร ค่าเฉลี่ย relative length (RL) centromeric index (CI) ขนาดและชนิดโครโมโซมของหมีควาย (*Ursus thibetanus*) เพศเมียจาก 20 เซลล์

โครโมโซมคู่ที่	Ls	LI	LT	RL	CI	ขนาดโครโมโซม	ชนิดโครโมโซม
1	0.510	0.583	1.093	0.067	0.533	L	m
2	0.210	0.470	0.680	0.051	0.691	M	sm
3	0.223	0.450	0.673	0.041	0.669	M	sm
4	0.155	0.235	0.390	0.024	0.603	M	sm
5	0.000	1.195	1.195	0.073	1.000	L	t
6	0.000	1.108	1.108	0.068	1.000	L	t
7	0.000	1.045	1.045	0.064	1.000	L	t
8	0.000	0.990	0.990	0.060	1.000	L	t
9	0.000	0.953	0.953	0.058	1.000	L	t
10	0.000	0.925	0.925	0.056	1.000	L	t
11	0.000	0.890	0.890	0.054	1.000	L	t
12	0.000	0.870	0.870	0.053	1.000	L	t
13	0.000	0.855	0.855	0.052	1.000	L	t
14	0.000	0.830	0.830	0.051	1.000	L	t
15	0.000	0.810	0.810	0.049	1.000	L	t
16	0.000	0.773	0.773	0.047	1.000	M	t
17	0.000	0.743	0.743	0.045	1.000	M	t
18	0.000	0.715	0.715	0.044	1.000	M	t
19	0.000	0.693	0.693	0.042	1.000	M	t
20	0.000	0.675	0.675	0.041	1.000	M	t

ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ย (mean) ความยาวของแขนโครโมโซมข้างสั้น (Ls) ข้างยาว (LI) ความยาวของโครโมโซมแต่ละคู่ (LT) เป็นเซนติเมตร ค่าเฉลี่ย relative length (RL) centromeric index (CI) ขนาดและชนิดโครโมโซมของหมีควาย (*Ursus thibetanus*) เพศเมียจาก 20 เซลล์ (ต่อ)

โครโมโซม คู่ที่	Ls	LI	LT	RL	CI	ขนาด โครโมโซม	ชนิด โครโมโซม
21	0.000	0.645	0.645	0.039	1.000	M	t
22	0.000	0.635	0.635	0.039	1.000	M	t
23	0.000	0.610	0.610	0.037	1.000	M	t
24	0.000	0.600	0.600	0.037	1.000	M	t
25	0.000	0.590	0.590	0.036	1.000	M	t
26	0.000	0.570	0.570	0.035	1.000	M	t
27	0.000	0.543	0.543	0.033	1.000	M	t
28	0.000	0.530	0.530	0.032	1.000	M	t
29	0.000	0.483	0.483	0.031	1.000	M	t
30	0.000	0.480	0.480	0.029	1.000	M	t
31	0.000	0.460	0.460	0.028	1.000	M	t
32	0.000	0.430	0.430	0.026	1.000	M	t
33	0.000	0.415	0.415	0.025	1.000	M	t
34	0.000	0.380	0.380	0.023	1.000	M	t
35	0.000	0.340	0.340	0.021	1.000	M	t
36	0.000	0.303	0.303	0.018	1.000	M	t
X	0.483	0.798	1.280	0.078	0.623	L	sm

L = โครโมโซมขนาดใหญ่

M = โครโมโซมขนาดกลาง

m = โครโมโซมชนิดเมทาเซนทริก

sm = โครโมโซมชนิดซับเมทาเซนทริก

t = โครโมโซมชนิดทีโลเซนทริก