บทที่ 2
วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. ลักษณะทั่วไปและอนุกรมวิธานของสัตว์จำพวกค่างในประเทศไทย

ไพรเมทแบ่งได้เป็น 13 วงศ์ (family) ซึ่งในปัจจุบันพบว่ามีไพรเมททั่วโลก 60 สกุล และ 232 ชนิด (species) (Wilson and Cole, 2000)

ในประเทศไทยมีสัตว์จำพวกลิงอยู่ทั้งหมด 3 วงศ์ 5 สกุล และ 13 ชนิด (Lekagul and McNeely, 1977, 1988) ได้แก่ วงศ์ Loridae หรือวงศ์ลิงลม เป็นพวกโปรไซเมียน พบสกุลและชนิดเดียว คือ ลิงลม (slow loris, *Nycticebus coucang* Boddaert, 1785) อาศัยอยู่ในป่าทั่ว ๆ ไปของประเทศไทย วงศ์ Hylobatidae หรือวงศ์ชะนี เป็นพวกลิงไม่มีหางขนาดเล็ก (lesser apes) มีรายงานว่าชะนีอาศัยกระจายอยู่ทั่วทุกภาคของประเทศไทย พบ 3 ชนิด ได้แก่ ชะนีมือขาวหรือชะนีธรรมดา (white-handed gibbon, *Hylobates lar* Linnaeus, 1771) ชะนีมือดำ (agile gibbon หรือ dark-handed gibbon, *Hylobates agilis* Cuvier, 1821) และชะนีมงกุฎ (pileated gibbon, *Hylobates pileatus* Gray, 1842) วงศ์ Cercopithecidae หรือพวกลิงโลกเก่า มีอยู่ 2 วงศ์ย่อย (subfamily) (Wilson and Cole, 2000) ได้แก่ วงศ์ย่อย Cercopithecinae พบสกุลเดียว 5 ชนิด ได้แก่ ลิงเสน (stump-tailed macaque, *Macaca arctoides* Geoffroy, 1831) ลิงไอ้เงี๊ยะหรือวอกภูเขา (Assam macaque, *Macaca assamensis* McClelland, 1839) ลิงแสม (long-tailed macaque, *Macaca fascicularis* Raffles, 1821) ลิงวอกธรรมดา (rhesus monkey, *Macaca mulatta* Zimmermann, 1780) และลิงกัง (pig-tailed macaque, *Macaca nemestrina* Linnaeus, 1766) วงศ์ย่อย Colobinae พบ 2 สกุล 4 ชนิด ได้แก่ สกุล *Presbytis* พบชนิดเดียว คือ ค่างดำ (banded langur หรือ banded leaf monkey, *Presbytis femoralis* Raffles, 1821) สกุล *Trachypithecus* พบ 3 ชนิด ได้แก่ ค่างหงอกหรือค่างเทา (silvered langur, *Trachypithecus cristatus* Raffles, 1821) ค่างแว่นถิ่นใต้ (dusky langur หรือ dusky leaf monkey, *Trachypithecus obscurus* Ried, 1837) ค่างแว่นถิ่นเหนือ (Phryre's langur หรือ Phryre's leaf monkey, *Trachypithecus phayrei* Blyth, 1847) (ธีรภัทร ประยูรสิทธิ, 2546)

ค่าง (langur) เป็นสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม (mammals) จัดอยู่ในอันดับไพรเมท (order Primate) ซึ่งสัตว์ในอันดับนี้จะแบ่งออกเป็น 2 อันดับย่อย (suborder) ตามลักษณะของจมูก คือ อันดับย่อยโปรไซมิอี (suborder Prosimiae) สัตว์ในกลุ่มนี้จะเรียกว่าพวกโปรไซเมียน (prosimians) และอีกหนึ่งอันดับย่อย คือ อันดับย่อยไซมิอี (suborder Simiae) เรียกสัตว์ในกลุ่มนี้ว่า พวกไซเมียน

(saimians) พวกโปรไซเมียนเป็นไพรเมทที่มีลักษณะโบราณซึ่งจะมีแผ่นหนังเรียบเหนือริมฝีปากจนถึงจมูก (noseleather) และจมูกจะมีลักษณะชุ่มชื้น และพบว่ามดลูกมีลักษณะเป็น 2 แขนง สัตว์ในกลุ่มนี้ ได้แก่ ลีเมอร์ (lemurs) และลิงลม (loris) ส่วนพวกไซเมียนจะไม่มีแผ่นหนังเรียบแต่บนจมูกจะมีขน จมูกแห้ง และมีมดลูกเป็นถุงเดียว สัตว์ในกลุ่มนี้ ได้แก่ ทาร์เซียร์ (tarsiers) ลิงโลกใหม่ (new world monkeys) ซึ่งเป็นลิงที่อาศัยอยู่ในบริเวณเขตร้อนของทวีปอเมริกา ลิงโลกเก่า (old world monkeys) ซึ่งอาศัยอยู่ในทวีปเอเชีย และทวีปแอฟริกา รวมทั้งพวกลิงไม่มีหาง (apes) ซึ่งลิงเหล่านี้ ได้แก่ ชะนี อุรังอุตัง กอริลลา ชิมแพนซี และมนุษย์ (นิตยา เลาหะจินดา, 2539)

ปัจจุบัน พบว่าการจัดค่างแต่ละชนิดให้อยู่ในสกุลใดนั้นยังเป็นข้อถกเถียงกันอยู่ ทำให้ค่างในแต่ละชนิดที่เป็นชนิดเดียวกันมีชื่อวิทยาศาสตร์ที่แตกต่างกัน ซึ่งขึ้นอยู่กับผู้แต่งว่าจะยึดรายงานของนักวิจัยคนใดในการอ้างอิงชื่อวิทยาศาสตร์ของค่างที่ทำการศึกษา

นักชีววิทยาได้จัดค่างให้อยู่ในวงศ์ลิงโลกเก่า (family Cercopithecidae) Parr (2003) ได้จำแนกค่างออกเป็นสองสกุล ได้แก่ สกุล *Semnopithecus* และ *Presbytis* ส่วน Lekagul and McNeely (1977) จัดไว้ในสกุลเดียว คือ *Presbytis* ค่างมีลักษณะรูปร่างเพรียวบาง (slander body and limb) มีหางยาวมากกว่าความยาวของหัวและลำตัว (เป็นลักษณะเด่นที่สุดของค่าง) มีมือและเท้าที่ยาวเรียวกว่าลิง (*Macaca* spp.) แต่มีนิ้วหัวแม่มือสั้นกว่า มีขาที่ยาวกว่าแขน มีระบบทางเดินอาหารที่ต่างไปจากลิง ลูกที่เกิดใหม่ในค่างสกุล *Semnopithecus* จะมีสีทอง แต่ลูกที่เกิดใหม่ในค่างสกุล *Presbytis* จะมีสีออกขาวและมีสีดำพาดที่หลัง (Lekagul and McNeely, 1988)

ค่างในประเทศไทยมี 4 ชนิด ได้แก่

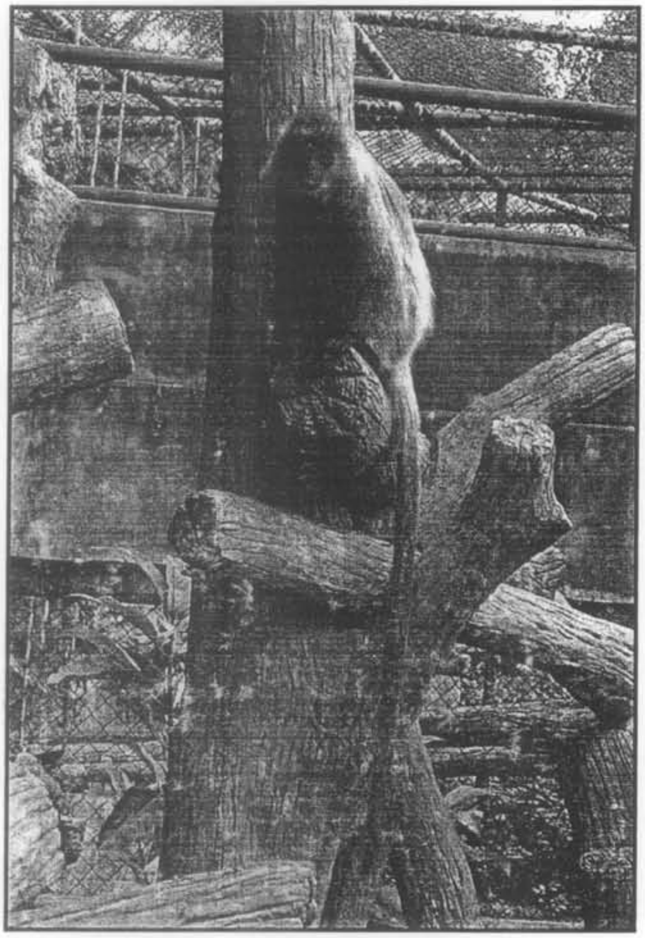
1. ค่างแว่นถิ่นเหนือ (*Semnopithecus phayrei* Blyth, 1847) จะมีวงตาสีขาวแต่ไม่ชัดเจนเท่ากับค่างแว่นถิ่นใต้ นอกจากนี้บริเวณริมฝีปากจะมีสีขาวทั้งขอบบนและล่าง ลำตัวด้านหลังขนจะมีสีเทาหรือสีน้ำตาลเทา ส่วนลำตัวด้านท้องขนจะมีสีออกเทา แสดงในภาพที่ 1 สำหรับการกระจายของค่างแว่นถิ่นเหนือในประเทศไทย คือ ป่าทางภาคเหนือ อีสานตอนบน และภาคตะวันตก นอกจากนี้ยังมีการกระจายในประเทศพม่า ลาว และใต้สุดของประเทศจีน ป่าสำคัญของค่างแว่นถิ่นเหนือ เช่น เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูเขียว อุทยานแห่งชาติเขาใหญ่ เป็นต้น (Lekagul and McNeely, 1988)

ภาพที่ 1 ลักษณะทั่วไปของค่างแว่นถิ่นเหนือ (Phayre's langur)

2. ค่างแว่นถิ่นใต้ (*Semnopithecus obscurus* Ried, 1837) มีลักษณะวงตาสีขาวเหมือนกับค่างแว่นถิ่นเหนือแต่จะเห็นได้ชัดเจนกว่า บริเวณริมฝีปากมีสีขาวทั้งขอบบนและล่างเหมือนกันกับค่างแว่นถิ่นเหนือ ลำตัวด้านหลังมีขนสีน้ำตาลหรือสีเทาเข้ม ซึ่งมีสีขนเข้มกว่าค่างแว่นถิ่นเหนือมาก แสดงในภาพที่ 2 สำหรับการกระจายของค่างแว่นถิ่นใต้ จะเริ่มจากในป่าตั้งแต่จังหวัดเพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ จนสุดภาคใต้ นอกจากนี้ยังพบค่างแว่นถิ่นใต้ได้ในประเทศมาเลเซีย ป่าที่สำคัญของค่างแว่นถิ่นใต้ เช่น อุทยานแห่งชาติแก่งกระจาน เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าคลองแสง เป็นต้น (Lekagul and McNeely, 1988)

ภาพที่ 2 ลักษณะทั่วไปของค่างแว่นถิ่นใต้ (dusky langur)

3. ค่างหงอก หรือค่างเทา (*Semnopithecus cristata* Raffles, 1821) ค่างเทามีใบหน้าดำ ไม่มีแว่น ริมฝีปากไม่มีสีขาว ลักษณะเด่น คือ มีขนสีขาวแซมกับขนสีดำทำให้สังเกตเห็นเป็นสีเทา แสดงในภาพที่ 3 ค่างเทามีการกระจายในป่าของภาคอีสานตอนล่าง ภาคตะวันออก ภาคตะวันตก และภาคใต้ตอนล่าง ตั้งแต่ จังหวัดสตูลลงไป นอกจากนี้ยังพบค่างเทาในประเทศมาเลเซีย อินโดนีเซีย ป่าที่สำคัญของค่างเทา เช่น อุทยานแห่งชาติปางสีดา ยังมีรายงานว่าพบค่างเทาที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูเขียว ภาคใต้ก็พบได้ง่ายที่อุทยานแห่งชาติบูโด-สุไหงปาดี (Lekagul and McNeely, 1988)



ภาพที่ 3 ลักษณะทั่วไปของค่างหงอก หรือค่างเทา (silvered langur)

4. ค่างดำ (*Presbytis melalophos femoralis* Martin, 1838) ค่างดำมีสีเปลี่ยนแปลงได้มาก มีตั้งแต่สีดำจนถึงสีน้ำตาลไหม้จนถึงสีเทาอ่อน และสีน้ำตาลอ่อนบางครั้งอาจพบค่างดำมีสีออกขาว สีด้านล่างลำตัวปกติจะอ่อนกว่าสีด้านบนเล็กน้อย บางตัวอาจมีสีออกขาวที่หน้าอก ด้านในของขามีสีขาวเห็นได้ชัดเจน จากโคนขาด้านในจะมีสีขาวมาถึงบริเวณหัวเข่า และบางตัวอาจมีสีขาวเลยมาถึงบริเวณข้อเท้า ด้านล่างของส่วนหางสีอ่อนกว่าด้านบน ริมฝีปากบนและล่างมีขอบสีขาว แต่วงแหวนสีขาวรอบตาของค่างดำไม่เด่นชัดเหมือนอย่างค่างแว่น มีขนแหลมยาวเป็นสันบนหัว และตั้งขึ้นจนดูคล้ายจุก แสดงในภาพที่ 4 ลูกที่เกิดใหม่ของค่างดำจะมีสีเข้มที่แนวสันหลังและที่ไหล่ ค่างดำสามารถพบได้ในประเทศพม่า ไทย มาเลเซีย เกาะสุมาตรา และเกาะบอร์เนียว สำหรับประเทศไทยพบตามแนวเทือกเขาตะนาวศรีและทางภาคใต้ เคยพบมากที่จังหวัดตรัง กระบี่ พังงา และสุราษฎร์ธานี โดยสามารถพบค่างดำได้ตามป่าทั่วไป หรือป่าชายฝั่งทะเล และป่าชายฝั่งที่เป็นที่

ลุ่มต่ำ อยู่ตามสวนยางและชอบออกมาหาอาหารตามทุ่งนาใกล้ ๆ สวน อาหารที่ค่างดำชอบกิน ได้แก่ ใบไม้ ผลไม้ และแมลง ค่างดำชอบอยู่เป็นฝูงเล็ก ๆ 5 - 6 ตัว (Lekagul and McNeely, 1988)

ภาพที่ 4 ลักษณะทั่วไปของค่างดำ (banded langur)

2. การย้อมสีโครโมโซม

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเซลล์และเตรียมโครโมโซม เพื่อให้สามารถศึกษาโครโมโซมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ได้อย่างชัดเจนโดยเห็นรูปร่าง และนับจำนวนโครโมโซมได้อย่างถูกต้อง จำเป็นต้องมีการย้อมสีให้ติดเฉพาะโครโมโซม ซึ่งมีหลายวิธีให้เลือกใช้ตามจุดประสงค์ของการศึกษา (Halnan, 1989) การย้อมสีโครโมโซมแบบธรรมดาช่วยบอกจำนวน และชนิดของโครโมโซมประจำชนิดพันธุ์นั้น ๆ โดยเป็นการย้อมประเภทติดส่วนของกรดนิวคลีอิก (nucleic acid) ดังนั้นจะเห็นโครโมโซมติดสีเข้มทั้งแท่ง สีที่ใช้ย้อม เช่น Orcein, Carmine และที่นิยมใช้มากที่สุดคือ Giemsa's แต่การย้อมสีโครโมโซมแบบธรรมดาในบางกรณีสามารถจำแนกโครโมโซมได้เพียงบางแท่งเท่านั้น ไม่สามารถระบุแน่ชัดได้ว่าโครโมโซมบางแท่งเป็นโครโมโซมแท่งที่เท่าใด และจับคู่ไม่ได้ ในช่วงปี ค.ศ. 1970-1980 ได้มีผู้คิดค้นเทคนิคการย้อมแถบสีแบบต่าง ๆ เกิดขึ้นอีกมากมาย แต่ละวิธี

ปรับปรุงให้เหมาะสมกับตัวอย่างเซลล์ที่ใช้ วิธีการย้อมแถบสีแบบจี จะต้องเหนี่ยวนำให้เกิดแถบ โดยใช้เอนไซม์ทริปซิน (trypsin) แล้วย้อมด้วยสีจิมซ่า (Giemsa's) จะทำให้เห็นโครโมโซมเป็นแถบ (bands) อาศัยคุณสมบัติของสีที่ติดส่วนของโปรตีน ซึ่งสีจะติดได้ดีในส่วนของโปรตีนที่มีกรดอะมิโนไลซีน (lysine) และอาร์จินีน (arginine) อยู่หนาแน่น ในส่วนที่เป็นเฮเทอโรโครมาติน (heterochromatin) ซึ่งเป็นบริเวณที่ยีนไม่ทำงาน และไม่มีการเกิดกระบวนการสังเคราะห์โปรตีน สายดีเอ็นเอ (DNA, deoxyribonucleic acid) ที่พันกันแน่น จะถูกเอนไซม์ทริปซินเข้าไปย่อยโปรตีนได้น้อยทำให้ส่วนนี้ติดสีเข้ม ในทางตรงกันข้ามกับส่วนที่เป็นยูโครมาติน (euchromatin) จะไม่ค่อยติดสี จึงเห็นเป็นแถบสว่าง (Rooney, 2001)

3. Fluorescence *In situ* hybridization (FISH)

3.1 หลักการของเทคนิค FISH

ความเข้าใจในความซับซ้อนของจีโนม (genomes) เป็นไปอย่างรวดเร็วในระยะเวลา 50 ปี ที่ผ่านมาเป็นผลให้งานทางด้านนี้มีนักวิทยาศาสตร์สนใจอย่างมาก ไม่เฉพาะทางชีววิทยา แต่รวมทั้งเคมี และฟิสิกส์ด้วย จากความรู้ที่ได้เกี่ยวกับจีโนมนี้ จึงได้มีการพัฒนาเทคนิคที่ใช้ในการศึกษาจีโนมของสิ่งมีชีวิตเพิ่มมากขึ้น เช่น เทคนิคฟลูออเรสเซนซ์อินซิทูไฮบริไดเซชัน (fluorescence *In Situ* hybridization) และการประยุกต์เทคนิคใหม่ ๆ เพื่อใช้ในการวิเคราะห์จีโนม (Difilippantonio and Reid, 2000)

เทคนิค FISH เป็นเทคนิคทางพันธุศาสตร์เซลล์ระดับโมเลกุล (molecular cytogenetics) เป็นการย้อมสีพิเศษเพื่อให้ทราบตำแหน่งของยีนหรือลำดับของเบสที่สนใจบนแท่งโครโมโซม เทคนิคนี้ต้องอาศัยงานด้าน *In situ* hybridization โดยวิธีการให้มีการจับคู่กันระหว่าง ดีเอ็นเอเป้าหมาย (target DNA) กับดีเอ็นเอโพรบ (DNA probe) โดยดีเอ็นเอเป้าหมาย หมายถึง ดีเอ็นเอหรือยีนที่ต้องการค้นหาว่ามีตำแหน่งใดบนแท่งโครโมโซม และ ดีเอ็นเอโพรบ คือดีเอ็นเอที่ใช้ในการติดตามตำแหน่งของดีเอ็นเอเป้าหมายโดยที่ดีเอ็นเอเป้าหมายกับโพรบจะต้องมีเบสที่เป็นคู่สมกัน (complementary) ขนาดของโพรบที่เหมาะสมกับการตรวจตำแหน่งโครโมโซมได้ชัดเจน คือ 200-400 เบส (อมรา คัมภิรานนท์, 2540)

เทคนิค FISH นั้นยังมีการประยุกต์ใช้ที่แตกต่างกันออกไป ขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ที่ศึกษา เช่น การใช้โครโมโซมเพ้นทิ้งโพรบ (chromosome painting probes) ซึ่งเป็นโพรบที่มีลำดับเบสของดีเอ็นเอทั้งโครโมโซม สำหรับบางบริเวณในจีโนมจะใช้โพรบสายสั้น ๆ ซึ่งเทคนิคประยุกต์ต่าง ๆ เหล่านี้ ได้แก่ การกำหนดตำแหน่งของยีนระหว่างชนิดพันธุ์ (determination of

orthologous regions between species), spectral karyotyping (SKY), comparative genome hybridization (CGH), การทำแผนที่ของยีน (gene mapping) และการทำแผนที่โครโมโซม (chromosome mapping) (Spurbeck et al., 1996)

3.2 การเตรียมตัวอย่างทางพันธุศาสตร์

จากที่ได้กล่าวมาข้างต้น มีหลายเทคนิคที่ใช้ในการตรวจสอบลำดับของดีเอ็นเอที่จำเพาะ (specific DNA sequences) ในจีโนม การเตรียมโครโมโซมในระยะเมทาเฟส (metaphase) จึงมีความสำคัญมาก ซึ่งต้องคำนึงถึงสารที่ใช้หรือตัวอย่างที่เตรียมให้เหมาะสมกับเทคนิคที่ต้องการศึกษา เช่น การกำจัดไซโทพลาสซึม (cytoplasm) และขยะที่อยู่กับนิวเคลียส (nuclear debris) ออกโดยการใช้ proteinase หรือ pepsin เพื่อลดสัญญาณรบกวนจากการจับกันระหว่างโพรบกับโปรตีน ไลปิด (lipid) และคาร์โบไฮเดรต (carbohydrate) การใช้ RNAase ย่อย RNA เพื่อลดสัญญาณรบกวนจาก RNA การเตรียมโครโมโซมที่ไม่ดีจะทำให้รูปแบบของการไฮบริไดซ์ระหว่างดีเอ็นเอโพรบและดีเอ็นเอเป้าหมายนั้นผิดพลาด ซึ่งสามารถเตรียมให้ดีได้จากการเตรียมในสภาพที่มีการควบคุมทั้งความชื้นและเวลาที่ใช้ในการทำให้แห้ง (drying times) (Spurbeck et al., 1996)

3.3 การเตรียมดีเอ็นเอโพรบ

หลักการเตรียมโพรบโดยส่วนใหญ่นั้นจะคล้ายกัน แต่จะต่างกันตรงที่วิธีการที่ใช้ในการเตรียม โดยทั่วไปดีเอ็นเอโพรบก็จะประกอบด้วยจีโนมิคดีเอ็นเอสายสั้น ๆ จากการเพิ่มปริมาณ cDNA โดยการแทรกเข้าไปในเวคเตอร์ (vector) ตัวอย่างเวคเตอร์ เช่น pasmid artificial chromosomes (PACs), yeast artificial chromosomes (YACs), bacterial artificial chromosomes (BACs), human artificial chromosomes (HACs) โพรบเหล่านี้ใช้สำหรับการทำแผนที่ยีนหรือบอกบริเวณแตกหักของโครโมโซม และช่วยในการจำแนกโครโมโซม

Spectral karyotyping (SKY) เป็นชื่อเรียกเทคนิค FISH อีกเทคนิคหนึ่งซึ่งต้องมีการเตรียมโพรบแบบเป็นชุด เทคนิคนี้เรียกว่า paints ในแต่ละโครโมโซมจะมีการติดฉลากด้วยสารฟลูออเรสเซนซ์ที่จำเพาะ ดังนั้นจึงเป็นการเตรียมโพรบแบบตลอดทั้งความยาวของโครโมโซม การเตรียมโพรบแบบนี้จะต้องใช้เครื่อง flow sorted chromosome ในการแยกโครโมโซมแต่ละแท่ง โดยจะแยกโครโมโซมตามขนาดและปริมาณของนิวคลีโอไทด์ (Gray et al., 1979; Carter et al., 1990) สามารถเพิ่มปริมาณโพรบของแต่ละโครโมโซมและติดฉลากโพรบได้โดยใช้เทคนิคที่เรียกว่า DOP-PCR (degenerate oligonucleotide primer) (Telenius et al., 1992)

3.4 การติดฉลากดีเอ็นเอโพรบ

โพรบสามารถที่จะติดฉลากด้วยสารฟลูออเรสเซนซ์หลายชนิด หรือที่ไม่ใช่สารฟลูออเรสเซนซ์ ประเภทของการติดฉลากนั้นขึ้นอยู่กับอุปกรณ์ที่มีอยู่ จุดประสงค์ของการทดลอง มูลค่าหรือขึ้นกับความชอบของบุคคล การติดฉลากด้วยสารฟลูออเรสเซนซ์ เรียกว่า "การติดฉลากแบบทางตรง" ส่วนการติดฉลากด้วยสารที่ไม่ใช่สารฟลูออเรสเซนซ์ เรียกว่า "การติดฉลากแบบทางอ้อม" ซึ่งสามารถตรวจสอบได้ด้วยสารตัวที่สองหรือสามที่เป็นสารฟลูออเรสเซนซ์ (Difilippantonio and Ried, 2000)

3.5 การไฮบริไดซ์โพรบกับตัวอย่างโครโมโซมที่ต้องการศึกษา

วิธีการในขั้นนี้จะต่างจากขั้นอื่น ๆ เล็กน้อย โดยจะต้องกำจัดส่วนของดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสซ้ำ ๆ กันเสียก่อนโดยการใช้ competitor Cot I DNA (Landegent et al., 1987; Lichter et al., 1988; Pinkel et al., 1988) โดยที่ Cot I DNA จะไปควบคุมองค์ประกอบของโพรบที่มีลำดับเบสซ้ำ ๆ กัน และกระจัดกระจายอยู่ภายในจีโนม เช่น Alu, LINE, SINE และ B1 หากไม่กำจัดลำดับเบสที่ซ้ำกันของโพรบนี้ จะเป็นผลให้โพรบไปจับกับทุกบริเวณของโครโมโซม ซึ่งไม่ใช่บริเวณที่สนใจศึกษา อย่างไรก็ตามถ้าโพรบไม่มีบริเวณของเบสที่ซ้ำ กรณีเช่น cDNA โพรบก็จะตกตะกอนเมื่อรวมตัวกับดีเอ็นเอ แต่ทำให้แขวนลอยใหม่ได้โดยใช้ formamide/dextran sulfate/SSC เป็นบัฟเฟอร์ และทำให้โพรบเสียสภาพที่อุณหภูมิ 80°C แล้วตามด้วยการทำให้เย็นทันที (ไม่มี Cot I) หรือบ่มที่ 37°C เพื่อป้องกันไม่ให้ Cot I ไฮบริไดซ์กับตัวอย่างของโครโมโซมที่ต้องการศึกษา ทำให้โครโมโซมที่อยู่บนสไลด์เสียสภาพด้วยการบ่มที่ 80°C ใน formamide ตามด้วยการดึงน้ำออก (dehydration) ด้วย ethanol series ที่เย็น โพรบจะเชื่อมรวมกับโครโมโซมที่ 37°C ในที่มืดและมีความชื้น เวลาที่ใช้ในการไฮบริไดซ์ของโพรบกับโครโมโซมตัวอย่างนั้นขึ้นอยู่กับชนิดพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตที่สนใจศึกษา ว่ามีความใกล้กันหรือมีความห่างไกลกันทางวิวัฒนาการ เช่น ถ้าหากเป็นการใช้โพรบของมนุษย์ไปจับหรือไฮบริไดซ์กับสัตว์ในกลุ่มลิง ค่าง และชะนีนั้น จะใช้เวลาประมาณ 24 ชั่วโมง ในการที่โพรบของมนุษย์จะจับกับโครโมโซมของลิง ค่าง และชะนี โดยทั่วไปแล้วจะใช้เวลาในการบ่มประมาณ 24-48 ชั่วโมง และ 40-72 ชั่วโมง สำหรับโพรบที่มีความซับซ้อน เช่น เทคนิค SKY และ CGH (Difilippantonio and Reid, 2000)

3.6 การตรวจสอบ และการแสดงผล

การตรวจหาตำแหน่งของยีนหรือช่วงลำดับเบสของดีเอ็นเอที่สนใจบนแท่งโครโมโซมใช้เทคนิค *In situ* hybridization ร่วมกับ immunocytochemistry กล่าวคือ มีการติดฉลากด้วยโมเลกุลของสารเคมีที่สามารถถูกติดตามได้ด้วยสารสีเรืองแสง (ซึ่งสามารถตรวจดูสารเรืองแสงได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์) วิธีการติดฉลากให้กับโพรบเป็นวิธีการทางอ้อม ทั้งนี้ให้โพรบติดเข้ากับโมเลกุลของสารเคมีที่เรียกว่า reporter molecule แล้วใช้เทคนิค immunocytochemistry โดยให้มีการจับกันระหว่าง antibody กับ reporter molecule โดยที่ antibody นี้เกาะอยู่กับสารเรืองแสงเรียบร้อยแล้ว (fluorophore) โมเลกุลของโพรบจับกับ reporter molecule ใช้เทคนิคที่เรียกว่า nick translation ตัวอย่างเช่น โพรบที่จับกับ reporter molecule ชนิด biotin แล้วเกิดเป็นโมเลกุลของ probe-biotin เรียกรวมกันว่า biotinylated DNA จากนั้นใช้เทคนิค *In situ* hybridization เพื่อให้โพรบตรวจตำแหน่งของดีเอ็นเอเป้าหมายบนแท่งโครโมโซม จากนั้นหยดสารเคมีชนิดที่มีความจำเพาะกับ biotin ได้แก่ avidin ลงไปจะเกิดปฏิกิริยาที่คล้ายกับ antigen-antibody ขณะเดียวกัน avidin นี้จะต้องมีโมเลกุลที่ต่อกับโมเลกุลของสารเรืองแสง เช่น fluorescein isothiocyanate (FITC), rhodamine และ Texas red เป็นต้น ซึ่งจะเรืองแสงภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ในสเปคตรัมสีส้มหรือเขียว ขึ้นอยู่กับชนิดของสารให้สีเรืองแสง สัญญาณที่ปรากฏบนโครโมโซมเรียกว่า hybridization signal และทำการย้อมแท่งโครโมโซมบริเวณอื่น ๆ โดยการย้อมด้วยสี DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride) ซึ่งจะทำให้แท่งโครโมโซมติดสีฟ้า หรือย้อมด้วยสี propidium iodide ซึ่งจะทำให้แท่งโครโมโซมโดยรวมติดสีส้ม (อมรา คัมภิรานนท์, 2540)

4. การศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ของค่าง

Chiarelli (1963) ทำการศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ของสัตว์จำพวกลิง 3 สกุล ๆ ละ 1 ชนิด พบว่าในสกุล *Hylobates* ได้แก่ ชะนีมือดำ (agile gibbon, *Hylobates agilis*) เพศผู้ มีจำนวนโครโมโซม 2n เท่ากับ 44 แท่ง ประกอบด้วยโครโมโซมร่างกาย ชนิดเมทาเซนทริก (metacentric) และซับเมทาเซนทริก (submetacentric) สำหรับโครโมโซมเพศ พบว่าโครโมโซมเอ็กซ์ (X chromosome) เป็นชนิดซับเมทาเซนทริก โครโมโซมวาย (Y chromosome) มีขนาดเล็กซึ่งจำแนกชนิดได้ไม่ชัดเจน ในสกุล *Colobus* ศึกษาในกลุ่มค่างแอฟริกา (king colobus, *Colobus polycomos)* เพศเมีย พบว่ามีจำนวนโครโมโซม 2n เท่ากับ 44 แท่ง มีโครโมโซมร่างกายชนิดเมทาเซนทริก และซับเมทาเซนทริก ไม่ได้ระบุโครโมโซมเพศว่าเป็นชนิดใด และสกุล *Presbytis* ศึกษาในค่างแว่นถิ่นใต้ (dusky langur, *Presbytis obscurus*) เพศผู้ พบว่ามีจำนวนโครโมโซม 2n เท่ากับ 44 แท่ง มีโครโมโซมเอ็กซ์เป็นชนิดเมทาเซนทริก โครโมโซมวายเป็นชนิดอะโครเซนทริก

(acrocentric) และพบว่าโครโมโซมคู่ที่ 21 ของสัตว์ทั้งสามชนิดมีลักษณะพิเศษเรียกว่า linear satellite ซึ่งเป็นลักษณะพิเศษที่ไม่เคยพบมาก่อน

Chiarelli (1966) ศึกษาอนุกรมวิธานของสัตว์ในกลุ่ม Catarrhine (กลุ่มลิงโลกเก่า ลิงไม่มีหาง และมนุษย์) สามารถแบ่งได้ 2 วงศ์ย่อย คือ วงศ์ย่อย Cercopithecoidea แบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มที่หนึ่งสกุล *Cercopithecus* กลุ่มที่สองสกุล *Papic, Macaca, Theropithecus* และ *Cercocebus* กลุ่มที่สามสกุล *Colobus, Presbytis* และ *Hylobates* วงศ์ย่อย Hominoidea มี 3 กลุ่ม คือพวกลิงไม่มีหาง ได้แก่ สกุล *Pan, Pongo* และ *Gorilla* ซึ่งสามารถที่จะจัดจำแนกทางอนุกรมวิธานได้ โดยมีจำนวนโครโมโซมที่แตกต่างกัน นอกจากนี้ในลิงอุรังอุตัง (orangutan) นั้นยังมีความแตกต่างจากสัตว์จำพวกลิงชนิดอื่น เมื่อทำการเปรียบเทียบลักษณะของโครโมโซม

Hsu and Benirschke (1970, 1971, 1973, 1975a, 1975b) ได้รายงานการศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ของสัตว์บางชนิดในวงศ์ย่อย Colobinae สกุล *Presbytis, Nasalis* และ *Pygathrix* พบว่าค่างเทา (silvered leaf monkeys, *Presbytis cristatus*, 2n=44) มีโครโมโซมร่างกายชนิดเมทาเซนทริก และซับเมทาเซนทริกจำนวน 40 แท่ง ชนิดอะโครเซนทริก 2 แท่ง โครโมโซมเอ็กซ์ และโครโมโซมวายเป็นชนิดซับเมทาเซนทริก ในค่างแว่นถิ่นใต้มีโครโมโซมร่างกายชนิดเมทาเซนทริก และซับเมทาเซนทริกจำนวน 40 แท่ง ชนิดอะโครเซนทริก 2 แท่ง โครโมโซมเอ็กซ์และโครโมโซมวายเป็นชนิดซับเมทาเซนทริก ใน entellus langur *(Presbytis entellus*, 2n=44) มีโครโมโซมร่างกายชนิดเมทาเซนทริก และซับเมทาเซนทริกจำนวน 40 แท่ง ชนิดอะโครเซนทริก 2 แท่ง โครโมโซมเอ็กซ์เป็นชนิดเมทาเซนทริก และโครโมโซมวายชนิดอะโครเซนทริก ในลิงงวง (proboscis monkey, *Nasalis larvatus*, 2n=48) มีโครโมโซมร่างกายชนิดเมทาเซนทริก และซับเมทาเซนทริกจำนวน 46 แท่ง โครโมโซมเอ็กซ์เป็นชนิดซับเมทาเซนทริก และโครโมโซมวายชนิดอะโครเซนทริก ในค่างห้าสี (douc langur, *Pygathrix nemaeus*, 2n=44) มีโครโมโซมร่างกายชนิดเมทาเซนทริก และซับเมทาเซนทริก 40 แท่ง ชนิดอะโครเซนทริก 2 แท่ง โครโมโซมเอ็กซ์เป็นชนิดเมทาเซนทริก และโครโมโซมวายชนิดอะโครเซนทริก

Stanyon et al. (1995) ใช้เทคนิคทางพันธุศาสตร์โมเลกุล ในการวิเคราะห์หาตำแหน่งของ NOR-bearing หรือโครโมโซมเครื่องหมาย (marked chromosomes) ในสัตว์กลุ่มลิงไม่มีหางขนาดเล็ก (lesser apes) วงศ์ Hylobatidae และกลุ่มลิงโลกเก่า (วงศ์ Cercopithecidae) โดยทำการไฮบริไดเซชัน (hybridization) ซึ่งใช้โพรบโครโมโซมของมนุษย์ในสัตว์จำพวกลิง ได้แก่ *Hylobates lar, H. syndactylus, H. concolor, Cercopithecus aethiops, Macaca fuscata, Colobus guereza* และ *Presbytis cristata* พบว่ามีโครโมโซมเครื่องหมายทั้งในวงศ์ Hylobatidae และวงศ์ Cercopithecidae ดังนั้นจึงไม่สามารถใช้การมีโครโมโซมเครื่องหมายแยกกลุ่มของชะนีออกจากวงศ์ Hylobatidae

หรือรวมวงศ์ Hylobatidae เข้ากับลิงกลุ่มอื่น ๆ ได้ การทำ chromosome painting เป็นเครื่องมือที่ช่วยแก้ปัญหาเกี่ยวกับโครโมโซมคู่เหมือน หรือช่วยในการจัดกลุ่มของชนิดพันธุ์ที่ยังสับสน และการทำ chromosome painting ยังช่วยในการศึกษาเชิงวิวัฒนาการ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในด้านที่เกี่ยวกับชนิดพันธุ์และอนุกรมวิธาน

Wang et al. (1997) ศึกษาชนิดพันธุ์ของค่างจีนกลุ่มลิงจมูกแบน (snub-nosed monkey, *Rhinopithecus* sp.) ซึ่งพบว่ายังไม่มีการศึกษาโดยใช้ข้อมูลทางด้านโมเลกุล ดังนั้นเพื่อเป็นการหาความสัมพันธ์ของค่างจีนในกลุ่มนี้ให้มีความชัดเจนยิ่งขึ้น จึงได้นำยีนต่าง ๆ คือ *ND3, ND4L, ND4*, $tRNA^{Arg}$, $tRNA^{His}$, $tNRA^{Ser}$ และ $tRNA^{Leu}$ มาใช้ในการศึกษา โดยทำการศึกษาใน *Rhinopithecus bieti, R. roxellana, Trachypithecus francoisi, T. f. leucocephalus, T. phayrei, Pygathrix nemaeus* และ *Colobus guereza* พบว่ามีลักษณะความแตกต่างกัน (heteromorphic) ที่เกิดขึ้นทั้งหมด 2,252 แบบ

Bigoni et al. (1997a) ทำการศึกษาเทคนิค chromosome painting โดยใช้โพรบโครโมโซมของมนุษย์ทั้งหมดกับค่างเทา (silvered leaf monkey, *Presbytis cristata*, 2n=44) โดยโพรบโครโมโซมของมนุษย์ทั้ง 24 โพรบ แสดง 30 สัญญาณในโครโมโซมชนิดแฮพลอยด์ (haploid) ของเพศเมีย และ 34 สัญญาณในโครโมโซมชนิดแฮพลอยด์ของเพศผู้ ความแตกต่างนี้เกิดขึ้นจากกระบวนการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนของโครโมโซมที่ไม่ใช่โครโมโซมคู่เหมือน (reciprocal translocation) ระหว่างโครโมโซมวายและโครโมโซมร่างกายคู่ที่ 5 ของมนุษย์ การแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนของโครโมโซมที่ไม่ใช่โครโมโซมคู่เหมือนในโครโมโซมร่างกายกับโครโมโซมเพศนี้เป็นลักษณะเฉพาะในกลุ่มลิงโลกเก่า ทำให้เกิดระบบโครโมโซมเพศแบบ $X_1X_2Y_1Y_2/X_1X_1X_2X_2$ และพบการเกิดโรเบิร์ตโซเนียนทรานสโลเคชั่น (Robertsonian translocation) ของโครโมโซมของค่างเทาคู่ที่ 14 กับ 15 และคู่ที่ 21 กับ 22 และเกิดการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนของโครโมโซมที่ไม่ใช่โครโมโซมคู่เหมือนของโครโมโซมคู่ที่ 1 กับ 19 และคู่ที่ 6 กับ 16 การวิเคราะห์การย้อมแถบสีแบบจี พบว่าเกิดความแตกต่างกัน 3 แบบ ของโครโมโซมคู่ที่ 1 ซึ่งเกิดจากการต่อสลับ (inversion) กันของโครโมโซม ผลการวิจัยนี้สามารถอธิบายการเกิดรูปแบบของแถบได้หลายรูปแบบ เมื่อเปรียบเทียบรูปแบบการเกิดไฮบริไดเซชันกับกลุ่มชะนี (gibbons) แสดงให้เห็นว่าลักษณะของโครโมโซมและการเกิดรูปแบบของแถบต่าง ๆ นี้ น่าจะมีความสัมพันธ์กันระหว่างชะนี กับกลุ่มค่าง (colobines) ทางสายวิวัฒนาการ

Bigoni et al. (1997b) ทำการศึกษาเทคนิค FISH โดยใช้โพรบโครโมโซมของมนุษย์ทุกโพรบไฮบริไดซ์กับโครโมโซมของค่างแอฟริกา (African colobines) พบว่าโพรบโครโมโซมของมนุษย์ทั้งหมดสามารถไฮบริไดซ์ได้และเกิด 31 สัญญาณ ในชุดโครโมโซมแฮพลอยด์ในเพศผู้ มีการเกิดการรวมตัวของโครโมโซมแบบโรเบิร์ตโซเนียนทรานสโลเคชั่นในโครโมโซมคู่ที่ 14 กับ 15 และ

21 กับ 22 ในโครโมโซมของค่างแอฟริกาคู่ที่ 6 และ 16 ตามลำดับ และมีการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนโครโมโซมที่ไม่ใช่โครโมโซมคู่เหมือนของโครโมโซมคู่ที่ 1 กับ 10 คู่ที่ 1 กับ 17 และคู่ที่ 3 กับ 19 และในโครโมโซมคู่ที่ 12 ของค่างเทายังมีการต่อสลับเกิดขึ้นด้วย จากข้อมูลของการไฮบริไดเซชันนี้ กล่าวได้ว่าค่างแอฟริกามีความแตกต่างจากค่างเอเชีย (Asian colobines) โดยเกิดจากการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนของโครโมโซมที่ไม่ใช่โครโมโซมคู่เหมือน 6 คู่ จากการเปรียบเทียบรูปแบบไฮบริไดเซชัน พบว่าคาริโอไทป์ของค่างเอเชียนั้นมีการผันแปรมาจากคาริโอไทป์ของค่างแอฟริกา ลิงสกุลมาคาค่า (*Macaca*) เอพขนาดใหญ่ (great apes) และมนุษย์ และจากรูปแบบไฮบริไดเซชัน จำนวนโครโมโซม และรูปร่างของโครโมโซม กล่าวได้ว่าระหว่างกลุ่มค่าง และชะนีนั้นมีการเชื่อมโยงกันทางสายวิวัฒนาการ

Nie et al. (1998) ทำการศึกษาโครโมโซมของค่างจีน 2 ชนิด คือ *Semnopithecus francoisi*, 2n=44 และ *S. phayrei*, 2n=44 โดยเทคนิค chromosome painting โดยใช้โพรบโครโมโซมของมนุษย์ทุกคู่ ยกเว้นโครโมโซมวาย พบว่าค่างทั้งสองชนิดมีรูปแบบของการไฮบริไดเซชันเหมือนกัน และรูปแบบโครโมโซมที่ย้อมด้วยเทคนิคแถบสีแบบจีก็คล้ายกันด้วย โดยโพรบทุกคู่สามารถจับกับโครโมโซม 1 คู่ ของค่างทั้งสองชนิดได้ ยกเว้นโพรบของมนุษย์คู่ที่ 1, 2, 6, 16 และ 19 ที่สามารถไฮบริไดซ์หรือจับกับโครโมโซมของค่างทั้งสองชนิดได้ 2 คู่ แสดงในตารางที่ 1 จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าโครโมโซมของมนุษย์ และค่างจีนทั้งสองชนิดมีการอนุรักษ์สูงมาก จากการเปรียบเทียบรูปแบบการไฮบริไดซ์ของโพรบมนุษย์กับค่างทั้งสองชนิดกับข้อมูลของลิงโลกเก่า (old world primate) อื่น ๆ พบว่า มีการเกิดการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนของโครโมโซมที่ไม่ใช่โครโมโซมคู่เหมือน กระบวนการวมตัวของโครโมโซมแบบโรเบิร์ตโซเนียน และการต่อสลับของโครโมโซมตั้งแต่เกิดการแยกสายวิวัฒนาการของมนุษย์และค่างจากบรรพบุรุษร่วมกัน จากการเปรียบเทียบดังกล่าวยังพบว่าค่างเอเชียมีรูปแบบคาริโอไทป์เหมือนกับค่างแอฟริกา

Bigoni et al. (2003) ศึกษาโดยใช้โพรบโครโมโซมของมนุษย์ในการหาความสัมพันธ์ของลิงงวง (proboscis monkey) กับค่างกลุ่มอื่น ๆ เหตุที่โครโมโซมของลิงงวงมีจำนวน 2n เท่ากับ 48 แท่ง แต่ในค่างกลุ่มอื่น ๆ มี 2n เท่ากับ 44 แท่ง เนื่องจากว่ามีการเกิดการหักของโครโมโซมคู่ที่ 14 และ 16 ดังนั้นการที่มีจำนวนโครโมโซมมากจึงไม่ใช่การเป็นลักษณะโบราณ ซึ่งปฏิเสธสมมติฐานของ Peng et al. (1993) ที่กล่าวว่าสกุล *Nasalis* น่าจะเป็นสกุลที่โบราณที่สุดในกลุ่มค่าง โพรบของมนุษย์คู่ที่ 14 และ 15 นั้นจะถูกพบร่วมกันใน 1 โครโมโซมซึ่งจะพบในกลุ่มค่างทุกชนิด แต่ในลิงงวง พบว่ามีการแตกหักของโครโมโซมคู่ที่ 14 จึงทำให้พบที่โครโมโซม 2 คู่ ซึ่งลักษณะนี้ไม่พบในค่างกลุ่มอื่น ๆ

Bigoni et al. (2004) ศึกษาความเหมือนของโครโมโซมมนุษย์กับค่างห้าสี โดยใช้โพรบโครโมโซมของมนุษย์ทั้ง 22 โพรบ และโครโมโซมเพศเอ็กซ์ พบว่ามีโครโมโซมที่เกิดการรวมตัวกันเมื่อเทียบกับโครโมโซมมนุษย์ ได้แก่ คู่ที่ 14/15, 21/22 และ 1/19 โดยคู่ที่ 1/19 สามารถอธิบายได้ว่าเกิดจากการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนของโครโมโซมที่ไม่ใช่โครโมโซมคู่เหมือน และพบว่ามีการต่อสลับแบบมี เซนโทรเมียร์ร่วมด้วย (pericentric inversion) ซึ่งพบในค่างเอเชียชนิดอื่น ๆ ด้วย แต่ไม่พบในค่างแอฟริกา และพบว่าค่างห้าสีมีคาริโอไทป์ที่เหมือนกันกับค่างชนิดอื่น ๆ ที่มีการศึกษาซึ่งมีการแยกสายวิวัฒนาการกันหลังจากที่มีการแยกสายกันของค่างเอเชียและค่างแอฟริกา