พันธุศาสตร์เปรียบเทียบของชะนีในประเทศไทย

นางสาวสุดารัตน์ บ่ายเจริญ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2548

ISBN 974-14-1869-8

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I 25199754

COMPARATIVE GENETICS OF GIBBONS IN THAILAND

Miss Sudarath Baicharoen

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Genetics
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2005

ISBN 974-14-1869-8

431213

หัวข้อวิทยานิพนธ์	พันธุศาสตร์เปรียบเทียบของชะนีในประเทศไทย
โดย	นางสาวสุดารัตน์ บ่ายเจริญ
สาขาวิชา	พันธุศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์ ดร. ต่อศักดิ์ สีลานันท์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เรืองวิทย์ บรรจงรัตน์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....รักษาราชการแทน คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(รองศาสตราจารย์ ดร. ธราพงษ์ วิทิตศานต์)

รองคณบดีฝ่ายบริหาร

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์นันทนา อังกินันทน์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา

(อาจารย์ ดร. ต่อศักดิ์ สีลานันท์)

....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์เรืองวิทย์ บรรจงรัตน์)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร. ดวงสมร สุวัฑฒน)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พงศ์ธาริน โล่ห์ตระกูล)

สุดารัตน์ บ่ายเจริญ : พันธุศาสตร์เปรียบเทียบของชะนีในประเทศไทย (COMPARATIVE GENETICS OF GIBBONS IN THAILAND) อาจารย์ที่ปรึกษา : อาจารย์ ดร. ต่อศักดิ์ สีลานันท์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม : ผศ. เรืองวิทย์ บรรจงรัตน์, 92 หน้า.
ISBN 974-14-1869-8

ชะนีเป็นสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมในสกุล *Hylobates* ในประเทศไทยพบ 3 สกุลย่อย 5 ชนิด เนื่องจากข้อมูลพันธุกรรมชะนีในประเทศไทยโดยเฉพาะในระดับโครโมโซมและระดับดีเอ็นเอยังมีอยู่น้อย จึงได้ศึกษาเปรียบเทียบความผันแปรทั้งในระดับโครโมโซมและลำดับเบสของดีเอ็นเอในชะนีทั้ง 5 ชนิด จากคาริโอไทป์ที่ได้จากวิธีการย้อมสีโครโมโซมแบบธรรมดาและแบบแถบสีจีพบว่าชะนีในสกุลย่อย *Hylobates* *Nomascus* และ *Symphalangus* มีจำนวนโครโมโซม 2n = 44 52 และ 50 ตามลำดับ ชะนีทั้ง 3 ชนิดในสกุลย่อย *Hylobates* มีรูปร่างโครโมโซมเหมือนกันคือ โครโมโซมร่างกายเป็นชนิดเมตาเซนตริก ซับเมตาเซนตริก และอโครเซนตริกเท่ากับ 24 16 และ 2 แท่งตามลำดับ และมีแซทเทิลไลท์โครโมโซม 1 คู่ ส่วนโครโมโซม X เป็นชนิดซับเมตาเซนตริกและโครโมโซม Y คาดว่าน่าจะมีรูปร่างเป็นเทโลเซนตริก ชะนีในสกุลย่อย *Nomascus* มีโครโมโซมร่างกายเป็นชนิดเมตาเซนตริก ซับเมตาเซนตริกและอโครเซนตริกเท่ากับ 34 10 และ 6 แท่งตามลำดับ โดยโครโมโซม X เป็นชนิดซับเมตาเซนตริกและโครโมโซม Y เป็นชนิดอโครเซนตริก ส่วนชะนีในสกุลย่อย *Symphalangus* มีโครโมโซมชนิดเมตาเซนตริก ซับเมตาเซนตริกและเทโลเซนตริกจำนวน 44 4 และ 2 แท่งตามลำดับ ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยใช้ลำดับเบสบริเวณ D-loop ของยีน Phe-tRNA ในไมโตรคอนเดรียพบว่าสายวิวัฒนาการสกุลย่อย *Nomascus* เป็นสายวิวัฒนาการสายแรกที่แยกออกมาจากชะนีอื่นๆ ต่อมาจึงมีการแยกกันของสายวิวัฒนาการสกุลย่อย *Hylobates* ออกจากสายวิวัฒนาการร่วมระหว่างสกุลย่อย *Symphalangus* และสกุลย่อย *Bunopithecus* จากความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ ชี้ให้เห็นว่าชะนีสกุลต่าง ๆ ได้วิวัฒนาการแยกจากกันมาค่อนข้างนาน และสมาชิกในสกุลย่อย *Hylobates* เพิ่งจะแยกเป็นชนิดต่าง ๆ เมื่อไม่นานมานี้เอง ผลจากโครโมโซมและการวิเคราะห์ลำดับเบส Phe-tRNA มีความแตกต่างกันในแง่เกี่ยวกับความใกล้ชิดระหว่างชะนีสกุลย่อยต่างๆ อย่างไรก็ตามข้อมูลที่ได้ในครั้งนี้ เสนอแนะว่าผลการวิเคราะห์สายวิวัฒนาการจากลำดับเบสมีความน่าเชื่อถือกว่าข้อมูลโครโมโซม

ภาควิชา ..... พฤกษศาสตร์.....ลายมือชื่อนิสิต.....สุดารัตน์ / บ่ายเจริญ.....
สาขาวิชา .....พันธุศาสตร์..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ปีการศึกษา .....2548.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4572625723 : MAJOR GENETICS

KEY WORD: Gibbon / Cytogenetics / Phe-tRNA / Phylogeny

SUDARATH BAICHAROEN : COMPARATIVE GENETICS OF GIBBONS IN THAILAND. THESIS ADVISOR : DR. TOSAK SEELANAN. THESIS COADVISOR : ASST.PROF. RUENGWIT BUNJONGRAT, 92 pp. ISBN 974-14-1869-8.

Gibbons are the mammals belonging to the genus *Hylobates*. In Thailand, 5 species in 3 subgenera of gibbons have been recorded. Thus far, the information on genetic data at chromosomal and DNA levels of Thai gibbons are scarce and available data are not applicable to Thai gibbons. Therefore, this research aims to investigate genetic variation among Thai gibbons species at chromosome and DNA levels. Karyotypes derived from chromosomes stained by conventional and G-banding methods showed that the chromosome numbers of gibbons in subgenera *Hylobates*, *Nomascus*, *Symphalangus* were (2n) = 44, 52 and 50, respectively. In the subgenus *Hylobates*, no variation in chromosome number and shape was detected among 3 species and the karyotype was consisted of 24 metacentric, 16 submetacentric and 2 acrocentric, including a pair of satellite chromosomes; X-chromosome was submetacentric and Y-chromosome was possibly telocentric. The karyotype of the subgenus *Nomascus* was consisted of 34 metacentric, 10 submetacentric and 6 acrocentric while X-chromosome was submetacentric and Y-chromosome was acrocentric. The karyotype of the subgenus *Symphalangus* was composed with 44 metacentric, 4 submetacentric and 2 telocentric but sex chromosomes could not be identified. Phylogenetic analyses of the control region D-loop of mitochondrial Phe-tRNA indicated that the subgenus *Nomascus* lineage was the first to separate from the other subgenera, and followed by the separation of the subgenus *Hylobates* lineage from the lineage of the subgenus *Symphalangus* and the subgenus *Bunopithecus*. This relationship showed that the subgenera of gibbons had dliversified long time ago while species within the genus *Hylobate*s had recently diversified. The results of chromosomal and Phe-tRNA sequence analyses were different in the term of relationships among subgenera. However, the results from this research suggested the relationships based on DNA sequence analyses seemed to be more reliable than that of the chromosomal analyses.

Department.....Botany.....Student's signature.....Sudarath Baicharoen.....

Field of study.....Genetics.....Advisor's signature.....

Academic year.....2005.....Co-advisor' signature.....Ruengwit Bunjongrat.....

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร. ต่อศักดิ์ สีลานันท์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์เรืองวิทย์ บรรจงรัตน์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่กรุณาเป็นที่ปรึกษา ให้ความช่วยเหลือคำแนะนำต่างๆ ตลอดการทำวิจัยและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ จนวิทยานิพนธ์นี้สำเร็จได้ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ นันทนา อังกินันทน์ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร. ดวงสมร สุวัฑฒน และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พงศ์ธาริน โล่ห์ตระกูล กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ช่วยสละเวลาตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณผู้อำนวยการองค์การสวนสัตว์ในพระบรมราชูปถัมภ์ที่อนุเคราะห์ตัวอย่างสัตว์ในการศึกษาครั้งนี้และกราบขอบพระคุณผู้อำนวยการ นายสัตวแพทย์ เจ้าหน้าที่และพนักงานทุกท่านประจำสวนสัตว์เปิดเขาเขียว สวนสัตว์นครราชสีมา สวนสัตว์เชียงใหม่และสวนสัตว์สงขลา ที่ให้ความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างเลือดสัตว์ที่ศึกษาในครั้งนี้ รวมถึงอาจารย์อลงกลด แทนออมทองและคุณวิเวก สุขเอียดที่คอยช่วยประสานงานติดต่อขอเก็บตัวอย่างจากสวนสัตว์ต่างๆ

ขอขอบพระคุณความอนุเคราะห์ของ Associate Professor Rudolf Meier อาจารย์ประจำภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ที่ national University of Singapore (NUS) ที่อนุเคราะห์เครื่อง automatic DNA sequencer ในการช่วยหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ

ขอขอบคุณทุนสนับสนุนวิทยานิพนธ์และกลุ่มวิทยานิพนธ์ ทุนอุดหนุนเพื่อการตีพิมพ์เผยแพร่ในระดับบัณฑิตศึกษา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โครงการผลิตนักวิจัยด้านความหลากหลายทางชีวภาพระดับปริญญาโท-เอก รหัสโครงการ CEB_M_1_2005 ที่ให้ทุนสนับสนุนการศึกษาและวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณสหัช จันทนาอรพินท์และคุณมลิวรรณ นาคขุนทด สำหรับการช่วยเหลือในการวิจัย คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่างๆเกี่ยวกับงานวิจัย

ขอขอบคุณ คุณนวลนภา เจริญรวย คุณสุภาลัย ไชยสุต คุณรุ่งนภา เจริญรวย คุณศศิพงศ์ สีทอง คุณกิตติศักดิ์ จิตตรง คุณละอออรัตน์ เวชกุลและทุกท่านที่เป็นกำลังใจและให้คำปรึกษาตลอดการวิจัยนี้

สุดท้ายขอกราบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่และทุกคนในครอบครัว ที่สนับสนุนในการศึกษาตลอดจนเป็นกำลังใจให้คำปรึกษาและความห่วงใยเสมอมา จนวิทยานิพนธ์สำเร็จได้ด้วยดี

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....จ
กิตติกรรมประกาศ.....ฉ
สารบัญ.....ช
สารบัญตาราง.....ฌ
สารบัญรูปภาพ.....ญ
บทที่
1. บทนำ.....1
วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....2
ขอบเขตของงานวิจัย.....3
2. ตรวจเอกสาร.....4
อนุกรมวิธานของชะนี.....4
ความสำคัญของชะนีและความหลากหลายทางชีวภาพ.....10
สถานภาพของชะนี.....11
การศึกษาเซลล์พันธุศาสตร์.....12
การศึกษาเซลล์พันธุศาสตร์ของชะนี.....13
3. วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษา.....16
ตัวอย่างสัตว์ทดลอง.....16
วัสดุอุปกรณ์.....17
สารเคมี.....19
ขั้นตอนดำเนินงานวิจัย.....21
4. ผลการศึกษา.....27
การศึกษาคาริโอไทป์ของชะนีจากการย้อมโครโมโซมแบบธรรมดาและแบบแถบสีจี.....27
การศึกษาความแปรผันของนิวคลีโอไทด์บริเวณ D-loop ของยีน Phe-tRNAใน
ไมโตรคอนเดรียดีเอ็นเอ.....58

หน้า

5. อภิปรายผลการศึกษา.....72
การศึกษาคาริโอไทป์ของชะนีจากการย้อมโครโมโซมแบบธรรมดาและแบบแถบสีจี..... 72
การศึกษาความแปรผันของนิวคลีโอไทด์บริเวณ D-loop ของยีน Phe-tRNAใน
ไมโตรคอนเดรียดีเอ็นเอ.....78
การประยุกต์.....79
6. สรุปผลการศึกษา.....81
การศึกษาคาริโอไทป์ของชะนีจากการย้อมโครโมโซมแบบธรรมดาและแบบแถบจี.....82
การศึกษาความแปรผันของนิวคลีโอไทด์บริเวณ D-loop ของยีน Phe-tRNAใน
ไมโตรคอนเดรียดีเอ็นเอ.....83
7. ภาคผนวก.....89
8. ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....92

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 สกุลย่อย ชนิดและเขตการกระจายพันธุ์ของชะนี.....5
3.1 ชนิดของชะนี จำนวนตัวอย่าง เพศและแหล่งเก็บตัวอย่างศึกษา.....16
4.1 ค่า Ls, LI, RL, CI และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานขนาดและรูปร่างของโครโมโซมของ ชะนีมือขาว (2n=44) จากจำนวนเซลล์ 60 เซลล์.....28
4.2 ค่า Ls, LI, RL, CI และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานขนาดและรูปร่างของโครโมโซมของ ชะนีมงกุฎ (2n=44) จากจำนวนเซลล์ 60 เซลล์.....33
4.3 ค่า Ls, LI, RL, CI และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานขนาดและรูปร่างของโครโมโซมของ ชะนีมือดำ (2n=44) จากจำนวนเซลล์ 40 เซลล์.....38
4.4 ค่า Ls, LI, RL, CI และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานขนาดและรูปร่างของโครโมโซมของ ชะนีแก้มขาว (2n=52) จากจำนวนเซลล์ 60 เซลล์.....48
4.5 ค่า Ls, LI, RL, CI และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานขนาดและรูปร่างของโครโมโซมของ ชะนีเซียมังค์ (2n=50) จากจำนวนเซลล์ 20 เซลล์.....58
4.6 ค่าการแทนที่เบส คำนวณจากแบบจำลองแทนที่เบส Tamura-Nei ในชะนีสกุลย่อยต่างๆ.....70
6.1 จำนวน (2n) ค่าโครโมโซมพื้นฐาน (FN) ชนิดและรูปร่างโครโมโซม ของชะนีทั้ง 5 ชนิดในประเทศไทย.....82

สารบัญรูปภาพ

ภาพที่ หน้า

2.1 ชะนีชนิดต่างๆในประเทศไทยก. ชะนีมือขาวเพศผู้ ข. ชะนีมือขาวเพศเมีย ค. ชะนีมงกุฎเพศผู้ ง. ชะนีมงกุฎเพศเมีย จ. ชะนีมือดำเพศผู้ ฉ. ชะนีมือดำเพศเมีย.....8

2.2 ชะนีชนิดต่างๆ ในประเทศไทย ก. ชะนีแก้มขาวเพศผู้ ข. ชะนีแก้มขาวเพศเมีย ค. ชะนีเซียมังค์เพศผู้ ง. ชะนีเซียมังค์เพศเมีย.....9

4.1 โครโมโซมระยะเมทาเฟสและคาริโอไทป์ของชะนีมือขาวเพศผู้ จากการย้อมสีแบบธรรมดา 29

4.2 โครโมโซมระยะเมทาเฟสและคาริโอไทป์ของชะนีมือขาวเพศผู้ จากการย้อมสีแบบแถบสีจี.....30

4.3 อิดิโอแกรมจากการย้อมสีแบบธรรมดา (แท่งซ้าย) และแถบสีจี (แท่งขวา) ของชะนีมือขาว.....31

4.4 โครโมโซมระยะเมทาเฟสและคาริโอไทป์ของชะนีมงกุฎเพศผู้ จากการย้อมสีแบบธรรมดา 34

4.5 โครโมโซมระยะเมทาเฟสและคาริโอไทป์ของชะนีมงกุฎเพศผุ้ จากการย้อมสีแบบแถบสีจี.....35

4.6 อิดิโอแกรมจากการย้อมสีแบบธรรมดา (แท่งซ้าย) และแบบแถบสีจี (แท่งขวา) ของชะนีมงกุฎ.....36

4.7 โครโมโซมระยะเมทาเฟสและคาริโอไทป์ของชะนีมือดำเพศผู้ จากการย้อมสีแบบธรรมดา 39

4.8 โครโมโซมระยะเมทาเฟสและคาริโอไทป์ของชะนีมือดำเพศผู้ จากการย้อมสีแบบแถบสีจี 40

4.9 อิดิโอกรมจากการย้อมสีแบบธรรมดา (แท่งซ้าย) และแบบแถบสีจี (แท่งขวา) ของชะนีมือดำ.....41

4.10 โครโมโซมระยะเมทาเฟสและคาริโอไทป์ของชะนีแก้มขาวเพศผู้ จากการย้อมสีแบบธรรมดา.....49

4.11 โครโมโซมระยะเมทาเฟสและคาริโอไทป์ของชะนีแก้มขาวเพศผู้ จากการย้อมสีแบบแถบสีจี.....50

4.12 อิดิโอแกรมจากการย้อมสีแบบธรรมดา (แท่งซ้าย) และแถบสีจี (แท่งขวา) ของชะนีแก้มขาว.....51

4.13 โครโมโซมระยะเมทาเฟสและคาริโอไทป์ของชะนีเซียมังค์เพศเมีย จากการย้อมสีแบบธรรมดา.....59

4.14 อิดิโอแกรมจากการย้อมสีแบบธรรมดาของชะนีเซียมังค์.....60

4.15 ลำดับดีเอ็นเอของชะนีและ outgroup ที่ใช้ในการจัดเรียง (alingment) ตัวเลขและจุด (.) ใน [ ] คือตำแหน่งเบส * ใต้ตำแหน่งเบสคือเบสตำแหน่งนั้นไม่ได้ใช้ในการวิเคราะห์และจุด (.) ใต้ตำแหน่งเบสคือเบสที่ใช้ในการวิเคราะห์.....62

4.16 ความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการของชะนีทั้ง 4 สกุลย่อย ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี Neighbor-joining โดยใช้ค่าการแทนที่เบสตามแบบจำลองของ Tamura-Nei ตัวเลขในแต่ละกิ่งระบุค่า bootstrap และสเกลแสดงค่าการแทนที่เบสต่อ 1 แหน่ง.....71

4.17 อายุของสายวิวัฒนาการสกุลย่อยทั้งสี่ของชะนี ตัวเลขใต้เส้นสเกลคือ ค่าการแทนที่เบสตามจำลองของ Tamura-Nei ตัวเลขเหนือเส้นคือเวลาเป็นล้านปี.....71

5.1 คาริโอไทป์และอิดิโอแกรมที่ได้จากการย้อมสีแบบแถบสีจีของโครโมโซมแท่งที่ 9 จากสกุลย่อย *Hylobates* (คู่ซ้าย) และแท่งที่ 11 จากสกุลย่อย *Nomascus* (คู่ขวา) 75

5.2 คาริโอไทป์และอิดิโอแกรมที่ได้จากการย้อมสีแบบแถบสีจีของโครโมโซมแท่งที่ 10 จากสกุลย่อย *Hylobates* (คู่ซ้าย) และแท่งที่ 12 จากสกุลย่อย *Nomascus* (คู่ขวา) 75

5.3 คาริโอไทป์และอิดิโอแกรมที่ได้จากการย้อมสีแบบแถบสีจีของโครโมโซมแท่งที่ 12 จากสกุลย่อย *Hylobates* (คู่ซ้าย) และแท่งที่ 13 จากสกุลย่อย *Nomascus* (คู่ขวา) 76

5.4 คาริโอไทป์และอิดิโอแกรมที่ได้จากการย้อมสีแบบแถบสีจีของโครโมโซมแท่งที่ 15 จากสกุลย่อย *Hylobates* (คู่ซ้าย) และแท่งที่ 21 จากสกุลย่อย *Nomascus* (คู่ขวา) 76

5.5 คาริโอไทป์และอิดิโอแกรมที่ได้จากการย้อมสีแบบแถบสีจีของโครโมโซมแท่งที่ 9 จากสกุลย่อย *Hylobates* (คู่ซ้าย) และแท่งที่ 11 จากสกุลย่อย *Nomascus* (คู่ขวา) 77