รายงานผลการวิจัย

ทุนวิจัยงบประมาณแผ่นดิน ปี พ.ศ. 2535

เรื่อง

การศึกษาคาริโอไทป์ของจระเข้พันธุ์น้ำจืด จระเข้พันธุ์น้ำเค็ม และจระเข้ลูกผสม โดยวิธีธรรมดา และการใช้เทคนิคแบนดิ้ง

Karyotypes of freshwater Crocodiles (*Crocodylus siamensis*), saltwater Crocodiles (*Crocodylus porosus*) and the interspecific hybrids by conventional and banding techniques.

วิรัตน์ ชวนะนิกุล

ดวงฉมร ตุวัทตเน

วีระพงศ์ โกยกุล

สุมิตรา วัฒโนดร

จุฬารัตน์ สุขไข่

จส
สพ 15
009664

ภาควิชาสัตวบาล คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายงานผลการวิจัย

ทุนวิจัยงบประมาณแผ่นดิน ปี พ.ศ. 2535

เรื่อง

การศึกษาคาริโอไทป์ของจระเข้พันธุ์น้ำจืด จระเข้พันธุ์น้ำเค็ม และจระเข้ลูกผสม โดยวิธีธรรมดา และการใช้เทคนิคแบนดิ้ง

Karyotypes of freshwater Crocodiles (*Crocodylus siamensis*), saltwater Crocodiles (*Crocodylus porosus*) and the interspecific hybrids by conventional and banding techniques.

วิวัฒน์ ชวนะนิกุล

ดวงสมร สุวัฑฒน

วีระพงศ์ โกยกุล

สุมิตรา วัฒโนดร

จุฑารัตน์ สุขไข่

ภาควิชาสัตวบาล คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- 8 ก.ย. 2542

I18293335

การศึกษาคาริโอไทป์ของจระเข้พันธุ์น้ำจืด จระเข้พันธุ์น้ำเค็ม และจระเข้ลูกผสม โดยวิธีธรรมดา และการใช้เทคนิคแบนดิ้ง

[Karyotypes of freshwater Crocodiles (*Crocodylus siamensis*), saltwater Crocodiles (*Crocodylus porosus*) and the interspecific hybrids by conventional and banding techniques].

โดย

วิวัฒน์ ชวนะนิกุล, ดวงสมร สุวัฑฒน, วีระพงศ์ โกยกุล*, สุมิตรา วัฒโนดร**, และ จุฑารัตน์ สุขไข่

ภาควิชาสัตวบาล , *ภาควิชากายวิภาคศาสตร์, **ภาควิชาพยาธิวิทยา
คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2541

สารบาญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ (abstract)	1
บทคัดย่อภาษาไทย	2
บทนำ	4
อุปกรณ์และวิธีการ	6
ผลการศึกษา	8
วิจารณ์	19
เอกสารอ้างอิง	22

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เลขหมู่ จฬ
สพ 15
เลขทะเบียน 009664
วัน,เดือน,ปี 30 เม.ย. 42

Abstract

Karyotypes of 20 Siamese freshwater crocodiles (*Crocodylus siamensis*), 17 saltwater crocodiles (*Crocodylus porosus*) and 15 interspecific hybrids of F1 and 10 of F2 were studied using conventional lymphocyte culture method in Ham's F10 and EMEM media with incubation temperature of 30 °C. The diploid chromosome number of the freshwater crocodile was 30 consisting of 5 pairs of large metacentric,1 pair of acrocentric, 4 pairs of submetacentric and 5 pairs of small metacentric chromosomes. The saltwater crocodiles which had 2n = 34 showed the same number of small metacentric chromosomes but they had 4 pairs of large metacentric, 5 pairs of acrocentric and 3 pairs of submetacentric chromosomes. In both species, one pair of acrocentric chromosomes demonstrated a prominent characteristic of secondary constriction.

The karyotype of F1 interspecific hybrids (2n = 32) revealed a combination of chromosome complement from each species. There were 9 large metacentric, 6 acrocentric, 7 submetacentric and 10 small metacentric chromosomes. In F2 hybrids, three different karyotypes were found depending on the types of mating. Backcrossing of F1 with the freshwater crocodile produced the hybrids with 2n = 31 whereas backcrossing of F1 with the saltwater crocodile produced 2n = 33. These two karyotypes showed the same number of 9 large and 10 small metacentric chromosomes. However, the animal with 2n = 31, had 4 acrocentric and 8 submetacentric while those with 2n = 33 had 8 acrocentric and 6 submetacentric chromosomes.

The *interse* mating (F1 x F1) produced 2n = 32 consisting of 5 homologous pairs of large metacentric, 6 acrocentric, 6 submetacentric and 10 small metacentric chromosomes. However, these six karyotypes have the same fundamental number (NF) of 58. Comparative analysis of karyotypes made from both species and their hybrids showed that the fusion of acrocentric chromosomes to produce bi-armed chromosomes plays a major role in the production of different karyotypes. The first and second pairs of acocentric chromosomes have become the third pair of a large metacentric pair and the third and the fifth have become the first pair of existing submetacentric chromosomes. By using NOR's banding technique, the secondary constriction on the fourth pair in the saltwater crocodiles was marked by a prominent dark band. NOR's bands were found in both male and female crocodiles. In freshwater crocodiles, they were on the only one pair of acrocentric chromosomes whereas in saltwater crocodiles, they were on the fourth pair of acrocentric chromosomes. Results from the NOR's banding technique also supports the hypothesis concerning the fusion of acrocentric chromosomes during the course of evolution.

บทคัดย่อ

คาริโอไทป์ของจระเข้น้ำจืด (freshwater crocodile, *Crocodylus siamensis*) จำนวน 20 ตัว จระเข้พันธุ์น้ำเค็ม (saltwater crocodile, *Crocodylus porosus*) จำนวน 17 ตัว และจระเข้ลูกผสม (interspecific hybrid) ชั่วที่ 1 (F1) จำนวน 15 ตัว และชั่วที่ 2 (F2) จำนวน 10 ตัว ได้มาจากการเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวในอาหารเลี้ยงเชื้อ Ham's F10 และ EMEM โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ในตู้อบที่อุณหภูมิ 30 °C จำนวนโครโมโซมของจระเข้พันธุ์น้ำจืดคือ 2n = 30 ประกอบไปด้วยโครโมโซมเมตาเซนตริคขนาดใหญ่ 5 คู่ โครโมโซมอะโครเซนตริค 1 คู่ โครโมโซมซับเมตาเซนตริค 4 คู่ และโครโมโซมเมตาเซนตริคขนาดเล็ก 5 คู่ จระเข้พันธุ์น้ำเค็มมีจำนวนโครโมโซม 2n = 34 ประกอบด้วยโครโมโซมเมตาเซนตริคขนาดเล็ก 5 คู่ เช่นเดียวกับจระเข้พันธุ์น้ำจืด แต่มีโครโมโซมเมตาเซนตริคขนาดใหญ่เพียง 4 คู่ โครโมโซมอะโครเซนตริค 5 คู่ และโครโมโซมซับเมตาเซนตริค 3 คู่ ในจระเข้ทั้งสองชนิดโครโมโซมอะโครเซนตริคคู่หนึ่งแสดงลักษณะของ secondary constriction อย่างชัดเจน

คาริโอไทป์ของลูกผสมชั่วที่ 1 (F1) มีจำนวนโครโมโซม 2n = 32 ประกอบไปด้วยชนิดของโครโมโซมที่เกิดจากการผสมกันของพ่อและแม่ ได้แก่ โครโมโซมเมตาเซนตริคขนาดใหญ่ 9 ตัว โครโมโซมอะโครเซนตริค 6 ตัว โครโมโซมซับเมตาเซนตริค 7 ตัว และโครโมโซมเมตาเซนตริคขนาดเล็ก 10 ตัว ในลูกผสมชั่วที่ 2 (F2) ปรากฏว่าลูกผสม F2 ที่ได้มีคาริโอไทป์ 3 แบบ ขึ้นอยู่กับการจับคู่ของการผสมพันธุ์ ลูกที่เกิดจากการผสม F1 กับจระเข้พันธุ์น้ำจืดมีจำนวนโครโมโซม 2n = 31 ในขณะที่ ลูกที่เกิดจากการผสม F1 กับจระเข้พันธุ์น้ำเค็มมีจำนวนโครโมโซม 2n = 33 คาริโอไทป์ทั้งสองแบบมีโครโมโซมเมตาเซนตริคขนาดใหญ่ และขนาดเล็กเท่ากันคือมีจำนวน 9 และ 10 ตัวตามลำดับ อย่างไรก็ตาม จระเข้ที่มีจำนวนโครโมโซม 2n = 31 มีโครโมโซมอะโครเซนตริค 4 ตัว โครโมโซมซับเมตาเซนตริค 8 ตัว ในขณะที่จระเข้ที่มีจำนวนโครโมโซม 2n = 33 มีโครโมโซมอะโครเซนตริค 8 ตัว และโครโมโซมซับเมตาเซนตริค 6 ตัว

คาริโอไทป์แบบที่สามได้จากการผสมระหว่างลูกผสม F1 ด้วยกัน (*interse mating*) มีจำนวนโครโมโซม 2n = 32 ประกอบด้วยโครโมโซมเมตาเซนตริคขนาดใหญ่ 5 คู่ โครโมโซมอะโครเซนตริค 3 คู่ โครโมโซมซับเมตาเซนตริค 3 คู่ และโครโมโซมเมตาเซนตริคขนาดเล็ก 5 คู่ อย่างไรก็ตาม คาริโอไทป์ทุกแบบที่ได้ศึกษามีจำนวนแขนของโครโมโซมที่เรียกว่า fundamental number (NF) เท่ากันหมดคือ 58 จากการวิเคราะห์พบว่าจระเข้ทั้งสองชนิดมีความสัมพันธ์กันในเชิงวิวัฒนาการ คือ มีการเชื่อมกันของโครโมโซมอะโครเซนตริค ทำให้เกิดโครโมโซมเมตาเซนตริคหรือซับเมตาเซนตริค และก่อให้เกิดคาริโอไทป์ที่ไม่เหมือนกันในจระเข้ทั้งสองพันธุ์ การวิเคราะห์สรุปได้ว่าโครโมโซมอะโครเซนตริคคู่ที่หนึ่ง และคู่ที่สองของจระเข้น้ำเค็มเกิดการเชื่อมกันกลายเป็นโครโมโซมเมตาเซนตริคขนาดใหญ่คู่ที่สามของจระเข้พันธุ์น้ำจืด และโครโมโซมอะโครเซนตริคคู่ที่สาม และคู่ที่ห้าของจระเข้พันธุ์น้ำเค็มเกิดการเชื่อมกันกลายเป็นโครโมโซมซับเมตาเซนตริคคู่ที่ 1 ของจระเข้พันธุ์น้ำจืด

การศึกษารูปแบบที่เกิดจากการทำ NOR's banding ทำให้ได้ข้อมูลเพิ่มเติมว่า secondary constriction ของโครโมโซมอะโครเซนตริคเท่านั้นที่ติดสีเข้ม ซึ่งพบได้ทั้งเพศผู้และเพศเมีย โดยเฉพาะจระเข้พันธุ์น้ำจืดตำแหน่งนี้อยู่บนโครโมโซมอะโครเซนตริคที่มีอยู่คู่เดียว ส่วนจระเข้น้ำเค็มอยู่บนโครโมโซมอะโครเซนตริคคู่ที่ 4

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทนำ

จระเข้เป็นสัตว์ที่เคยกระจายอยู่อย่างแพร่หลายในภูมิภาคต่างๆ ของโลกโดยเฉพาะบริเวณที่เป็นแหล่งน้ำ และอากาศร้อนชื้น ในปัจจุบันจระเข้เป็นสัตว์ที่พบได้ไม่มากตามแหล่งธรรมชาติเนื่องจากถูกล่า ดังนั้นสหสัมพันธ์ระหว่างประเทศเพื่อการอนุรักษ์ธรรมชาติ และทรัพยากรธรรมชาติ (International Union for Conservation of Nature and resources, IUCN) จึงกำหนดให้จระเข้เป็นสัตว์ที่ต้องอนุรักษ์ไว้ นอกจากนี้ อนุสัญญาว่าด้วยการค้าระหว่างประเทศซึ่งชนิดของสัตว์ป่า และพืชที่กำลังจะสูญพันธุ์ (Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora, CITES) ได้กำหนดให้จระเข้ 22 ชนิด เป็นสัตว์ที่ถูกควบคุมตามอนุสัญญา ในจำนวนนี้มีอยู่ในประเทศไทย 3 ชนิด คือ จระเข้พันธุ์น้ำจืด (freshwater crocodile, *Crocodylus siamensis*) จระเข้พันธุ์น้ำเค็ม (saltwater crocodile, *Crocodylus porosus*) และตะโขง หรือจระเข้ปากกระทุงเหว (False gaviel, *Tomistoma schlegelii*) ถึงแม้ว่าในสภาพธรรมชาติของประเทศไทยจะมีจระเข้อยู่จำนวนไม่มาก เช่นเดียวกับประเทศอื่นๆ ประเทศไทยมีการเลี้ยงจระเข้พันธุ์น้ำจืด และพันธุ์น้ำเค็มเป็นฟาร์มขนาดใหญ่ และมีอุตสาหกรรมเครื่องหนังจระเข้ และอื่นๆ รองรับ ดังนั้นเมื่อพิจารณาที่จำนวนจระเข้ทั้งสองพันธุ์ในประเทศไทยก็ไม่นับว่าใกล้สูญพันธุ์

นอกจากแหล่งที่อยู่อาศัยแตกต่างกันแล้วจระเข้พันธุ์น้ำจืดและน้ำเค็มยังมีความแตกต่างของลักษณะภายนอก (physical appearances) ที่สังเกตเห็นได้ชัด เช่น ลักษณะของจมูกซึ่งทู่ในพันธุ์น้ำจืด แต่แหลมในพันธุ์น้ำเค็ม พันธุ์น้ำจืดมีเกล็ดที่ท้ายทอย 4 เกล็ด แต่พันธุ์น้ำเค็มไม่มี พันธุ์น้ำจืดมีลายใต้ช่องทวาร (cloaca) แต่พันธุ์น้ำเค็มไม่มี แม้แต่นิสัย และความดุร้าย ผู้เลี้ยงก็ยังพบว่าจระเข้ทั้งสองพันธุ์แตกต่างกัน (ปัญญา ยังประภากร, 2533) ในธรรมชาติการผสมข้ามชนิด (interspecific breeding) ระหว่างจระเข้ 2 ชนิดนี้ ไม่เคยมีรายงานว่าเกิดขึ้น สาเหตุอาจเนื่องจากประชากรจระเข้ทั้งสองชนิดอยู่ในถิ่นอาศัยที่แตกต่างกัน และ/หรือมีปัจจัยอื่นเกี่ยวข้อง อย่างไรก็ตามเมื่อทำการผสมข้ามพันธุ์ของจระเข้ที่เลี้ยงในฟาร์ม ปรากฏว่าได้รับความสำเร็จและลูกผสม (hybrids) ที่ได้ไม่เป็นหมัน และสามารถสืบพันธุ์ต่อไปได้ ลูกผสมมีลักษณะที่เกิดผลดีทางเศรษฐกิจหลายประการ เช่น มีอัตราการเจริญเติบโตที่ดีกว่า และเมื่อโตเต็มที่มีขนาดที่ใหญ่กว่าพ่อแม่ (ปัญญา ยังประภากร. 2533)

เซลล์พันธุศาสตร์ (cytogenetics) คือการศึกษาลักษณะและความผิดปกติของโครโมโซมซึ่งเป็นองค์ประกอบที่อยู่ในนิวเคลียสของสัตว์ทุกชนิดโครโมโซมเป็นโครงสร้างที่ประกอบด้วยโปรตีนและสารพันธุกรรม (DNA) และสัตว์แต่ละชนิด (species) มีจำนวนและลักษณะของโครโมโซมไม่เหมือนกัน การจัดรูปแบบของโครโมโซมที่เรียกว่าคาริโอไทป์ (karyotype) ทำให้นักวิทยาศาสตร์สามารถจำแนกสัตว์ที่มีลักษณะภายนอกคล้ายคลึงกัน และยังสามารถศึกษาความสัมพันธุ์เชิงวิวัฒนาการของสัตว์ที่อยู่ในวงศ์ (genus) เดียวกันได้อีกด้วย

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นอกจากการศึกษาโครโมโซมด้วยวิธีธรรมดาที่มีการเพาะเลี้ยงเซลล์ การใช้สารหยุดการแบ่งตัวของเซลล์ และการย้อมสีโครโมโซมแล้ว ยังมีเทคนิคที่ทำให้โครโมโซมแต่ละตัวเกิดการติดสีในแต่ละส่วนย่อยที่ไม่เท่ากัน เกิดเป็นรูปแบบที่เรียกว่า banding อีกด้วย การทำให้โครโมโซมเกิด bands ทำได้หลายวิธีแล้วแต่ชนิดของสารเคมีที่ใช้ เทคนิค banding ที่สำคัญอันหนึ่งก็คือ การทำ NOR's banding ซึ่งเป็นการย้อมสีเฉพาะตรงตำแหน่งของโครโมโซมที่เป็น nuclear organizer region NOR เป็นที่อยู่ของ DNA ที่มีข้อมูลพันธุกรรมที่จะสร้างเป็น rRNA การใช้เทคนิค NOR's banding ช่วยให้การจำแนกโครโมโซมในสัตว์บางชนิดทำได้ถูกต้องยิ่งขึ้น การศึกษาเซลล์พันธุศาสตร์กระทำกันอย่างกว้างขวางในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมรวมทั้งมนุษย์ สำหรับสัตว์เลื้อยคลานนั้นมีการศึกษาไม่มากนักและข้อมูลเรื่องจระเข้นับว่ามีน้อยมาก การที่สัตว์เลื้อยคลานเป็นสัตว์เลือดเย็นทำการเพาะเลี้ยงเซลล์เพื่อศึกษาโครโมโซมต้องใช้เทคนิควิธีการที่แตกต่างไปจากวิธีในการเลี้ยงลูกด้วยนมที่เป็นสัตว์เลือดอุ่น และบางครั้งต้องมีการปรับเปลี่ยนวิธีการอยู่เสมอ การศึกษาวิจัยโครโมโซมของจระเข้เท่าที่รายงานปรากฏว่า จระเข้ชนิดต่างๆ ที่อยู่ในตระกูล Crocodylidae มีจำนวนโครโมโซม (diploid number) อยู่ระหว่าง 30 ถึง 34 ยกเว้นพวก Caiman และ Dwarf crocodiles ใน subfamily Alligatorinae ที่มีจำนวน 2n = 42 และจระเข้ *Osteolaemus tetraspis* ใน subfamily Crocodylinae เท่านั้นที่มีจำนวน 2n = 38

สำหรับจระเข้พันธุ์น้ำจืดและน้ำเค็มนั้นจากการศึกษาเบื้องต้นของคณะผู้วิจัยพบว่า จระเข้พันธุ์น้ำจืดมีจำนวนโครโมโซม 2n = 30 และจระเข้พันธุ์น้ำเค็มมีจำนวน 2n = 34 ซึ่งขัดแย้งกับที่เคยมีผู้รายงานไว้ว่าจระเข้ทั้งสองชนิดมีจำนวนโครโมโซมเท่ากันคือ 2n = 34 (Cohen and Gans, 1970.) ด้วยเหตุนี้จึงได้ทำการศึกษาโดยการเก็บข้อมูลจากจระเข้ทั้งพันธุ์น้ำจืด พันธุ์น้ำเค็ม และลูกผสมชั่วต่างๆ ในจำนวนที่มากพอเพื่อศึกษาให้แน่ชัดลงไปว่า จระเข้แต่ละชนิดมีจำนวน และลักษณะของโครโมโซมเป็นเช่นไร นอกจากนี้การใช้เทคนิค NOR's banding จะทำให้การแยกแยะโครโมโซมถูกต้องยิ่งขึ้น ผลการศึกษาที่ได้จักเป็นความรู้พื้นฐานในการดำเนินการวิจัยในเรื่องพันธุศาสตร์ของจระเข้ในอนาคต เช่น การใช้เทคนิค banding แบบอื่นๆ เพื่อศึกษาโครโมโซมแต่ละตัวอย่างละเอียด การศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของจระเข้ชนิดต่าง โดยวิธีทางเซลล์พันธุศาสตร์และอณูพันธุศาสตร์ (molecular genetics)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อุปกรณ์ และวิธีการ

1. การเก็บตัวอย่างเลือด

ทำการเจาะเลือดจระเข้น้ำจืดจำนวน 18 ตัว จระเข้น้ำเค็ม 7 ตัว และลูกผสม 13 ตัวอายุประมาณ 4-5 ปี ทำความสะอาดบริเวณรอยต่อระหว่างหัว และลำคอของจระเข้ทางด้านบนด้วย 70% ethanol และเจาะเลือดจาก venous sinus บริเวณคอด้านบนห่างจากกะโหลกศีรษะ 2-3 ซม. โดยใช้ชุดเจาะเลือดสำเร็จรูป เจาะเลือดในปริมาณ 8-10 มล. และเก็บในหลอดที่เคลือบด้วย heparin เขย่าเบาๆ เพื่อป้องกันเลือดแข็งตัว เก็บตัวอย่างเลือดในกระติกที่มีน้ำแข็งที่ 4 °ซ และรีบนำเข้าห้องปฏิบัติการ

2. วิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาว (Lymphocyte Culture)

นำเลือดมาปั่น (centrifuge) ที่ความเร็ว 1,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดชั้นเม็ดเลือดขาว (buffy coat) แล้วหยดลงในหลอดที่เตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ ซึ่งประกอบด้วย medium (RPMI-1640, EMEM, หรือ Ham's F10), fetal bovine serum, penicillin และสารกระตุ้นให้เซลล์แบ่งตัว phytohaemagglutinin (PHA) และ Concanavalin-A (Con-A) ปิดหลอดให้แน่น และเขย่าเบาๆ หลังจากนั้นนำไปอบในตู้อบ (CO_2 Incubator) ที่อุณหภูมิ 30 °ซ นาน 72 ชั่วโมง โดยเขย่าหลอดเพาะเลี้ยงเซลล์ทุกๆ 12 ชั่วโมง

เมื่อถึงชั่วโมงที่ 71 เติมสารละลาย colchicine ความเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วอบต่อ อีก 1 ชั่วโมง เพื่อหยุดการแบ่งตัวของเซลล์ที่ระยะ metaphase เมื่ออบครบ 72 ชั่วโมง นำไปปั่น (centrifuge) ที่ความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง เขย่าเบาๆ ทำให้เซลล์พองตัวโดยการเติมสารละลายโปตัสเซียมคลอไรด์ (0.56% KCl) 5-8 มล. นำไปอบประมาณ 30 นาที นำไปปั่นที่ความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง เขย่าเบาๆ หลังจากนั้นตรึงเซลล์โดยการหยดสารละลาย fixative (methanol : acetic acid 3:1) ลงไปทีละน้อยประมาณ 5-8 มล. เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °ซ เป็นเวลา 20 นาที นำไปปั่นที่ความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง และเติมสารละลาย fixative เพื่อตรึงเซลล์ อีก 2 ครั้ง เมื่อครบ 3 ครั้งเก็บตะกอนของเซลล์ไว้ในสารละลาย fixative ที่อุณหภูมิ 4 °ซ อย่างน้อย 12 ชั่วโมง ก่อนทำการศึกษาโครโมโซม

3. การศึกษาโครโมโซม

นำตัวอย่างที่เก็บไว้ที่ 4 °ซ มาปั่นแล้วดูดส่วนใสทิ้ง ทำให้เซลล์กระจายโดยหยดบนสไลด์ที่สะอาด ซึ่งเก็บที่อุณหภูมิ 4 °ซ ปล่อยสไลด์ให้แห้ง (air-dried) ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปย้อมสี Gimesa เป็นเวลานาน 30 นาที ศึกษาโครโมโซมบนสไลด์ด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง กำลังขยาย 100 และ 1,000 เท่า และถ่ายรูปโครโมโซมในระยะ metaphase ด้วยฟิล์มขาว-ดำ (Kodak Technical Pan Film) อัดและขยายรูปขนาด 5 x 7 นิ้ว เพื่อจัดทำคาริโอไทป์ต่อไป

4. การศึกษาโครโมโซมด้วยวิธี NOR's banding

นำสไลด์ที่มีเซลล์กระจายอยู่แช่ใน borate buffer ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบกำหนด นำสไลด์ไปล้างด้วยน้ำสะอาดหลายๆ ครั้ง และทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วหยด silver nitrate 2-3 หยด ลงบนสไลด์ และปิดด้วย coverslip จากนั้นนำสไลด์ใส่ใน moistured couplin jar และอุ่นในอ่างน้ำที่อุณหภูมิ 65 °ซ นาน 45 นาที สังเกตสีของสไลด์ ถ้าเป็นสีน้ำตาลเหลือง ให้ดึง coverslip ออก นำไปล้างในน้ำสะกาด และทำให้แห้ง (air-dried) แล้วนำไปย้อมสี Gimesa ที่มีความเข้มข้น 1% นาน 15 วินาที ล้างออกด้วยน้ำสะอาด ทิ้งไว้ให้แห้งแล้วปิดด้วย coverslip และศึกษาโครโมโซมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เช่นเดียวกับการศึกษาโครโมโซมโดยวิธีธรรมดา (ข้อ 3)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลการศึกษา

การศึกษาโครโมโซมด้วยวิธีธรรมดา

ผลการศึกษาโครโมโซมของจระเข้ด้วยวิธีธรรมดาพบว่า คาริโอไทป์ของจระเข้พันธุ์น้ำจืด (*Crocodylus siamensis*) คือ 2n = 30 ประกอบด้วยโครโมโซมเมตาเซนตริคขนาดใหญ่ 5 คู่ โครโมโซมอะโครเซนตริค 1 คู่ โครโมโซมซับเมตาเซนตริค 4 คู่ และโครโมโซมเมตาเซนตริคขนาดเล็ก 5 คู่ (รูปที่ 1) และคาริโอไทป์ของจระเข้พันธุ์น้ำเค็ม (*Crocodylus porosus*) คือ 2n = 34 ประกอบด้วยโครโมโซมเมตาเซนตริคขนาดใหญ่ 4 คู่ โครโมโซมอะโครเซนตริค 5 คู่ โครโมโซมซับเมตาเซนตริค 3 คู่ และโครโมโซมเมตาเซนตริคขนาดเล็ก 5 คู่ (รูปที่ 2)ในจระเข้ทั้งสองชนิดไม่พบความแตกต่างของคาริโอไทป์ระหว่างเพศผู้ และเพศเมีย และไม่สามารถบอกได้ว่าโครโมโซมคู่ใดเป็นโครโมโซมเพศ (sex chromosomes)

คาริโอไทป์ของลูกผสม (interspecific hybrids, F1) ระหว่างจระเข้พันธุ์น้ำจืดและจระเข้พันธุ์น้ำเค็ม คือ 2n = 32 โครโมโซมของจระเข้ลูกผสมเกิดจากการรวมกันของโครโมโซมเป็นจำนวนครึ่งหนึ่งของจากพ่อและแม่ อันประกอบด้วยโครโมโซมเมตาเซนตริคขนาดใหญ่ 9 ตัว โครโมโซมอะโครเซนตริค 6 ตัว โครโมโซมซับเมตาเซนตริค 7 ตัว และโครโมโซมเมตาเซนตริคขนาดเล็ก 10 ตัว (รูปที่ 3) ในลูกผสม F2 ที่เกิดจากการผสมระหว่างจระเข้รุ่น F1 และจระเข้พันธุ์น้ำจืดและพันธุ์น้ำเค็ม พบว่ามีคาริโอไทป์เกิดขึ้น 3 แบบ ขึ้นอยู่กับการจับคู่ผสมพันธุ์ ลูกผสมที่เกิดจากพ่อ/แม่ที่เป็น F1 และจระเข้พันธุ์น้ำจืดมีจำนวนโครโมโซม 2n = 31 ประกอบด้วยโครโมโซมเมตาเซนตริคขนาดใหญ่ 9 ตัว โครโมโซมอะโครเซนตริค 4 ตัว โครโมโซมซับเมตาเซนตริค 8 ตัว และโครโมโซมเมตาเซนตริคขนาดเล็ก 10 ตัว (รูปที่ 4) สำหรับลูกผสมที่เกิดจากพ่อแม่ที่เป็น F1 และจระเข้พันธุ์น้ำเค็ม คาริโอไทป์ที่พบ 2n = 33 ประกอบด้วยโครโมโซมเมตาเซนตริคขนาดใหญ่ 9 ตัว โครโมโซมอะโครเซนตริค 8 ตัว โครโมโซมซับเมตาเซนตริค 6 ตัว และโครโมโซมเมตาเซนตริคขนาดเล็ก 10 ตัว (รูปที่ 5)

ลูกผสมรุ่น F2 ที่เกิดจากการผสมพันธุ์ของจระเข้รุ่น F1 ด้วยกัน (*interse mating*)ให้ลูกจระเข้ที่มีคาริโอไทป์แบบเดียว คือมีจำนวนโครโมโซม 2n = 32 ประกอบด้วยโครโมโซมเมตาเซนตริคขนาดใหญ่ที่เหมือนกัน (homologous pair) 5 คู่ โครโมโซมอะโครเซนตริค 6 ตัว โครโมโซมซับเมตาเซนตริค 6 ตัว และโครโมโซมเม-ตาเซนตริคขนาดเล็ก 10 ตัว (รูปที่ 6) ผลการเปรียบเทียบคาริโอไทป์ของจระเข้พันธุ์น้ำจืด พันธุ์น้ำเค็ม และของลูกผสมทั้ง 4 ชนิด พบว่าจำนวนแขนของโครโมโซม (Fundametal number, NF) ในแต่ละคาริโอไทป์เท่ากันคือ 58

การศึกษา NOR's banding

เมื่อทำการศึกษาโครโมโซมด้วยวิธี NOR's banding พบลักษณะการติดสีของ nuclear organizer regions (NORs) ที่ชัดเจนมากอยู่เพียงตำแหน่งเดียวบนโครโมโซมอะโครเซนตริคที่เป็นคู่กันทั้ง 2 ตัว โดยพบทั้งในเพศผู้และเพศเมีย และทั้งในจระเข้พันธุ์น้ำจืดและพันธุ์น้ำเค็ม ตำแหน่งที่พบเป็น secondary constriction ที่อยู่ที่ตำแหน่งของ centromere บนโครโมโซมอะโครเซนตริคที่จระเข้พันธุ์น้ำจืดมีอยู่เพียง 1 คู่ (รูปที่ 7) ในจระเข้พันธุ์น้ำเค็มพบ ลักษณะนี้บนโครโมโซมอะโครเซนติค คู่ที่ 4 (รูปที่ 8) นอกจากนี้ยังพบลักษณะการติดสีแบบ heteromorphic NORs คือการติดสีหลายรูปแบบบนตำแหน่ง NORs ในจระเข้หลายตัว

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 1 คาริโอไทป์ของจระเข้พันธุ์น้ำจืดไทย *Crocodylus siamensis* 2n=30

Salt water crocodile **2n= 34**

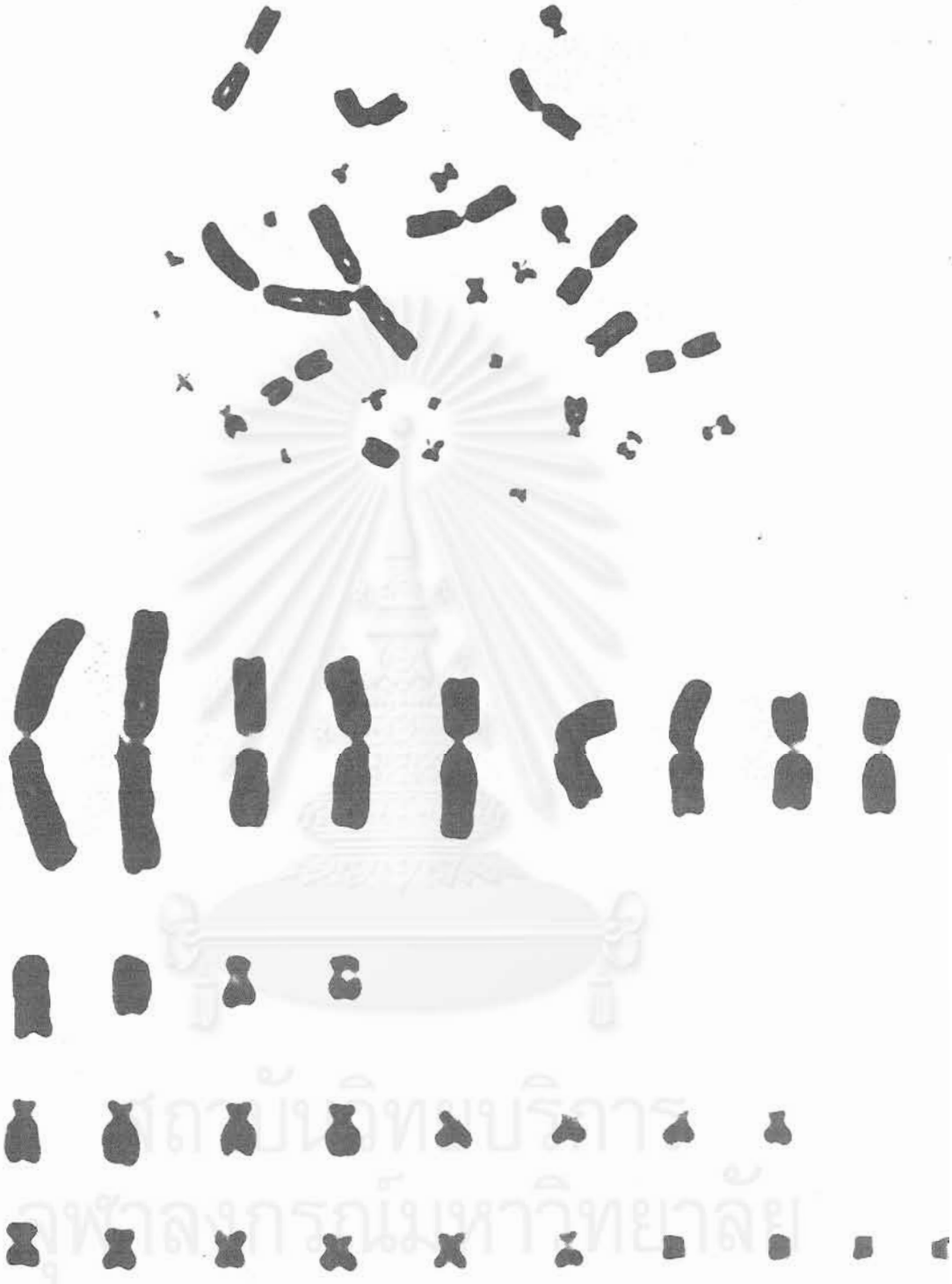
Crocodylus porosus **จระเข้พันธุ์น้ำเค็ม**

รูปที่ 2 คาริโอไทป์ของจระเข้พันธุ์น้ำเค็ม (*Crocodylus porosus*) 2n=34

CROSSBRED CROCODILE, F-1 2n= 32

C. siamensis x C. porosus จระเข้ลูกผสมชั่วที่ 1

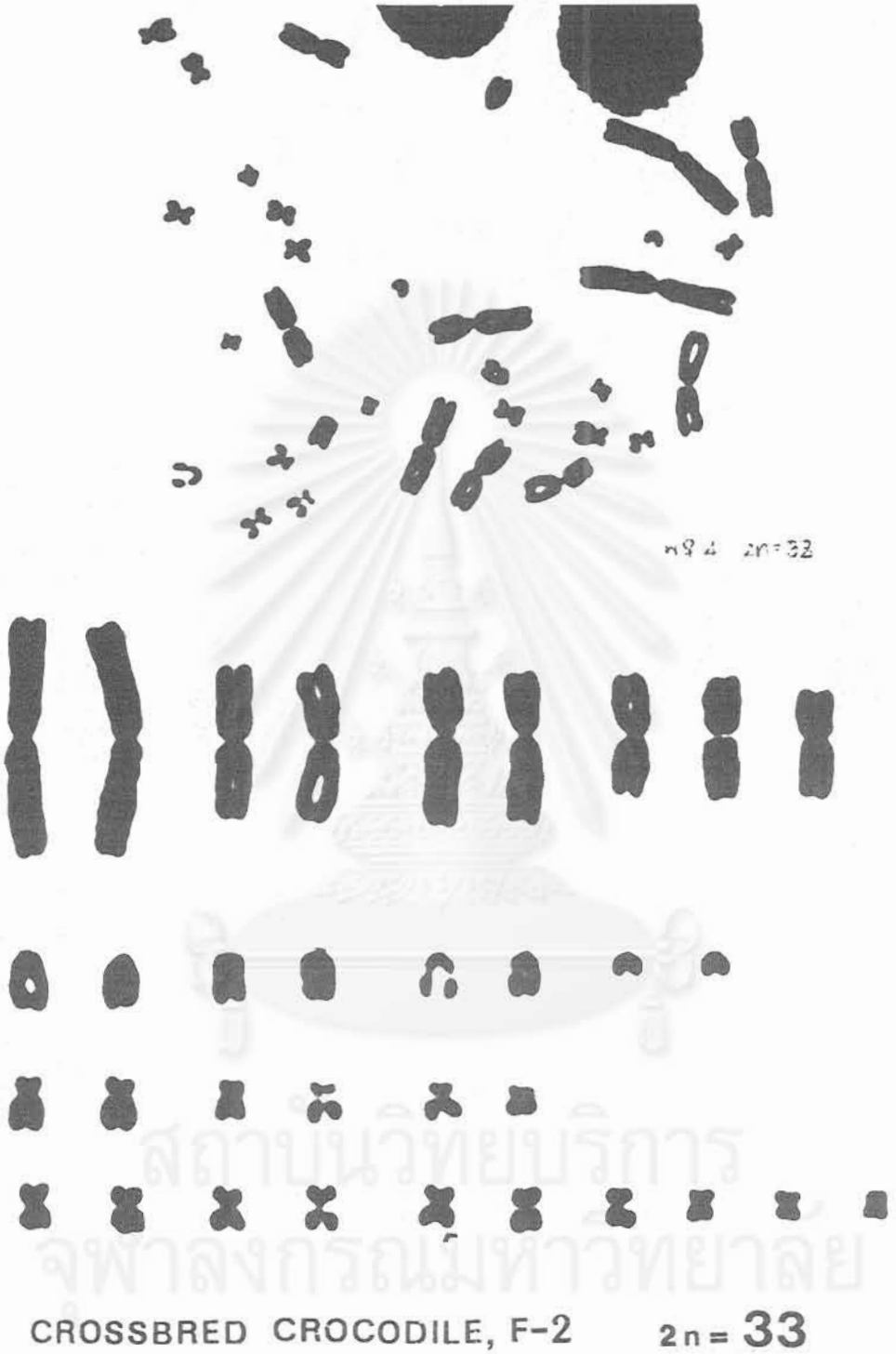
รูปที่ 3 คาริโอไทป์ของจระเข้ลูกผสมชั่วที่ 1 (*C. siamensis* x *C. porosus*) 2n=32



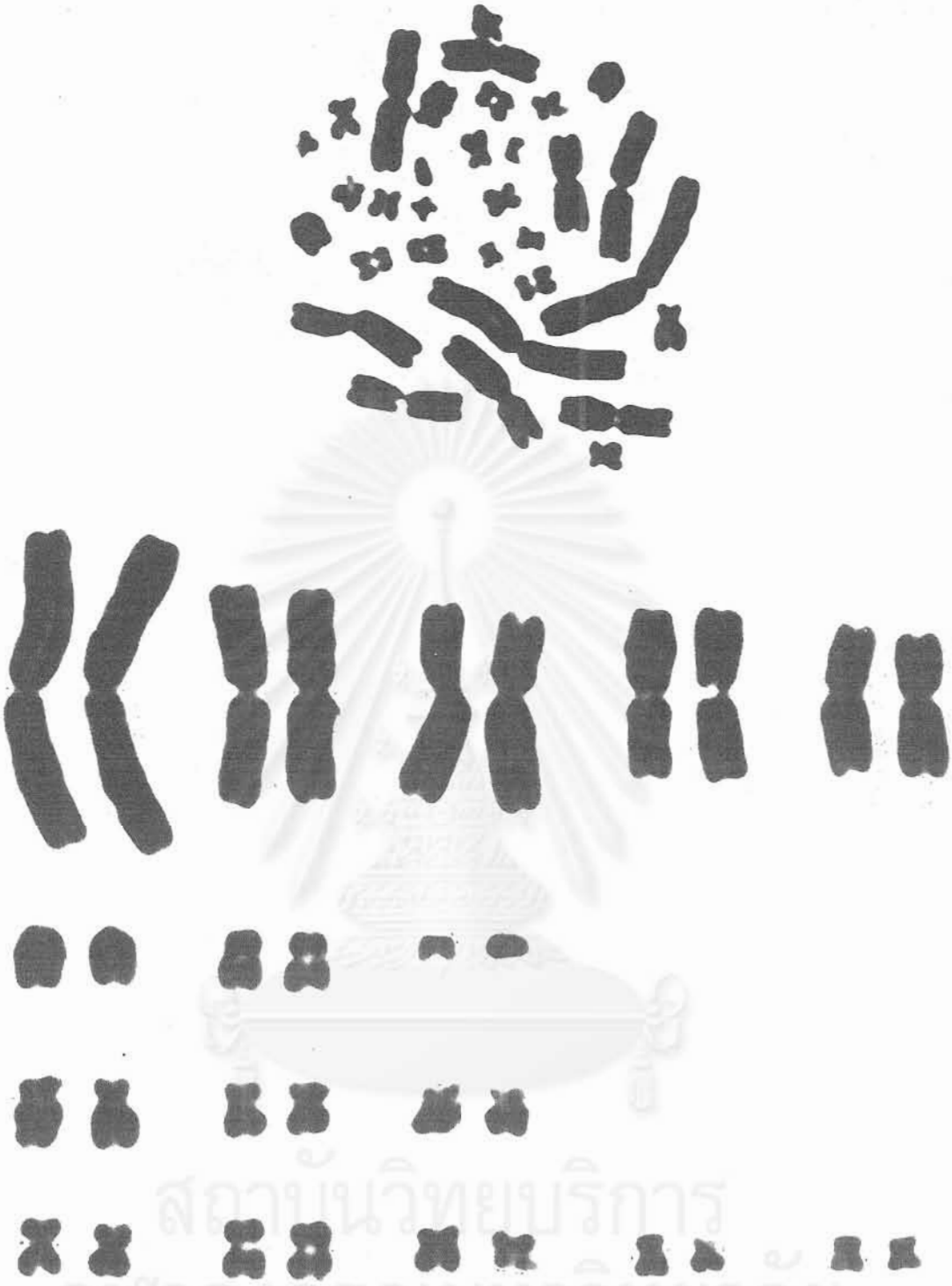
Crossbred crocodile, F2 2n= 31

C. siamensis X F1 จระเข้ลูกผสมชั่วที่ 2

รูปที่ 4 คาริโอไทป์ของจระเข้ลูกผสมชั่วที่ 2 (F1 x *C. siamensis*) 2n=31



รูปที่ 5 คาริโอไทป์ของจระเข้ลูกผสมชั่วที่ 2(F1 x *C. porosus*) 2n=33



CROSSBRED CROCODILE 2n = 32

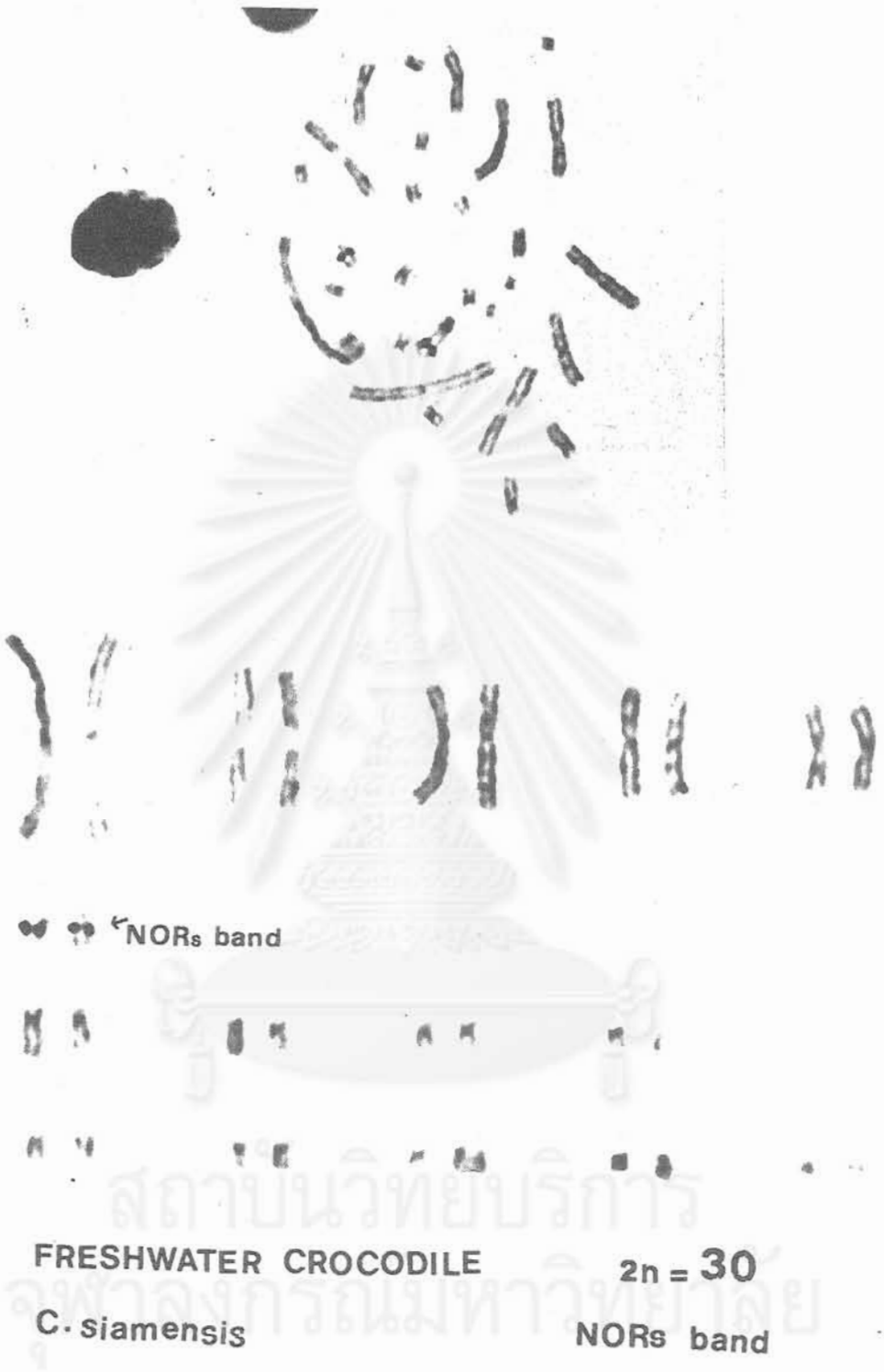
F2 (C.siamensis x C.porosus) จระเข้ลูกผสมชั่วที่ 2

(F1 x F1)

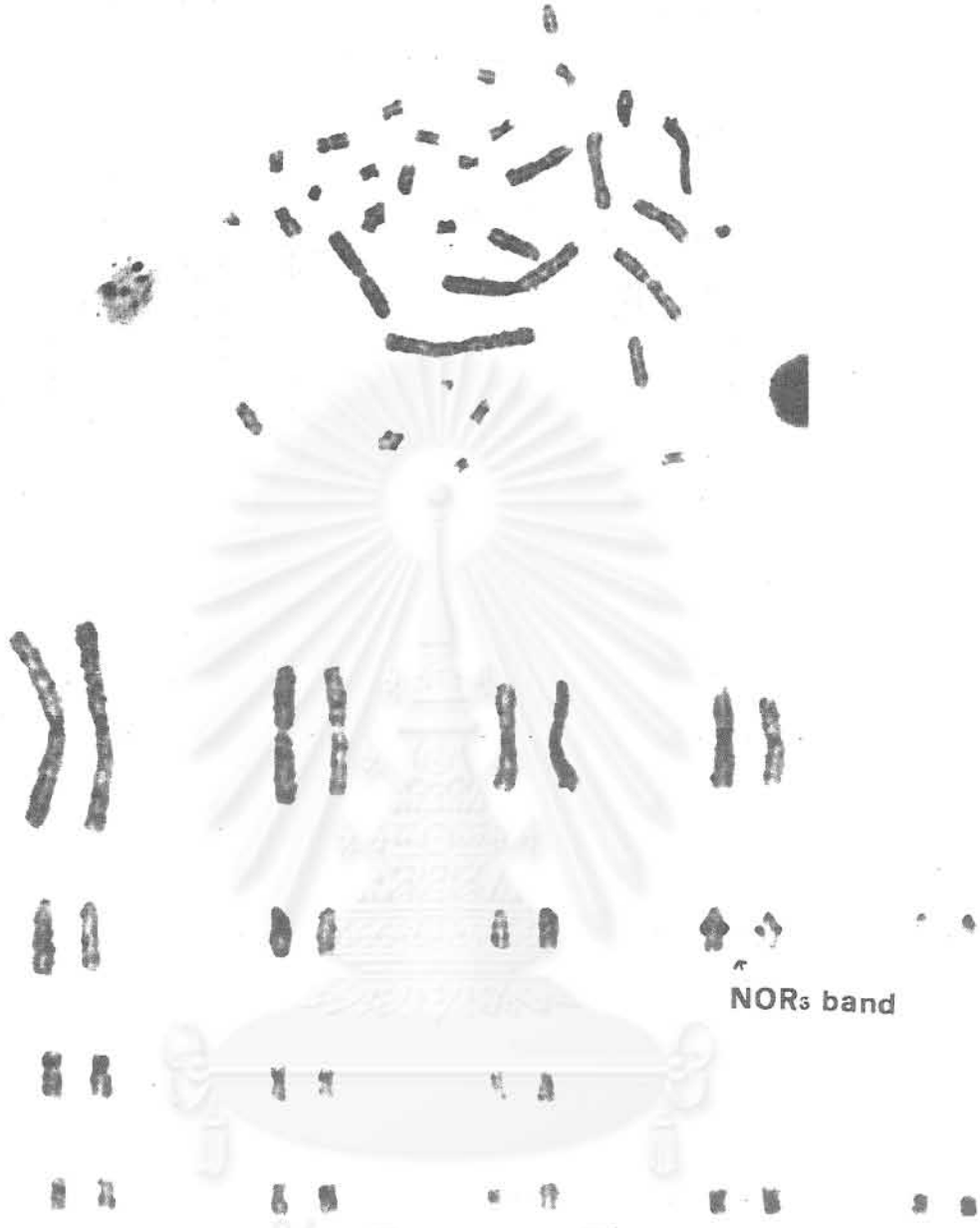
รูปที่ 6 คาริโอไทป์ของจระเข้ลูกผสมชั่วที่ 2 (F1 x F1) 2n = 32

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

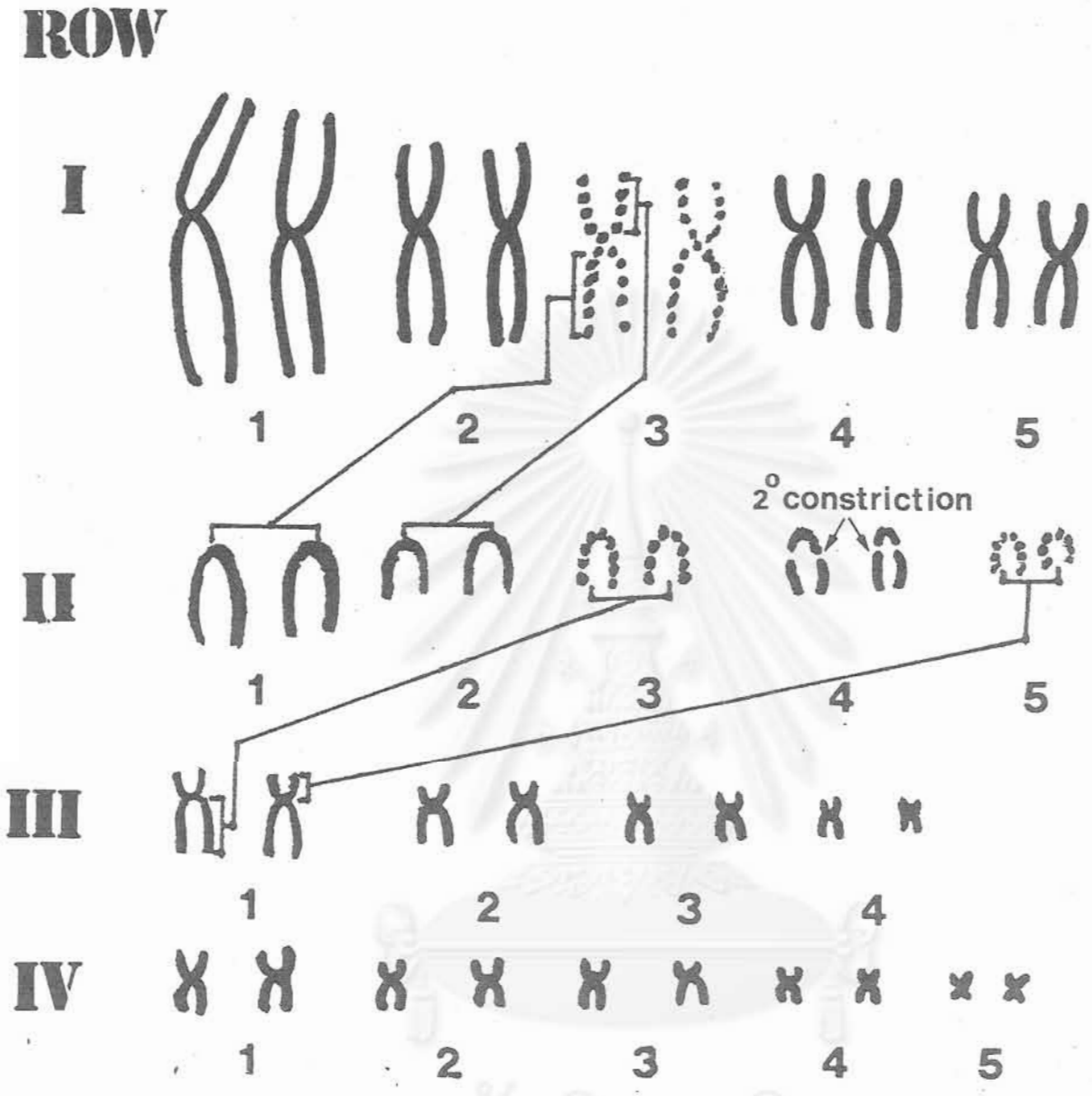
I18293335



รูปที่ 7 คาริโอไทป์ของจระเข้พันธุ์น้ำจืดไทยแสดง NOR's band ที่โครโมโซมอะโครเซนตริค, 2n = 30



รูปที่ 8 คาริโอไทป์ของจระเข้พันธุ์น้ำเค็มแสดง NOR's band ที่อะโครเซนตริคคู่ที่ 4, 2n = 34



รูปที่ 9 แผนภาพแสดงสมมติฐานของ chmosome arrangment ในจระเข้พันธุ์น้ำจืดและพันธุ์น้ำเค็ม

คำอธิบาย : ความแตกต่างของจำนวนโครโมโซมในจระเข้น้ำจืด, จระเข้น้ำเค็ม และจระเข้ลูกผสมแบบต่างๆ ขึ้นกับการเชื่อมกันของโครโมโซมคู่ที่ 1 และคู่ที่ 2 ของแถว II เป็นโครโมโซมคู่ที่ 3 ของแถว I และขึ้นกับการเชื่อมกันของโครโมโซมของคู่ที่ 3 และ 5 ของแถว II เป็นโครโมโซมคู่ที่ 1 ของแถว III

วิจารณ์

จระเข้พันธุ์น้ำจืด (*Crocodylus siamensis*) เป็นจระเข้พันธุ์ประจำถิ่นของประเทศไทย พบได้ตามแหล่งน้ำธรรมชาติในภูมิภาคต่างๆ จระเข้พันธุ์น้ำจืดเป็นสัตว์คนละชนิดกับจระเข้พันธุ์น้ำเค็ม (*Crocodylus porosus*) โดยมีความแตกต่างกันทั้งด้านลักษณะภายนอก และด้านพันธุศาสตร์ ลักษณะและจำนวนของโครโมโซมในจระเข้เคยมีผู้ศึกษาบ้างแต่ไม่กว้างขวางนัก สำหรับจระเข้ลูกผสมนั้นไม่เคยมีผู้ใดรายงานไว้เลย อาจเป็นไปได้ว่าจระเข้พันธุ์น้ำจืด และพันธุ์น้ำเค็มมีแหล่งที่อยู่อาศัยไม่เหมือนกัน และการผสมพันธุ์ตามธรรมชาติเกิดขึ้นได้ยาก การผสมข้ามชนิดของจระเข้เกิดขึ้นได้โดยฝีมือมนุษย์ เนื่องจากจระเข้ทั้งสองชนิดถูกเลี้ยงอยู่รวมกันโดยเจตนาในฟาร์ม การศึกษาพบว่า จระเข้ลูกผสมมีอัตราการเจริญเติบโตที่ดีกว่า ขนาดใหญ่กว่าพ่อแม่ ซึ่งเป็นลักษณะที่เป็นประโยชน์ในทางเศรษฐกิจในการเลี้ยงจระเข้เป็นอุตสาหกรรม

ในปี 1970, Cohen and Gans ได้รายงานจำนวนโครโมโซมในจระเข้พันธุ์น้ำจืด และพันธุ์น้ำเค็ม ว่ามีจำนวนเท่ากันคือ 2n = 34 อย่างไรก็ตามผลการศึกษาในครั้งนี้พบว่ามีเฉพาะจระเข้พันธุ์น้ำเค็มเท่านั้น ที่มีจำนวนโครโมโซม 2n = 34 ส่วนจระเข้พันธุ์น้ำจืดมีจำนวนโครโมโซม 2n = 30 อาจเป็นไปได้ว่าจระเข้ที่ Cohen and Gans ศึกษาเป็นจระเข้พันธุ์น้ำเค็มทั้งหมด เนื่องจากจระเข้สองพันธุ์เป็นสัตว์คนละชนิดกันและมีจำนวนโครโมโซมไม่เท่ากัน ทำให้ลูกผสมที่เกิดขึ้นเป็นลูกผสมข้ามชนิด (interspecific hybrids) และในกรณีนี้เป็นลูกผสมที่มีจำนวนโครโมโซมอยู่ระหว่างของพ่อและแม่ ลูกผสมระหว่างจระเข้พันธุ์น้ำจืดและพันธุ์น้ำเค็มรุ่น F1 (first generation) ในการศึกษาครั้งนี้มีจำนวนโครโมโซมเท่ากันทุกตัวตามที่คาดหมายไว้ตามหลักพันธุศาสตร์ คือ $2n = \frac{30+34}{2} = 32$

จากการศึกษาลักษณะของโครโมโซมพบว่าโครโมโซมของลูกผสมได้มาจากฝ่ายพ่อและแม่อย่างละครึ่ง และไม่สามารถจับคู่กันได้ (non-homologous) โดยธรรมชาติลูกผสมข้ามชนิดมักเป็นหมัน (sterile) และไม่สามารถสืบพันธุ์ต่อไปได้ ตัวอย่างเช่น ม้า (*Equus caballus*) มีจำนวนโครโมโซม 2n = 64 เมื่อผสมพันธุ์กับลา (*Equus asinus*) ที่มีจำนวนโครโมโซม 2n = 62 ได้ลูกผสมที่เรียกว่าล่อ (mule, hinny) ที่มีจำนวนโครโมโซม 2n = 63 ซึ่งเป็นหมันไม่สามารถสืบพันธุ์ต่อไปได้ อย่างไรก็ตามในบางกรณีที่การผสมข้ามชนิดระหว่างสัตว์ที่มีความสัมพันธ์เชิงพันธุศาสตร์วิวัฒนาการใกล้เคียงกัน ลูกผสมที่เกิดมาก็ไม่เป็นหมันและสามารถสืบพันธุ์ต่อไปได้ ถึงแม้ว่าการเจริญพันธุ์ในลูกผสมเหล่านี้อาจด้อยลง เนื่องจากการเจริญและการแบ่งตัวของเซลล์สืบพันธุ์ในระยะไมโอซิสอาจผิดปกติ ดังตัวอย่างของลูกผสมที่ไม่เป็นหมันได้แก่ ลูกผสมระหว่างโคยุโรป (*Bos taurus*) และโคซีบู (*Bos indicus*) โคทั้งสองชนิดมีจำนวนโครโมโซมเท่ากันคือ 2n = 60 อีกกรณีหนึ่งคือ ลูกผสมระหว่างกระบือปลัก (*Bubalus bubalis*, Swamp buffalo) ที่มีจำนวนโครโมโซม 2n = 48 และกระบือแม่น้ำ (*Bubalus bubalis*, River or murrah buffalo) ที่มีจำนวนโครโมโซม 2n = 50 ได้ลูกผสมที่ไม่เป็นหมัน แต่มีจำนวนโครโมโซมเป็นเลขคี่ 2n = 49 (Chavananikul et al., 1994.) สำหรับลูกผสม F1 ข้ามชนิดในจระเข้ทั้งสองพันธุ์นี้ มีจำนวนโครโมโซม 2n = 32 และไม่เป็นหมัน คณะผู้วิจัยสร้างสมมติ

ฐานไว้ว่าการที่ลูกผสมเหล่านี้มีโครโมโซมที่ไม่เหมือน (non-homologous) ไม่มีผลต่อการแบ่งตัวของโครโมโซมของเซลล์สืบพันธุ์ในลูกผสมเหล่านี้ถึงขนาดที่ทำให้สัตว์เป็นหมัน อย่างไรก็ตามการศึกษาการจับคู่ของโครโมโซมของเซลล์สืบพันธุ์ในระยะไมโอซิสควรได้มีการศึกษาวิจัยต่อไป

ลักษณะการติดสีของโครโมโซม โดยการย้อมสีด้วยวิธี NOR's banding พบลักษณะการติดสีของ NOR's ที่ชัดเจนมากอยู่เพียงตำแหน่งเดียวบนโครโมโซม acrocentric ที่เป็นคู่กันทั้งสองตัว โดยพบในจระเข้ทั้งสองสายพันธุ์ ตรงตำแหน่งที่เป็น secondary constriction ที่อยู่ใกล้ตำแหน่ง centromere ซึ่งในจระเข้พันธุ์น้ำจืดไทยเพียงคู่เดียว ส่วนในจระเข้พันธุ์น้ำเค็มเป็นโครโมโซม acrocentric คู่ที่ 4 ซึ่งลักษณะของ NORs ที่ตำแหน่ง secondary constriction นี้ ได้มีผู้รายงานไว้ในกระต่าย (Martin-Deleon et al., 1978.) จิงโจ้ และลิง (Goodpasture and Bloom, 1975)เป็นต้น

ในการเปรียบเทียบลักษณะการติดสีแบบ homomorphic NORs บนโครโมโซม acrocentric คู่ดังกล่าวในจระเข้พันธุ์น้ำจืดและจระเข้พันธุ์น้ำเค็ม พบว่ามีลักษณะการติดสีในเพศผู้และเพศเมียไม่แตกต่างกัน ดังแสดงในรูปที่ 7 และที่ 8

นอกจากนี้ยังพบลักษณะการติดสีแบบ heteromorphic NORs คือ การติดสีหลายรูปแบบบนตำแหน่ง NORs ในจระเข้หลายตัว ซึ่งตรงกับที่มีผู้รายงานไว้เสมอในการศึกษาโครโมโซมโดยการย้อมโดยวิธีนี้ (Schmid et al., 1987; Popescu et al., 1989; Schmid and Steinlein, 1991)

บริเวณ NORs ที่พบอยู่บนโครโมโซมเป็นบริเวณที่รวมของ DNA coding สำหรับใช้สร้าง RNA ที่จำเป็นในการผลิตไรโบโซมในนิวเคลียส การติดสีของ NORs เป็นปฏิกริยาของตะกอนเงินไปเกาะตรงโปรตีนที่เป็น non-histone ไม่ใช่ปฏิกริยาที่เกิดกับตัวเองของ DNA โดยตรง (Goodpasture and Bloom, 1975; Howell and Denton, 1976; Miller and et al., 1976) การติดสีหลายรูปแบบบนตำแหน่ง NORs นี้มีรายงานว่าเป็นผลมาจาก rRNA genes ตรงตำแหน่ง NORs ที่เปลี่ยนแปลงจำนวนได้ (Miller and Brown, 1969; Miller and Knownland, 1970; Macgregor and Kezer, 1973) กล่าวโดยสรุป การย้อมสีด้วยเทคนิค NOR's banding สามารถแสดงตำแหน่งของ secondary constriction ให้ชัดเจน ทั้งในจระเข้พันธุ์น้ำจืดไทย (*C. siamensis*) และจระเข้พันธุ์น้ำเค็ม (*C. porosus*) และไม่แตกต่างกันในเพศผู้และเพศเมีย

ผลการเปรียบเทียบคาริโอไทป์ของจระเข้พันธุ์น้ำจืดและน้ำเค็มในเชิงพันธุศาสตร์วิวัฒนาการสามารถตั้งสมมติฐานได้ว่าจระเข้พันธุ์น้ำเค็มที่มีจำนวนโครโมโซมมากกว่า (2n = 34) เกิดขึ้นก่อนจระเข้พันธุ์น้ำจืดที่มีจำนวนโครโมโซมน้อยกว่า (2n = 30) โดยทั้งที่สัตว์ทั้งสองชนิดนี้มีจำนวนแขนของโครโมโซม (fundamental number, NF) เท่ากันคือ 58 เนื่องจากในระหว่างช่วงวิวัฒนาการจากจระเข้พันธุ์น้ำจืดเกิดการจัดตัวใหม่ของโครโมโซม (chromosome rearrangement) ซึ่งอาจเกิดขึ้นในรูปของ chromosome translocation (centric fusion) โดยโครโมโซมแบบอะโครเซนตริคของโครโมโซมคู่ 1 และ 2 รวมตัวกันเกิดเป็นโครโมโซมคู่ที่ 3 ของจระเข้พันธุ์น้ำจืดซึ่งเป็นโครโมโซมเมตาเซนตริค และทำให้โครโมโซมแบบเมตาเซนตริคของจระเข้พันธุ์น้ำจืดในคาริโอไทป์แถวที่ 1 มีจำนวน 5 คู่ (มากกว่าของจระเข้พันธุ์น้ำเค็ม 1 คู่) นอก

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากนี้โครโมโซมอะโครเซนตริคของจระเข้พันธุ์น้ำเค็มคู่ที่ 3 และ 5 (ในคาริโอไทป์แถวที่ 2) ยังเกิดการรวมตัวเป็นโครโมโซมซับเมตาเซนตริคคู่แรกของแถวที่ 3 ของจระเข้พันธุ์น้ำจืด

สมมติฐานนี้สอดคล้องกับการศึกษาคาริโอไทป์ของจระเข้พันธุ์น้ำจืด และพันธุ์น้ำเค็มด้วยวิธี NOR's banding เนื่องจาก NOR's band ในจระเข้พันธุ์น้ำจืดเกิดขึ้นบนโครโมโซมอะโครเซนตริคซึ่งมีอยู่เพียงคู่เดียว (รูปที่ 7) ในขณะที่ในคาริโอไทป์ของจระเข้พันธุ์น้ำเค็มเกิดขึ้นบนคู่ที่ 4 ดังนั้นโครโมโซมอะโครเซนตริคที่หายไปย่อมเป็นคู่ที่ 1,2,3 และ 5 ซึ่งโครโมโซมอะโครเซนตริคคู่ที่ 1 และ 2 ไปเกิดเป็นโครโมโซมเมตาเซนตริคขนาดใหญ่คู่ที่ 3 (แถวที่ 1) และโครโมโซมอะโครเซนตริคคู่ที่ 3 และ 5 รวมตัวกันเกิดเป็นโครโมโซมซับเมตาเซนตริคคู่ที่ 1 ของแถวที่ 3 ในจระเข้น้ำจืดดังได้กล่าวแล้ว

ปรากฏการณ์ที่ทำให้จระเข้พันธุ์น้ำจืดคงเหลือโครโมโซมอะโครเซนตริคในแถวที่ 2 เพียงคู่เดียว และมีโครโมโซมเมตาเซนตริคขนาดใหญ่ขึ้นมา 1 คู่ และโครโมโซมซับเมตาเซนตริคเพิ่มขึ้นอีก 1 คู่ (รูปที่ 9) การจัดเรียงตัวและรวมตัวกันของโครโมโซมอะโครเซนตริคเกิดเป็นโครโมโซมซับเมตาเซนตริค หรือเมตาเซนตริคนี้เหมือนกับวิวัฒนาการของการเกิดสัตว์ชนิดใหม่ที่ยังคงมีจำนวนแขนของโครโมโซม (NF) เท่ากันที่ได้รับการตั้งสมมติฐานในสัตว์ชนิดอื่นๆ ได้แก่ ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของแพะ (*Capra hircus*) และแกะ (*Ovis aris*) โดยที่โครโมโซมชนิดอะโครเซนตริคของแพะ (2n =60) 6 คู่ เกิดเป็นโครโมโซมชนิดเมตาเซนตริค 3 คู่ ในแกะ (Basrur, 1996)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ ร้อยเอกนายแพทย์ปัญญา ยังประภากร และเจ้าหน้าที่ของบริษัทฟาร์มจระเข้สมุทรปราการและสวนสัตว์จำกัดที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเจาะเลือดจระเข้ และขอขอบคุณทุนวิจัยงบประมาณแผ่นดินที่ให้การสนับสนุนด้านเงินทุนวิจัย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกสารอ้างอิง

ปัญญา ยังประภากร. 2533. จระเข้พันธุ์ลูกผสม. เอกสารเผยแพร่ของฟาร์มจระเข้และสวนสัตว์สมุทรปราการ.

Basrur PK. 1996. A guide to genetic counselling in Veterinary Medicine. Vaspar Press , Guelph , Ontorio , Canada. 258 pages.

Chavananikul V, Chantaraprateep P, wattanadorn S, Na Chiangmai A, Onwan N, Deemakarn T. 1994. Different karyotypes in crossbred buffaloes (Swamp x River). Proceeding of the 1st Asian Buffalo Association Congress, Khonkaen, Thailand, 17-21 Jan. 1994: 137-153

Cohen MM, Gans C. 1970. The Chromosome of the order Crocodilia. Cytogenet; 9: 81-105.

Goodpasture C, Bloom SE. 1975. Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. Chromosoma; 53 : 37-50.

Howell WM, Denton TE. 1976. Negative silver staining in A-T and satellite DNA-rich regions of human chromosomes. Chromosoma; 57 : 165-9.

Macgregor HC, Kezer J.1973. The nucleolar organizer of Plethodon cinereus cinereus (Green). I. Location of the nucleolar organizer by in situ nucleic acid hybridization. Chromosoma: 42 : 415-26.

Martin-Deleon PA. Petrosky DL, Fleming ME. 1978. Nucleolar organizer regions in the rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) as shown by silver staning. Can J Genet Cytol; 20: 377- 82.

Miller DA, Dev VG. Tantravahl R, Miller OJ. 1976. Suppression of nucleolus organizer activity in mouse- human somatic hybrid cells. Exp Cell Res; 101: 235-43.

Miller L , Brown DD. 1969. Variation in the activity of nucleolar organizers and their ribosomal gene content. Chromosoma; 28:430-44.

Miller L, Knowland J. 1970 Reduction of ribosomal RNA genes in a mutant of *Xenopus laeris* which organizes only a partial nucleolus II . The number of ribosomal RNA genes in animals of different nucleolar types. J Mol Biol; 53:329-38.

Popescu CP, Boscher J. Malynicz GL. 1989. Chromosome R-banding patterns and NOR homologous in the European wild pig and four breeds of domestic pig. Ann Genet; 32 (3):136-40.

Schmid M, Steinlein C. 1991. Chromosome banding in Amphibia. XVI. High-resolution repllcation banding patterns in *Xenopus laevis*. Chromosoma; 101: 123-32.

Schmid M, Vitelll L, Batlstonl R. 1987. Chromosome banding in Amphibia. Xl. Constitutive heterochromatin, nucleolus organizers, 18S+28S and 5S ribosomal RNA genes in Ascaphidae, Discoglossidae and Pelobatidae. Chromosoma; 95: 271-84.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย