รายงานงานฉบับสมบูรณ์

ทุนสนับสนุนจากโครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย (โครงการ BRT R_245001)
(1 สิงหาคม 2545 – 31 กรกฎาคม 2547)

โครงการ การผสมข้ามพันธุ์และความแตกต่างแปรผันทางพันธุกรรมของลิงวอก (*Macaca mulatta*) ณ วัดถ้ำผาหมากฮ่อ จังหวัดเลย

รองศาสตราจารย์ ดร. สุจินดา มาลัยวิจิตรนนท์ และคณะ
หน่วยวิจัยไพรเมท ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายงานงานฉบับสมบูรณ์

ทุนสนับสนุนจากโครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย (โครงการ BRT R_245001)
(1 สิงหาคม 2545 – 31 กรกฎาคม 2547)

โครงการ การผสมข้ามพันธุ์และความแตกต่างแปรผันทางพันธุกรรมของลิงวอก *(Macaca mulatta)* ณ วัดถ้ำผาหมากฮ่อ จังหวัดเลย

รองศาสตราจารย์ ดร. สุจินดา มาลัยวิจิตรนนท์ และคณะ
หน่วยวิจัยไพรเมท ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอกราบนมัสการท่านเจ้าอาวาสวัดถ้ำผาหมากฮ่อ อำเภอวังสะพุง จังหวัดเลย (พระคำแปลง ปุณณิช) ที่กรุณาให้เข้าไปศึกษาลิงวอกและให้ความช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ ขอขอบคุณนายอนุ กุลบุตร และนายชลิต ม่วงสุวรรณ นักศึกษามหาวิทยาลัยราชภัฏนครสวรรค์ นายดิลก ญาณกลิ่น เจ้าหน้าที่เลี้ยงสัตว์ทดลอง ประจำหน่วยวิจัยไพรเมท ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย นายนนทกรณ์ อุรโสภณ นิสิตปริญญาเอกสังกัดหลักสูตรวิทยาศาสตร์ชีวภาพ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และนางสาวขวัญตา แทนสา นิสิตปริญญาโทสังกัดหลักสูตรสหสาขาสรีรวิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ช่วยเหลืองานต่าง ๆ ของโครงการวิจัยทั้งในภาคสนามและในห้องปฏิบัติการ ขอขอบคุณ Professor Dr. Osamu Takenaka Department of Cellular and Molecular Biology, Primate Research Institute, Kyoto University, Japan สำหรับคำแนะนำในการศึกษาเกี่ยวกับดีเอนเอในไพรเมทและการสนับสนุนสารเคมีต่าง ๆ ในการวิจัย ขอขอบคุณโครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทยที่ให้ทุนสนับสนุนโครงการ (โครงการ BRT R_245001) และขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้สถานที่ในการทำวิจัยและขอขอบคุณจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยให้ทุนสนับสนุน "หน่วยวิจัยเพื่อการพัฒนาสู่การเป็นศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทาง (RU)" แก่หน่วยวิจัยไพรเมท

สารบัญ

สารบัญ (ต่อ)

คณะผู้วิจัย :

ชื่อ	ดร.สุจินดา มาลัยวิจิตรนนท์
ตำแหน่งทางวิชาการ	รองศาสตราจารย์
คุณวุฒิ	วิทยาศาสตร์ดุษฎีบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ
ความชำนาญ/ความสนใจพิเศษ	Reproductive endocrinology, molecular biology, primatology
สถานที่ติดต่อ	หน่วยวิจัยไพรเมท ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330
โทรศัพท์	02-2185275, 2185375-6
โทรสาร	02-2185386
E-mail address	Suchinda.M@chula.ac.th
ความรับผิดชอบในโครงการที่เสนอ และความรับผิดชอบอื่นๆ ที่อยู่ระหว่างดำเนินงาน	วางแผนการทดลอง ดำเนินการทดลอง วิเคราะห์ผลการทดลอง สรุปผลการทดลอง เขียนรายงาน และเขียนบทความเพื่อตีพิมพ์ในวารสารวิจัย

ชื่อ	Dr. Yuzuru Hamada
ตำแหน่งทางวิชาการ	รองศาสตราจารย์
คุณวุฒิ	วิทยาศาสตร์ดุษฎีบัณฑิต
ความชำนาญ/ความสนใจพิเศษ	Primatology, Morphology
สถานที่ติดต่อ	Primate Research Institute, Kyoto University, Inuyama, Aichi 484-0081, JAPAN
โทรศัพท์	81-568-63-0521
โทรสาร	81-568-62-4857
E-mail address	hamada@pri.kyoto-u.ac.jp
ความรับผิดชอบในโครงการที่เสนอ และความรับผิดชอบอื่นๆ ที่อยู่ระหว่างดำเนินงาน	ดำเนินการทดลอง วิเคราะห์ผลการทดลอง สรุปผลการทดลองและเขียนบทความเพื่อตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ

ชื่อ	นางกันยา กาวิน
ตำแหน่งทางวิชาการ	อาจารย์
คุณวุฒิ	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาสัตววิทยา
ความชำนาญ/ความสนใจพิเศษ	Molecular biology, primatology
สถานที่ติดต่อ	ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครสวรรค์ นครสวรรค์ 60000
โทรศัพท์	056-227009, 222341 ต่อ 162
โทรสาร	056-221554, 226781
E-mail address	kanya25@hotmail.com

ความรับผิดชอบในโครงการที่เสนอ และความรับผิดชอบอื่นๆ ที่อยู่ระหว่างดำเนินงาน ดำเนินการทดลอง วิเคราะห์ผลการทดลองและสรุปผลการทดลอง

ชื่อ ดร. เจษฎา เด่นดวงบริพันธ์

ตำแหน่งทางวิชาการ อาจารย์

คุณวุฒิ วิทยาศาสตร์ดุษฎีบัณฑิต สาขา Molecular Biology

ความชำนาญ/ความสนใจพิเศษ Molecular biology, botany

สถานที่ติดต่อ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330

โทรศัพท์ 02-2185378

โทรสาร 02-2185386

E-mail address jess_den@rocketmail.com

ความรับผิดชอบในโครงการที่เสนอ และความรับผิดชอบอื่นๆ ที่อยู่ระหว่างดำเนินงาน วิเคราะห์ผลการทดลอง สรุปผลและร่วมตรวจสอบรายงานผลการทดลอง และร่วมเขียนบทความเพื่อตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ

1. บทสรุปโครงการ

จากการศึกษาโครงสร้างประชากรของลิงวอก(*Macaca mulatta*) ณ วัดถ้ำผาหมากฮ่อ อำเภอวังสะพุง จังหวัดเลย ซึ่งเป็นเนินเขาหินปูนและล้อมรอบด้วยพื้นที่เกษตรกรรม ในเดือนกุมภาพันธุ์ – มีนาคม 2546 พบว่ามีลิงอยู่ฝูงเดียว มีประชากรทั้งหมด 110 ตัว เป็นลิงระยะโตเต็มวัยจำนวน 41 ตัว (เพศผู้ 6 ตัวและเพศเมีย 35 ตัว) วัยเด็ก จำนวน 38 ตัว และลูกอ่อน จำนวน 8 ตัว มีลิงกัง (*M. nemestrina leonina*) ที่ชาวบ้านนำมาปล่อย ทำหน้าที่เป็นจ่าฝูง (alpha male) นอกจากนี้ยังพบฝูงลิงที่มีเฉพาะลิงเพศผู้ (male group) จำนวน 9 ตัว และ solitary male อีก 2 ตัว ลิงออกหากินอาหารจากธรรมชาติ เช่น ยอดอ่อนของใบไม้และลูกไทรที่มีกระจายอยู่ทั่วไปบนเนินเขาในช่วงเช้าที่เวลาประมาณ 0600-0800 น. จากนั้นฝูงลิงจะเคลื่อนไปอยู่บริเวณหน้าเขาเพื่อรอรับอาหาร เช่น กล้วย มะขามหวาน ถั่วลิสง ข้าวเหนียว และแตงโม จากพระและนักท่องเที่ยว จากการสังเกตพบว่าลิงวอก ณ วัดถ้ำผาหมากฮ่อมีฤดูกาลในการผสมพันธุ์ โดยจะผสมพันธุ์กันในช่วงเดือนธันวาคม – มีนาคม และคลอดลูกครั้งละ 1 ตัว ในช่วงเดือนเมษายน – กรกฎาคม นอกจากการเข้าผสมพันธ์ของลิงวอกเพศผู้กับลิงวอกเพศเมียในช่วงเวลาดังกล่าวแล้ว ยังพบการเข้าผสมพันธุ์ของลิงกังเพศผู้กับลิงวอกเพศเมียอีกด้วย และในระยะเวลาที่เข้าไปทำการศึกษาจึงลูกลิงที่มีลักษณะผสมกันระหว่างลิงกังและลิงวอกที่คาดว่าจะเป็นลิงลูกผสม เพศผู้ทั้งหมดจำนวน 3 ตัว

จากการวางกรงดักและเป่าลูกดอกยาสลบลิงในเดือนมีนาคม 2546 สามารถจับลิงได้ทั้งหมด 33 ตัว (เพศผู้ 11 ตัว และเพศเมีย 22 ตัว) โดยเพศผู้ทั้ง 11 ตัวนั้น ประกอบด้วยลิงวอก 8 ตัว ลิงกัง 1 ตัว และลิงลูกผสมจำนวน 2 ตัว ลิงกังที่จับได้ได้นำมาทำหมัน เพื่อป้องกันการเกิดลูกผสมที่อาจจะเกิดขึ้นได้อีกในอนาคต ซึ่งการทำหมันดังกล่าวไม่ได้มีผลกระทบต่อโครงสร้างประชากรของลิง เพราะเมื่อติดตามศึกษาโครงสร้างประชากรลิงฝูงนี้ภายหลังการทำหมันลิงกังนาน 6 เดือน พบว่าลิงกังยังคงทำหน้าที่เป็นจ่าฝูงของลิงทั้งหมดเช่นเดิม จากการตรวจวิเคราะห์พยาธิในอุจจาระของลิงที่จับได้ พบพยาธิทั้งหมด 18 ตัวอย่างจาก 27 ตัวอย่างที่เก็บ โดยพยาธิที่พบมีเพียงชนิดเดียว คือ *Oesophagostomum sp* เมื่อเปรียบเทียบค่าฮีมาโตคริตพบว่าลิงเพศเมียมีค่าฮีมาโตรคริตสูงกว่าลิงเพศผู้ ($p=0.004$) ระดับไขมันและค่าทางชีวเคมีในเลือด ได้แก่ คลอเลสเตอรอล, ไตรกลีเซอไรด์, HDL, LDL, SGOT และ SGPT ในลิงเพศเมียไม่แตกต่างจากลิงเพศผู้ เมื่อวิเคราะห์ค่าต่าง ๆ ทางสัณฐานวิทยาของลิงวอกจากวัดถ้ำผาหมากฮ่อเทียบกับลิงวอกที่มีแหล่งกำเนิดจากประเทศจีนและอินเดีย ที่เลี้ยงไว้ที่ Primate Research Institute, มหาวิทยาลัยเกียวโต พบว่าลิงวอกจากวัดถ้ำผาหมากฮ่อมีขนาดเล็กว่า แต่มีความยาวหางมากกว่า (ประมาณ 10 – 25%) ลิงวอกจากจีนและอินเดีย แต่รูปแบบของสีขนในลิงวัดถ้ำผาหมากฮ่อยังคงเป็น “bipartite pattern” ซึ่งเป็น key character ของลิงวอกอยู่เช่นเดียวกันกับลิงวอกจีนและอินเดีย

จากการศึกษาลำดับนิวคลิโอไทด์ของ mtDNA จำนวน 477 คู่เบส และ TSPY gene จำนวน 711 (713) คู่เบส เพื่อพิสูจน์ว่าลูกลิงทั้งสองตัวที่จับได้ที่คาดว่าเป็นลิงลูกผสมนั้น เป็นลิงลูกผสมจริงหรือไม่ ซึ่งผลที่ได้จากการวิเคราะห์ทางดีเอนเอสอดคล้องกับผลทางสัณฐานวิทยา นั่นคือลิงลูกผสมที่จับได้ 1 ตัว ที่แสดงลักษณะของลิงกัง คือ ขนที่หัวมีสีดำและแสกกลาง ขนที่ลำตัวไม่เป็น bipartite pattern และขนที่แก้มไม่ม้วนเป็นก้นหอย เป็นลิงลูกผสมที่เกิดจากพ่อลิงกังและแม่ลิงวอกจริง และเมื่อนำลำดับนิวคลิโอไทด์ดังกล่าวมาวิเคราะห์ phylogenetic tree เทียบกับลิงวอกที่มีแหล่งกำเนิดจากประเทศจีนและอินเดีย และลิงหางยาวที่มีแหล่งกำเนิดทางภาคเหนือและภาคใต้ของไทย พบว่าลิงวอก ณ วัดถ้ำผาหมากฮ่อแบ่งออกเป็น 2 genogroups หรือมี maternal lineage 2 สาย ซึ่งเป็นลักษณะที่ไม่เคยมีรายงานมาก่อน เพราะลิงเป็นสัตว์

สังคม ดังนั้นโดยปกติในลิงแต่ละฝูงมักจะมี maternal lineage 1 สายเท่านั้น นั่นแสดงว่าลิงวอก วัดถ้ำผาหมากฮ่อเกิดจากลิงวอก 2 ฝูงมารวมกันตั้งแต่ในอดีตและไม่สามารถแยกออกไปตั้งเป็นฝูงใหม่ได้ อันเนื่องจากความจำกัดและการถูกแบ่งแยกพื้นที่ที่อยู่อาศัย (habitat fragmentation) โดยมนุษย์ได้เปลี่ยนแปลงพื้นที่ดังกล่าวเป็นพื้นที่เกษตรกรรม และจาก phylogenetic tree ลิงวอกวัดถ้ำผาหมากฮ่อจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับลิงหางยาวในประเทศไทยแต่แยกกลุ่มจากลิงวอกจีนและอินเดีย ซึ่งผลการทดลองนี้มีแนวโน้มที่จะไปสนับสนุนสมมติฐาน "The Hybridization Hypothesis" ของ Fooden (2000) ที่ว่าลิงวอกในประเทศไทยเป็นลิงลูกผสมที่เกิดจากลิงวอกพันธุ์แท้กับลิงหางยาวครั้งในอดีต แต่อย่างไรก็ตามการที่จะพิสูจน์ทฤษฎีนี้ให้ชัดเจนจำเป็นจะต้องมีข้อมูลของลิงวอกฝูงอื่น ๆ ในประเทศไทยมาเปรียบเทียบเพิ่มเติมต่อไป

จากการศึกษาในครั้งนี้จะเห็นได้ว่าการทำลายแหล่งที่อยู่อาศัยและแหล่งอาหารของลิงวอก มาทำเป็นพื้นที่เกษตรกรรมทำให้ลิงวอกวัดถ้ำผาหมากฮ่อ ถูกแบ่งแยกออกจากลิงวอกฝูงอื่น ๆ (conspecific) และทำให้ลิงวอก 2 ฝูงย่อยต้องมาอาศัยอยู่ร่วมกัน และการปล่อยลิงกังเข้าฝูงลิงวอกสามารถให้กำเนิดลิงลูกผสมได้ ซึ่งจากลักษณะดังกล่าวจะทำให้ gene pool ของลิงวอกฝูงนี้เปลี่ยนไป ลักษณะดังกล่าวนี้เป็นหนึ่งในตัวอย่างของการเกิด "genetic pollution"

2. วัตถุประสงค์ของโครงการ

1) เพื่อศึกษาการเกิดลูกผสม (hybrid) ที่ได้จากการผสมข้ามพันธุ์ระหว่างลิงวอกเพศเมียและลิงกังเพศผู้
2) เพื่อติดตามศึกษาความแตกต่างแปรผันทางพันธุกรรม (genetic variation) ของลิงวอกกลุ่มนี้ ที่มีการผสมพันธุ์กันเองภายในกลุ่ม (inbreeding) เป็นเวลานานกว่า 20 ปี
3. เพื่อติดตามศึกษาลักษณะทางกายภาพและสรีรวิทยาอื่น ๆ ในลิงแต่ละตัว
4. เพื่อเก็บรวบรวมตัวอย่างดีเอนเอ (stock of DNA extraction product) ของลิงวอกในประเทศไทย สำหรับการศึกษาอื่นใดทางชีววิทยาเชิงโมเลกุลของลิงวอกในอนาคต
5. เพื่อวางแผนอนุรักษ์ลิงกลุ่มนี้ในอนาคต ก่อนที่จะสูญพันธุ์ไปจากประเทศไทย

3. การดำเนินงาน

3.1. การดำเนินงานในภาคสนาม

3.1.1. <u>ศึกษาลักษณะโครงสร้างประชากร พฤติกรรมการหาอาหาร การนอน และการผสมพันธุ์</u>

ศึกษาลักษณะโครงสร้างประชากร พฤติกรรมการหาอาหาร การนอนและการผสมพันธุ์ ระหว่างเดือนกุมภาพันธ์และมีนาคม 2546 ตั้งแต่เวลา 0600-2000 น. โดยติดตามนับจำนวนลิงโดยวิธี ad libitum (Altman, 1974) จำแนกลิงตามเพศและระยะการเจริญตามวิธีการของ Dittus (1980)

3.1.2. <u>สร้างกรงสำหรับดักจับลิงวอก</u>

ขณะที่ทำการศึกษาในข้อ 3.1.1 ได้สร้างกรงดักขนาด 6 เมตร X 6 เมตร โดยกรงดักจะมีประตูทางเข้า 1 ทาง เพื่อให้ลิงเดินเข้าได้ นำอาหารมาให้ลิงกินภายในกรงทุกวัน ๆ ละ 3 ครั้ง ที่เวลา 0830 น. 1300 น. และ 1800 น. เพื่อให้ลิงคุ้นเคย (habituation) กับกรงดัก ในการวางกรงจะต้องวางที่บริเวณพื้นราบเชิงเขา ซึ่งช่วงเวลาที่ทำการวางกรงดักเดือนมีนาคม เป็นช่วงฤดูแล้งที่ไม่ค่อยมีอาหารและน้ำให้ลิงกินมากนักบนเนินเขา ทำให้ลิงจำเป็นต้องลงมากินอาหารที่ล่อไว้ในกรงดัก จึงทำให้สามารถจับลิงได้ดี หลังจากที่ล่อให้ลิงคุ้นกับกรงนานประมาณ 2 สัปดาห์ ได้เริ่มจับลิงโดยนำอาหารที่มีขนาดเล็ก เช่น ถั่วลิสง ข้าวโพด และข้าวเปลือก มาล่อไว้ในกรง เพื่อให้ลิงใช้เวลานานในการเข้ามาเอาอาหารในกรง เมื่อลิงเข้ามาในกรงจำนวนมากพอปิดประตูกรง ปลดตาข่าย ฉีดยาสลบ (ketamine hydrochloride, 10 mg/kg BW) เข้ากล้ามเนื้อเพื่อสลบลิง เมื่อลิงสลบแล้วนำลิงออกมาจากกรงเพื่อนำไปชั่งน้ำหนัก ศึกษา dermatoglyphic morphometrics และสีขน (pelage color) เก็บอุจจาระและเจาะเลือดเพื่อนำไปวิเคราะห์ ถ่ายรูป ตรวจสุขภาพ จากนั้นจะใช้สีย้อมผม (สีดำ) แต้มที่ปลายหาง เพื่อใช้เป็นสัญลักษณ์ว่าลิงตัวดังกล่าวเคยถูกจับแล้ว ป้องกันการจับลิงตัวเดิมซ้ำอีกครั้ง รอจนกระทั่งลิงฟื้นเต็มที่ จึงปล่อยลิงกลับฝูงเดิมต่อไป สำหรับลิงกังซึ่งเป็นลิงที่ฉลาดและระแวดระวังภัยสูง ทำให้ไม่สามารถจับได้ด้วยกรงดัก จำเป็นต้องใช้วิธีเป่าลูกดอกยาสลบ

3.1.3. <u>การเจาะเลือด</u>

เก็บเลือดทางเส้นเลือดหน้าขา (femoral venepuncture) โดยเก็บเลือดประมาณ 3 มิลลิลิตร/1 กิโลกรัม น้ำหนักตัว แต่ไม่เกิน 10 มิลลิลิตร/ตัว นำเลือดที่เจาะได้ผสมกับ heparin 0.1 มิลลิลิตรให้เข้ากันทันทีและแช่เลือดที่ได้ในน้ำแข็ง

ปั่นเลือดที่ได้ที่ 2,000 รอบ/นาที นาน 20 นาที แยกเก็บพลาสมา, buffy-coat ที่มีเม็ดเลือดขาวและเกล็ดเลือดอยู่, และเม็ดเลือดแดง แช่ไว้ที่ –20 องศาเซลเซียล จนกว่าจะนำไปวิเคราะห์ต่อไป

3.1.4. การศึกษา palmar และ plantar dermatoglyphics

Dermatoglyphics คือลักษณะที่เป็นร่องรอยหยักบนผิวหนัง ซึ่งส่วนมากจะปรากฏบริเวณฝ่ามือ (palmar dermatoglyphics) และฝ่าเท้า (plantar dermatoglyphics) จะมีลักษณะจำเพาะในสัตว์ Order Primates และเป็นเหมือนกับ identification card สำหรับลิงแต่ละตัว จึงทำให้เป็นประโยชน์ในการติดตามศึกษาสัตว์ตัวนั้น ๆ อย่างต่อเนื่องเป็นเวลานาน ๆ ในภาคสนาม โดยไม่ทำให้เกิดเป็นร่องรอยหลงเหลืออยู่บนตัวสัตว์ ดังนั้นจะไม่มีผลไปรบกวนสถานะทางสังคม (social rank) ของลิง นอกจากนี้ผลที่ได้จากการศึกษา dermatoglyphics สามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางสายเลือด (paternity test) ว่าลิงตัวใดเป็นพ่อ แม่ และลูกของลิงตัวใดได้ด้วย โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติที่จำเพาะ ซึ่งในขณะนี้ยังไม่มีในประเทศไทย ในการวิจัยครั้งนี้จะศึกษารอยพิมพ์ลายมือและลายเท้า (palmar and plantar dermatoglyphics) ตามวิธีการของ Iwamoto and Suryobroto (1990)

3.1.5. การตรวจวัดค่า morphometrics

ลิงที่สลบจะนำมาวัดส่วนต่าง ๆ ทั้งหมด 54 ลักษณะ โดยดำเนินการตามวิธีของ Martin *et al.* (1957) และมีการปรับปรุงภายหลังโดย Iwamoto (1971) พร้อมกับดูฟัน (dental formula) เพื่อใช้ในการประมาณอายุของลิง (Iwamoto *et al.*, 1984; Iwamoto *et al.*, 1987; Smith *et al.*, 1994) ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงการประมาณอายุจาก dental formula ของลิงญี่ปุ่น *(Macaca fuscata)* ลิงวอก (*Macaca mulatta*) และลิงหางยาว (*Macaca fascicularis*)

Dental Formula		*M. fuscata*		*M. mulatta*	*M.fascicularis*	
		Erupt	Full	Erupt	Erupt	Full
i i	i i	1 week	3 week	2 week	2 week	
ii ii	ii ii	2 week	1.5 month	1 month	1 month	
cii cii	iic iic	2 month	4 month	a little bit slower, upper slower than lower		
mcii mcii	iicm iicm	2 month	3.5 month	2 month	2.5 month	
mmcii mmcii	iicmm iicmm	4 month	8 month	5 month	5.5 month	
Mmmcii Mmmcii	iicmmM iicmmM	1.5 year	2 year	1.25 year	1.25 year	1.25 year
MmmciI MmmciI	IicmmM IicmmM	2.5 year	2.75 year	2.5 year	2.5 year	2.5 year
MmmcII MmmcII	IIcmmM IIcmmM	2.75 year	3.5 year	2.5 year	2.5 year	2.75 year
MM(mmc)II MM(mmc)II	II(cmm)MM II(cmm)MM	3.5 year	4 year	3.25 year	3.25 year	3.25 year
MMPP(c)II MMPP(c)II	II (c)PPMM II (c)PPMM	4 year	4.75 year	3.5 year	3.5 year	3.5 year
MMPPCII MMPPCII	IICPPMM IICPPMM	4 year	5.5 year	3.25 year	3 year	3.25 year
MMMPPCII MMMPPCII	IICPPMM IICPPMM	5.75 year	6.25 year	5.5 year	5.5 year	5.75 year

i = incisor, c = canine, m = molar, p = premolar

3.1.6. <u>การตรวจวัดสีขน (pelage color)</u>

วัดสีขน โดยใช้เครื่อง color analyzer (Model CR-200, Minolta Co., Ltd) ซึ่งแสดงเป็นค่า 3 ค่าดังนี้

L* = lightness from 0 (darkest) – 100 (lightest)

a* = green (-60) - red (+60)

b* = blue (-60) - yellow (+60)

โดยการวัดสีขนจะวัดตามบริเวณต่าง ๆ ของร่างกายลิงทั้งหมด 11 ตำแหน่ง คือ vertex, face, back, upper arm, forearm, head, waist, sexual skin, thigh, leg, foot

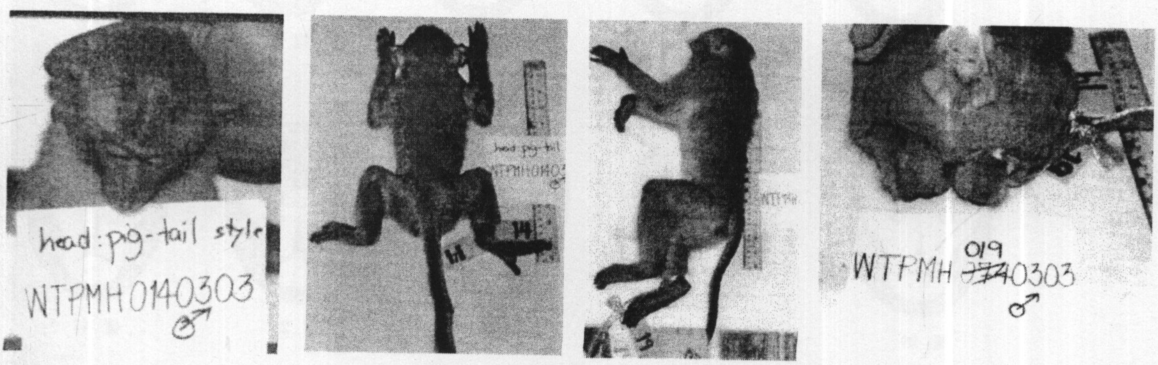
3.1.7. <u>การเก็บอุจจาระ</u>

เก็บอุจจาระโดยใช้หลอดทดลองพลาสติกที่มีช้อนตักยึดติดอยู่ในหลอด โดยเก็บอุจจาระจากก้นของลิงโดยตรง เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของปรสิตจากภายนอกตัวลิง ซึ่งจะทำให้ผลการทดลองผิดพลาด จากนั้นใส่สารละลาย 10% buffer formalin ให้ท่วมอุจจาระ นำไปตรวจหาปรสิตในห้องปฏิบัติการต่อไป

3.1.8. <u>ถ่ายรูป</u>

ถ่ายรูปลิงในขณะที่สลบอยู่ ตัวละ 4 ท่า คือ หัว (vertex),ด้านหลัง, ด้านข้า และ ischial callosity และ sexual skin (ดังรูปที่ 1) โดยใช้ฟิล์มสไลด์ (film color slide 200) เพื่อนำมาใช้ศึกษาเปรียบเทียบทางสัณฐานวิทยาในภายหลัง

รูปที่ 1 แสดงการถ่ายรูปลิงเพื่อนำมาใช้ศึกษาเปรียบเทียบทางสัณฐานวิทยาในภายหลัง



หัว **ด้านหลัง** **ด้านข้าง** **ischial callosity & sexual skin**

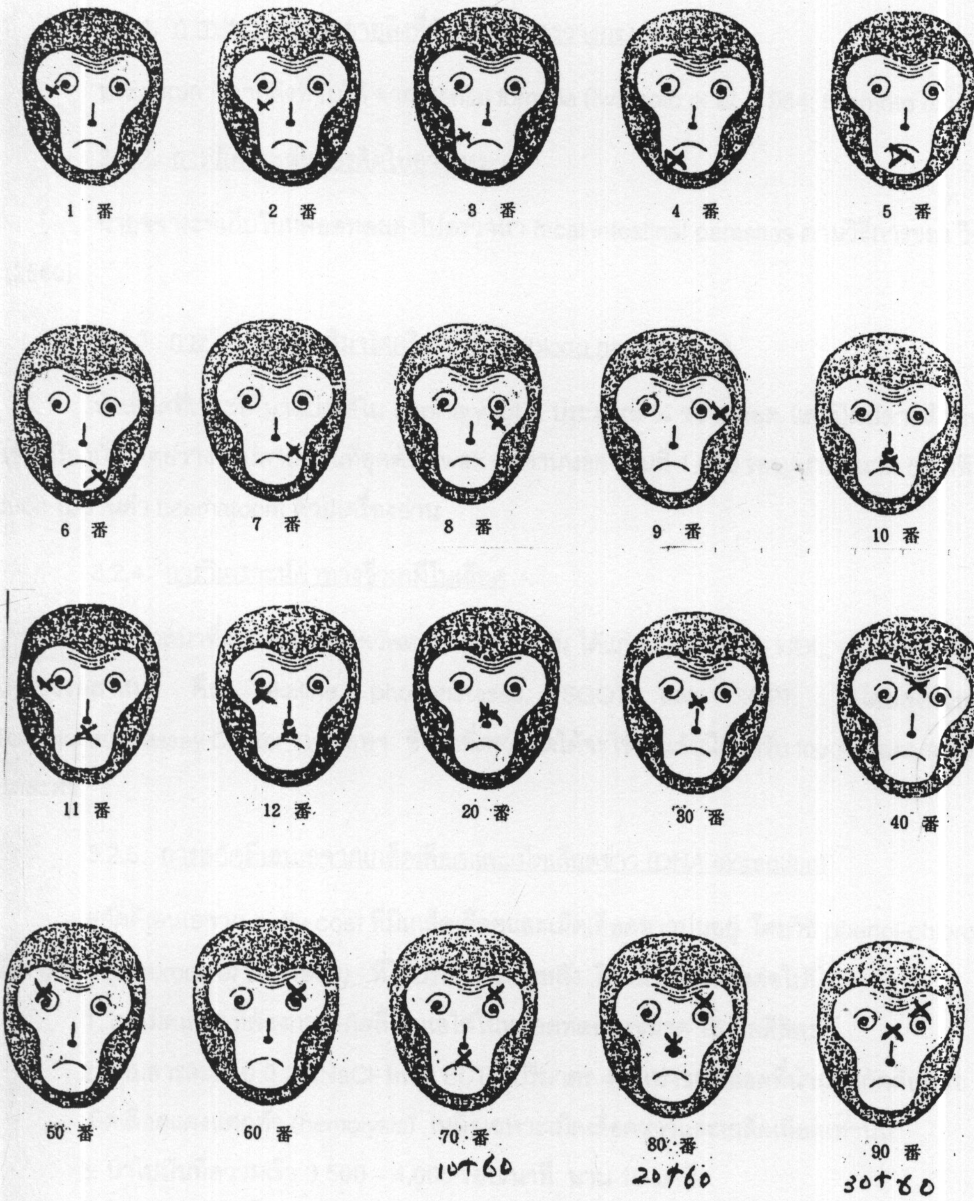
3.1.9. <u>ตรวจสุขภาพลิง</u>

ภายหลังการเก็บข้อมูลต่าง ๆ ในขณะที่ลิงสลบอยู่ ทำการตรวจสุขภาพลิง ถ้าหากมีรอยแผลจะทำการเย็บและฉีด antibiotic ในลิงเพศเมียบางตัวจะคลำท้อง (palpation) เพื่อตรวจสอบการตั้งท้องด้วย

3.1.10. <u>การสัก (tatooing) และทำเครื่องหมายปลายหาง</u>

ทำการสักเป็นจุด ๆ ที่บริเวณใบหน้าลิงที่จับได้ ตามรหัสของ Primate Research Institute มหาวิทยาลัยเกียวโต (ดังรูป 2) เพื่อใช้ในการติดตามศึกษาโครงสร้างประชากรและพฤติกรรมของลิงแต่ละตัวในอนาคต และใช้ยาย้อมผม (สีดำ) ทำเครื่องหมายที่ปลายหาง เพื่อใช้บ่งบอกว่าลิงตัวใดได้ถูกจับมาศึกษาแล้ว เพื่อป้องกันการจับซ้ำตัวเดิม

รูปที่ 2 แสดงการสักที่หน้าลิง เพื่อใช้ในการบอกลำดับที่ (numbering) และใช้ในการจำแนกลิงแต่ละตัว



3.1.11. <u>การทำหมันลิงกังเพศผู้</u>

เพื่อป้องกันการเกิดลูกผสมระหว่างลิงกังเพศผู้และลิงวอกเพศเมียต่อไปในอนาคต และเพื่ออนุรักษ์ลักษณะทางพันธุกรรม (gene pool) ของลิงวอกกลุ่มนี้ จึงจำเป็นต้องทำหมัน (bi-vasectomy and mono-orchidectomy) ลิงกังเพศผู้ซึ่งจะทำโดยสัตวแพทย์ในคณะวิจัย

3.1.12. <u>ศึกษาลักษณะโครงสร้างประชากรของลิงวอกภายหลังจากการทำหมันลิงกังเพศผู้</u>

ภายหลังจากการทำหมันลิงกังเพศผู้นานประมาณ 6 เดือน (ระหว่างเดือนกันยายน 2546) ได้กลับไปศึกษาลักษณะโครงสร้างทางสังคมของลิงวอกอีกครั้ง และยังได้ติดตามศึกษาต่อไปอีกทุก ๆ 6 เดือน โดยประมาณ

3.2. การดำเนินงานในห้องปฏิบัติการ

3.2.1. การประมาณการอายุลิงที่จับได้จากการวางกรงดัก

ประมาณการอายุลิงที่จับได้ จาก dental formula (Iwamoto *et al.*, 1984; Iwamoto *et al.*, 1987) ตามตารางที่ 1

3.2.2. การวิเคราะห์หาปรสิตในอุจจาระ

นำอุจจาระที่เก็บในหลอดทดลองไปตรวจหา fecal intestinal parasites ตามวิธีการของ วิฑูรย์และพีรพรรณ (2540)

3.2.3. การวิเคราะห์ค่าฮีมาโตคริตในเลือด (blood haematocrit)

นำเลือดที่เจาะได้มาแบ่งใส่ใน capillary tube ประมาณ ¾ ของหลอด และปิดปลายด้านหนึ่งด้วย wax นำไปเข้าเครื่องปั่น โดยวางให้ปลายด้านที่อุดด้วย wax อยู่ด้านนอก ปั่นที่ 1,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที จากนั้นนำ capillary tube ไปอ่านค่า haematocrit ด้วยเครื่องอ่าน

3.2.4. การวิเคราะห์ค่าทางชีวเคมีในเลือด

นำพลาสมาที่แยกได้มาตรวจวัดหาค่าระดับไขมัน ได้แก่ triglyceride, HDL, LDL และคอเลสเตอรอล ค่าทางชีวเคมีของพลาสมา คือ alkaline phosphatases, SGOT และ SGPT โดยส่งตัวอย่างพลาสมาไปตรวจที่ Radioimmunoassay Center, กรุงเทพฯ ซึ่งค่าที่ตรวจวัดได้จะใช้เป็นดัชนีสำหรับ food-intake/food resources สำหรับลิงแต่ละตัว

3.2.5. การสกัดดีเอนเอจากเกล็ดเลือดและเม็ดเลือดขาว (DNA extraction)

สกัดดีเอนเอจาก buffy-coat ที่มีเกล็ดเลือดและเม็ดเลือดขาวปนอยู่ โดยวิธี phenol-chloroform extraction ตามวิธีการของ Sambrook *et al.* (1989) ที่ได้ปรับปรุงภายหลัง โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. ดูดเม็ดเลือดที่ต้องการสกัดดีเอนเอใส่ในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร
2. เติมสารละลาย 0.2%NaCl-1mM EDTA ปริมาตร 4-5 เท่าของเลือดที่นำมาสกัดดีเอนเอ เขย่าให้เข้ากันเพื่อให้เม็ดเลือดแดงแตกตัว (hemolysis) เหลือเฉพาะเม็ดเลือดขาวและเกล็ดเลือดเท่านั้น
3. นำไปปั่นที่ความเร็ว 3,500 – 4,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที
4. ดูดสารละลายชั้นบน (supernatant) ซึ่งมีสีแดงจากการแตกตัวของเม็ดเลือดแดงทิ้งไป
5. เติมสารละลาย 0.2%NaCl-1mM EDTA ปริมาตร 4-5 เท่าของเม็ดเลือดที่อยู่ในหลอดทดลอง เขย่าให้เข้ากัน
6. นำไปปั่นที่ความเร็ว 3,500 – 4,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที
7. ดูดสารละลายชั้นบน (supernatant) ทิ้งไป
8. เติมสารละลาย 1x STE ผสมให้เข้ากันกับเม็ดเลือดที่ตกตะกอนอยู่โดยใช้ pasture pipette ระวังอย่าให้เกิดฟอง
9. เตรียมหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร ที่ทนต่อสารละลาย phenol และ chloroform และเติมสารละลายดังต่อไปนี้

1x STE 2 ml

10% SDS 200 ul

5 mg/ml proteinase K 50 ul

10. ดูดสารละลายในข้อ 8 ที่มีเม็ดเลือดขาวและเกล็ดเลือดปนอยู่ลงในหลอดทดลองข้อ 9

11. พักไว้ให้เกิดปฏิกริยา (incubate) ที่อุณหภูมิ 37 – 60 องศาเซลเซียส นาน 2-4 ชั่วโมง และ/หรือเอียงหลอดไปมาถ้าสารละลายที่ได้มีความหนืดมาก

12. เติมสารละลายดังต่อไปนี้

5 M NaCl (1/10 เท่า) 250 ul

Phenol (1/2 เท่า) 1.25 ml

CIAA (1/2 เท่า) 1.25 ml [CIAA = chloroform:isoamyl alcohol ในอัตราส่วน 24:1]

13. เอียงหลอดไปมานาน 2 ชั่วโมง

14. นำไปปั่นที่ความเร็ว 3,500 – 4,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที สารละลายที่ได้จะแยกออกเป็น 2 ชั้น โดยอาจจะพบก้อนโปรตีนสีขาวแทรกอยู่ระหว่างสารละลายทั้ง 2 ชั้น

15. ดูดสารละลายดีเอนเอที่อยู่ชั้นบนใส่ใน dialysis bag จากนั้นนำไป dialyze ในสารละลาย 1x TE ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ข้ามคืน

16. ตัดถุง dialysis bag และดูดสารละลายดีเอนเอใส่ในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร

17. เติมสารละลาย 10 mg/ml RNase A ปริมาตร 10-20 ul โดยปริมาตรที่เติมขึ้นอยู่กับการปนเปื้อนของ RNA ในสารละลายดีเอนเอ

18. พักไว้ให้เกิดปฏิกริยา ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

19. เติมสารละลายดังต่อไปนี้ลงในหลอดทดลอง

5 M NaCl (1/50 เท่า) 60 ul

5 mg/ml Proteinase K 50 -100 ul (แล้วแต่ความหนืดของสารละลายดีเอนเอ ถ้าหนืดมากให้เติม proteinase K มาก)

20. พัก (หรืออาจเอียงหลอดไปมา) ที่อุณหภูมิ 37 – 60 องศาเซลเซียส นาน 2 – 4 ชั่วโมง

21. เติมสารละลายดังต่อไปนี้ ลงในหลอดทดลอง

5 M NaCl (1/10 เท่า) 300 ul

Phenol (1/2 เท่า) 1.5 ml

CIAA (1/2 เท่า) 1.5 ml [CIAA = chloroform:isoamyl alcohol ในอัตราส่วน 24:1]

เอียงหลอดไปมานาน 2 ชั่วโมง

22. นำไปปั่นที่ความเร็ว 3,500 – 4,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที สารละลายที่ได้จะแยกออกเป็น 2 ชั้น

23. ดูดสารละลายดีเอนเอที่อยู่ชั้นบนใส่ใน dialysis bag จากนั้นนำไป dialyze ในสารละลาย 1x TE ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมง

24. เปลี่ยนสารละลาย 1x TE และ dialysis ต่อไปนาน 12 ชั่วโมง

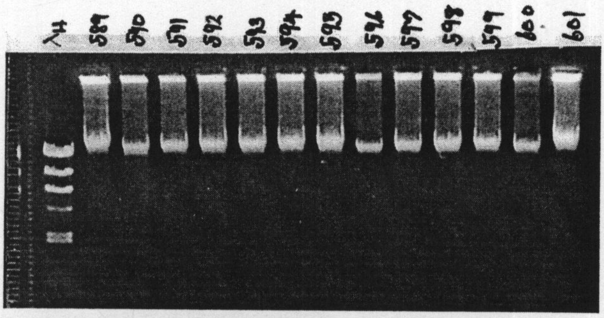
25. ตัดถุง dialysis bag และดูดสารละลายดีเอนเอที่ได้ใส่ในขวดแก้ว (vial) และแบ่งสารละลายดีเอนเอบางส่วนสำหรับนำไปตรวจสอบความบริสุทธิ์โดยวิธี agarose gel electrophoresis และนำไปวัดค่าความเข้มข้นโดยเครื่อง spectophotometer หยด chloroform ลงไป 2-3 หยดในขวดแก้วที่มีสารละลายดีเอนเออยู่ เพื่อป้องกันการเจริญของแบคทีเรีย (anti-bacteria) พัน parafilm และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ซึ่งสารละลายดีเอนเอที่สกัดด้วยวิธีนี้มีความบริสุทธิ์สูงและ เสถียร สามารถเก็บตัวอย่างดีเอนเอเป็น DNA bank ไว้เพื่อการศึกษาอื่น ๆ (ที่ 4 องศาเซลเซียส) ได้นานกว่า 15 ปี (จากประสบการณ์ที่ได้เริ่มเก็บดีเอนเอด้วยวิธีนี้มาตั้งแต่ปี ค.ศ. 1986 ณ Primate Research Institute, Kyoto University, ประเทศญี่ปุ่น) **ซึ่งดีเอนเอของลิงวอกที่ได้นี้จะเก็บไว้ที่หน่วยวิจัยไพรเมท ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อจัดทำเป็น DNA bank ของไพรเมทในประเทศไทย ซึ่งขณะนี้ได้เก็บตัวอย่างดีเอนเอของลิงสกุล *Macaca* ชนิดต่าง ๆ ไว้รวมประมาณ 900 ตัวอย่างแล้ว**

3.2.6. <u>การตรวจสอบความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของดีเอนเอที่สกัดได้</u>

นำดีเอนเอที่สกัดได้ไปตรวจสอบความบริสุทธิ์และหาปริมาณคร่าว ๆ โดยวิธี agarose gel electrophoresis โดยใช้ 0.5% agarose gel ทำโดย load ตัวอย่างดีเอนเอปริมาณ 10 ul ลงในหลุมบนเนื้อเจล run นานประมาณ 1 ชั่วโมง จากนั้นย้อมชิ้นดีเอนเอที่ได้ด้วย Ethidium bromide และนำไปส่องดูภายใต้แสง UV ดีเอนเอที่สกัดได้ที่จัดว่ามีคุณภาพดีเมื่อนำมาตรวจสอบจะมีแบนค่อนข้างหนา ไม่มีการปนเปื้อนของโปรตีนและ RNA อยู่ (ถ้ามีการปนเปื้อนจะเห็นปื้นของโปรตีนและRNA ในเจล) และดีเอนเอที่ได้จะต้องไม่มีการหักเป็นชิ้นสั้น ๆ (ถ้ามีการหักเป็นชิ้นสั้น ๆ จะเห็นเป็นแถบขาวของดีเอนเอในแผ่นเจลที่เรียกว่า smear band) ดีเอนเอที่สกัดได้ดังรูปที่ 3 จัดเป็นดีเอนเอคุณภาพดี

รูปที่ 3 แสดงตัวอย่างดีเอนเอที่สกัดได้ด้วยวิธี phenol chloroform extraction และนำมาตรวจสอบคุณภาพบน 0.5% agarose gel electrophoresis



3.2.7. <u>การตรวจวัดความเข้มข้นของดีเอนเอที่สกัดได้โดยเครื่อง spectophotometer</u>

นำดีเอนเอที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectophotometer (Ultraspec 2000 UV) ที่ความยาวคลื่น 260 nm โดยจะนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาค่าความเข้มข้นของดีเอนเอโดยเทียบกับดีเอนเอมาตราฐาน (standard DNA) ที่รู้ค่าความเข้มข้นและนำไปอ่านค่าดูดกลืนแสงพร้อมกัน โดยมีวิธีการคำนวณดังนี้

กำหนดให้ดีเอนเอมาตราฐานที่ใช้คือ λ standard ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.1 ug/ul นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 nm มีค่าเท่ากับ 1.430

เมื่อนำตัวอย่างดีเอนเอที่สกัดได้ไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 nm มีค่าเท่ากับ 0.815 ดังนั้นตัวอย่างดีเอนเอที่สกัดได้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.1 x 0.815/1.430 = 0.058 ug/ul

3.2.8. <u>การเพิ่มปริมาณดีเอนเอโดยปฏิกริยาลูกโซ่ (DNA amplification) และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลิโอไทด์ (sequencing) ของไมโตคอนเดรียลดีเอนเอ</u>

เพิ่มจำนวนไมโตคอนเดรียลดีเอนเอ (mitochondrial DNA; mtDNA) ส่วน control region หรือ D-loop โดยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากลำดับนิวคลิโอไทด์ของยีน mt DNA ในลิงญี่ปุ่น Japanese macaque (*Macaca fuscata*) (Hayasaka *et al.*,1991)ดังนี้

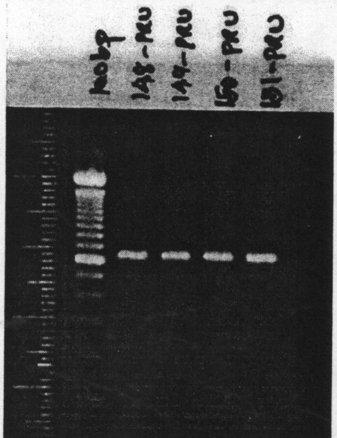
474 (saru-4 by horai): 5'-ATC AGG GTC TAT CAC CC TAT-3'

561 (saru-5 by horai): 5'-GGC CAG GAC CAA GCC TAT TTG-3'

ไพรเมอร์ 474 เป็น biotinylated primer (primer ที่เชื่อมอยู่กับสาร biotin)

เพิ่มจำนวนดีเอนเอในหลอดทดลองโดยใช้ AmpliTaq Gold™ Kit (Applied Biosystems, Japan) thermal cycle สำหรับเพิ่มจำนวนดีเอนเอประกอบด้วย denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที, annealing ที่ 45 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที, extention ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที จำนวน 30 รอบ $[(94:1\text{-}45:1\text{-}72:2)_{30}]$ และ extension ที่ 72 องศาเซลเซียส ต่ออีก 10 นาที และก่อนที่จะเริ่ม thermal cycle สำหรับ PCR amplification จะต้มสารละลาย PCR mixture ที่ 94 องศาเซลเซียส นาน 10 นาทีก่อน หลังจากสิ้นสุดกระบวนการ PCR amplification ทำการตรวจสอบ PCR product ด้วย 2% agarose gel electrophoresis โดย mtDNA ที่เพิ่มจำนวนได้มีขนาดประมาณ 680 คู่เบส (ดังรูปที่ 4)

รูปที่ 4 แสดงชิ้นดีเอนเอของยีน mitochondrial DNA ที่เพิ่มจำนวนได้ในหลอดทดลองซึ่งมีความยาวประมาณ 680 คู่เบส



ทำให้ดีเอนเอที่เพิ่มจำนวนได้บริสุทธิ์โดยใช้ Millipore Ultrafree[R]-DA (Millipore Corp., USA) ซึ่งเป็น filter สำหรับแยกชิ้นส่วนดีเอนเอที่ขนาด 100 – 10,000 bp ออกจากไพรเมอร์ที่ใช้และสารละลายเกลืออื่น ๆ โดย PCR product จะยังคงค้างอยู่บน filter ในขณะที่ไพรเมอร์และสารละลายเกลืออื่น ๆ จะตกลงมาในหลอดทดลองเมื่อนำไปปั่น

หลังสิ้นสุดการเพิ่มจำนวนดีเอนเอ และทำให้บริสุทธิ์ ดีเอนเอที่ได้ยังคงเป็นดีเอนเอเส้นคู่ (double strand DNA; dsDNA) อยู่ ซึ่งจะต้องนำมาทำให้เป็นดีเอนเอเส้นเดี่ยว (single strand DNA; ssDNA) ก่อน ตามวิธีของ Malaivijitnond and Takenaka (1998) และ Malaivijitnond *et al.* (2002) โดยใช้ avidin-coated magnetic bead (Danabeads[R] M-280 Streptavidin. Nihon Dynal K.K., Tokyo, Japan) ร่วมกับ biotinylated primer จากขั้นตอนการเพิ่มดีเอนเอในหลอดทดลอง dsDNA ที่เพิ่มจำนวนได้นั้น จะมีดีเอนเออยู่หนึ่งเส้นที่มีส่วนปลายเชื่อมอยู่กับสาร biotin เพราะไพรเมอร์ที่ใช้เป็น biotinylated primer (primer-474) ทำให้ dsDNA นั้น ๆ สามารถจับกับสาร avidin ที่ยึดติดอยู่กับ magnetic bead ได้ (avidin-coated magnetic bead) หลังจากนั้นทำการ alkalinization dsDNA ด้วย 0.1 N NaOH เพื่อให้ได้ ssDNA 2 เส้น ซึ่งเส้นหนึ่งจะยึดติดอยู่กับ avidin-coated magnetic bead และตกตะกอนอยู่ที่ก้นหลอด ในขณะที่อีกเส้นหนึ่งจะลอยอยู่เป็นอิสระในส่วนของ supernatant แยก ssDNA ทั้งสองส่วนออกจากกันและนำไปใช้ในการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลิโอไทด์ต่อไป

การวิเคราะห์หาลำดับนิวคลิโอไทด์ของ mtDNA D-loop จะทำในดีเอนเอทั้งสองเส้น เพื่อเป็นการตรวจสอบ ผลที่ได้ทำโดยใช้ cycle sequencing kit ที่ผลิตโดยบริษัท USB Corporation, USA ไพรเมอร์ที่ใช้เป็น FITC labeled primer (Japan Bioservice, Japan) ดังนี้

554F: F 5'-ATC ACC CTA TTT AAC CAG TCA C-3'

567F: F 5'-AAA CCC ATC TAG GCA TTT TCA G-3'

โดยเริ่มจากการต้มสารละลาย PCR mixture ที่ 95 องศาเซลเซียส นาน 5 นาทีก่อน โดย thermal cycle สำหรับ amplification ประกอบด้วย denaturation ที่ 95 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที, annealing ที่ 53 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที, extention ที่ 70 องศาเซลเซียส นาน 60 วินาที จำนวน 30 รอบ [95:5(94:30sec-53:30sec-70:60sec)$_{30}$] ภายหลังจากสิ้นสุดปฏิกริยาเติม stop solution 2 ไมโครลิตร เติม proteinase K (0.5 ug/ul) 1 ไมโครลิตร นำไปพักไว้ให้เกิดปฏิกริยาที่ 65 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที จากนั้นนำไปต้มที่ 95 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เพื่อให้ดีเอนเอเกิดการ denaturation และในขณะที่ต้มนั้นก่อนที่อุณหภูมิจะลดลงจาก 95 องศาเซลเซียส ในย้ายหลอดทดลองที่มีดีเอนเออยู่นั้นจุ่มลงในอ่างน้ำแข็งทันที (chilling) จากนั้น load ตัวอย่างดีเอนเอที่ได้ลงในเจลปริมาตร 2-2.5 ไมโครลิตร/หลุม ตรวจหาลำดับนิวคลิโอไทด์โดยใช้ Shimadzu fluorescent automatic sequencer DSO-1

3.2.9. <u>การเพิ่มปริมาณดีเอนเอโดยปฏิกริยาลูกโซ่ (DNA amplification) และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลิโอไทด์ (sequencing) ของ TSPY gene</u>

TSPY gene เป็นกลุ่มยีน (gene family) ที่วางตัวอยู่บนโครโมโซมเพศชาย (Y-chromosome) บริเวณ nonrecombining portion (Schempp *et al.*, 1995; Affara *et al.*, 1996) ในลิงมะแคคและลิงบาบูนจะวางตัวอยู่ในตำแหน่งใกล้ ๆ กับเซนโตรเมียร์ (proximal to the centromere) (Kim *et al.*, 1996; Glaser *et al.*, 1998) ข้อมูลที่ได้เกี่ยวกับการศึกษายีนบนโครโมโซมเพศชาย จนกระทั่ง ณ ปัจจุบันนี้พบว่ายีนบนโครโมโซมเพศชายที่ค้นพบและทำการศึกษากัน

อยู่มีเพียงแค่ 7 ยีน และมีเพียง 2 ยีนเท่านั้นที่พบบนโครโมโซมเพศชาย ไม่พบบนโครโมโซมเพศหญิง (X-chromosome) เลย (Zhang et al., 1992) คือ SRY gene และ TSPY gene (testis-specific protein, Y chromosome gene) โดย TSPY gene ประกอบด้วย 6 exons และ 5 introns **เหตุที่เลือกยีนตัวนี้มาใช้ในการศึกษาเกี่ยวกับประชากรลิงวอกวัดถ้ำผาหมากฮ่อเพิ่มเติมจากที่เสนอไว้ใน** project proposal ก็เพื่อที่จะใช้พิสูจน์เกี่ยวกับ paternal lineage ของลิงวอกฝูงนี้ว่าเป็น "ลิงวอก" จริงหรือไม่ และต้องการใช้พิสูจน์เกี่ยวกับทฤษฎี male fission หรือ male migration นั่นคือลิงเพศผู้จะเป็นตัวที่เคลื่อนออกจากฝูงเมื่อเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์เพื่อไปตั้งฝูงใหม่ ในขณะที่ลิงเพศเมียจะอยู่กับที่ไม่เคลื่อนออกจากฝูง เพราะ TSPY gene เป็นยีนอนุรักษ์ (conservation and species specific) ในกลุ่มลิงโลกเก่า (old world monkeys) ดังเช่นในลิงวอก *(Macaca mulatta)*, ลิงอ้ายเงี้ยะ *(Macaca assamensis)* และลิงหางยาว (*Macaca fascicularis*) TSPY gene มีขนาดเท่ากันคือ 10.6 Kb (Kim and Takenaka, 1996)

เพิ่มจำนวน TSPY gene โดยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากลำดับนิวคลิโอไทด์ของ TSPY gene ของคน (Zhang *et al.*, 1992) ดังนี้

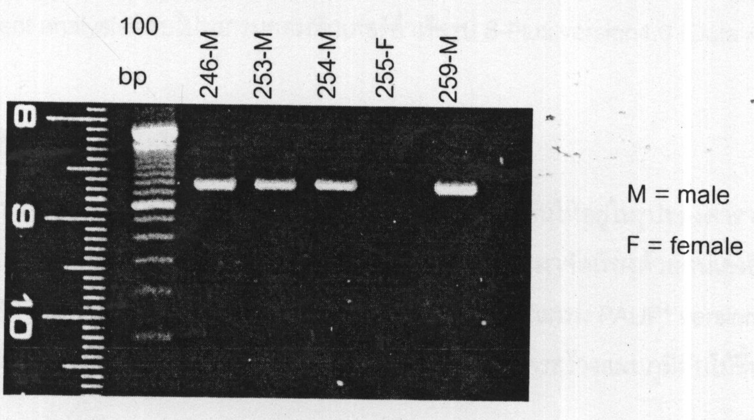
TSPY-A: 5'-AGC CAG GAA GGC CTT TTC TCG-3'

TSPY-B: 5'-CCA TGT AGC TCA GCA TGT CTT CAT-3' (Kim and Takenaka, 1996).

โดยตำแหน่ง 5' ของไพรเมอร์ TSPY-A และ 3' ของไพรเมอร์ TSPY-B ตรงกับลำดับนิวคลิโอไทด์ที่ 324 และ 1093 ของ TSPY gene ของคน ตามลำดับ

เพิ่มจำนวนดีเอนเอในหลอดทดลองโดยใช้ AmpliTaq Gold^{TM} Kit (Applied Biosystems, Japan) Thermal cycle สำหรับเพิ่มจำนวนประกอบด้วย denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที, annealing ที่ 60 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที, extention ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที จำนวน 30 รอบ $[(94{:}1\text{-}60{:}1\text{-}72{:}2)_{30}]$ และ extension ที่ 72 องศาเซลเซียส ต่ออีก 10 นาที โดยก่อนที่จะเริ่ม thermal cycle สำหรับ PCR amplification จะต้มสารละลาย PCR mixture ที่ 94 องศาเซลเซียส นาน 10 นาทีก่อน หลังจากสิ้นสุดกระบวนการ PCR amplification ทำการตรวจสอบและแยกชิ้นส่วนของ TSPY gene ด้วย 2% Nusieve^{R} GTG^{R} Agarose gel electrophoresis (Rockland, USA) ตัดเจลที่มีชิ้นส่วนของ TSPY gene อยู่ออกมา และแยกชิ้นส่วน TSPY gene จากเนื้อเจลโดยใช้ glass powder (Easytrap^{TM} Ver.2, Takara Bio Inc, Japan). จากนั้นนำ dsDNA ที่ได้ไปหาลำดับนิวคลิโอไทด์ต่อไป โดย TSPY gene ที่เพิ่มจำนวนได้มีขนาดประมาณ 750 คู่เบส (ดังรูปที่ 5)

รูปที่ 5 แสดงชิ้นดีเอนเอของ TSPY gene ที่เพิ่มจำนวนได้ในหลอดทดลองซึ่งมีความยาวประมาณ 750 คู่เบส



การวิเคราะห์หาลำดับนิวคลิโอไทด์ของ TSPY gene ทำโดยใช้ cycle sequencing kit ที่ผลิตโดยบริษัท USB Corporation, USA ไพรเมอร์ที่ใช้เป็น FITC labeled primer (Japan Bioservice, Japan) ที่ออกแบบโดยเฉพาะสำหรับการศึกษาลิงวอก วัดถ้ำผาหมากฮ่อในครั้งนี้ โดยออกแบบจากลำดับนิวคลิโอไทด์ของลิงมะแคคตามรายงานของ Tosi *et al.* (2000) ดังนี้

TSPY-SEQ: 5'-GGA GGG AGA GGA GAA AGG GA-3'

TSPY-SEQR: 5'-TCC CTT TCT CCT CTC CCT CC-3'. T

โดยเริ่มจากการต้มสารละลาย PCR mixture ที่ 95 องศาเซลเซียส นาน 5 นาทีก่อน โดย thermal cycle สำหรับ amplification ประกอบด้วย denaturation ที่ 95 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที, annealing ที่ 53 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที, extention ที่ 70 องศาเซลเซียส นาน 60 วินาที จำนวน 30 รอบ $[95:5(94:30sec\text{-}53:30sec\text{-}70:60sec)_{30}]$ ภายหลังจากสิ้นสุดปฏิกิริยาจะทำเช่นเดียวกันกับการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลิโอไทด์ mtDNA คือนำไปเติม stop solution 2 ไมโครลิตร เติม proteinase K (0.5 ug/ul) 1 ไมโครลิตร นำไปต้มที่ 65 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที จากนั้นนำไปต้มที่ 95 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เพื่อให้ดีเอนเอเกิดการ denaturation และในขณะที่ต้มนั้นก่อนที่อุณหภูมิจะลดลงจาก 95 องศาเซลเซียส ในย้ายหลอดทดลองที่มีดีเอนเออยู่นั้น จุ่มลงในอ่างน้ำแข็งทันที จากนั้น load ตัวอย่างดีเอนเอที่ได้ลงในเจลปริมาตร 2-2.5 ไมโครลิตร/หลุม ตรวจหาลำดับนิวคลิโอไทด์โดยใช้ Shimadzu fluorescent automatic sequencer DSO-1

3.3 การวิเคราะห์ผล

3.3.1. <u>วิเคราะห์ค่า blood hematocrit, fecal parasites, lipid levels และblood chemistry</u>

วิเคราะห์ค่าต่าง ๆ ข้างต้น ตามความแตกต่างของอายุ และเพศ โดยใช้สถิติ one-way ANOVA (LSD test) และหาความสัมพันธ์ของชุดข้อมูลดังกล่าวโดยใช้สถิติ correlation and regression analysis โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป SPSS version 10.0 โดยยอมรับค่าความแตกต่างทางสถิติที่ $p < 0.05$

3.3.2. <u>วิเคราะห์ค่า morphometrics</u>

วิเคราะห์ค่า morphometrics ของลิงวอก ณ วัดถ้ำผาหมากฮ่อ เทียบกับลิงวอก ที่มีต้นกำเนิดจากประเทศจีนและอินเดียที่เลี้ยงอยู่ที่ Primate Research Institute มหาวิทยาลัยเกียวโต ประเทศญี่ปุ่น และลิงหางยาวในประเทศไทยโดยใช้สถิติ Principle component analysis โดยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป S-Plus version4.0 (Data Analysis Products Division, 1997)

3.3.3. <u>วิเคราะห์ค่าลำดับนิวคลิโอไทด์</u>

ลำดับดีเอ็นเอที่ได้ทั้งหมดจะถูกนำมาวิเคราะห์จัดเรียง (align) เข้าด้วยกันให้อยู่ในรูปของตารางแม็ตทริกซ์ข้อมูล (data matrix) โดยอาศัยโปรแกรม ClustalX ในการจัดเรียงแบบอัตโนมัติ แล้วนำมาจัดเรียงด้วยตนเองอีกจนกว่าจะได้ตารางแม็ตทริกซ์ที่เหมาะสมที่สุด ตารางแม็ตทริกซ์ที่ได้นี้จะถูกนำมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม PAUP* version 4.10b เพื่อใช้ในการสร้างแผนภูมิต้นไม้ไฟโลเจเนติกส์ (phylogenetic tree) ในขั้นแรกจะอาศัยการสร้างแผนภูมิต้นไม้ชี้นำ (guide tree)

ด้วยวิธีการวิเคราะห์ระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) แบบ Neighbor-joining (NJ) แผนภูมิต้นไม้ NJ นี้จะถูกใช้เป็นตัวชี้นำว่าจะมีตัวอย่างลำดับดีเอ็นเอจากสิ่งมีชีวิตใดที่สามารถจะตัดออกจากการวิเคราะห์ในขั้นต่อไปได้บ้าง เมื่อสามารถลดขนาดของตารางแม็ตทริกซ์ข้อมูลลงไปแล้ว ตารางแม็ตทริกซ์ที่ได้จะถูกนำไปใช้ในการค้นหา (search) แผนภูมิต้นไม้ไฟโลเจเนติกส์ที่เป็นไปได้ทั้งหมดด้วยวิธีการวิเคราะห์ลักษณะ (character) แบบมัธยัสถ์สูงสุด (maximum parsimony) ต่อไป โดยเลือกใช้วิธีการค้นหาแบบ brach-and-bound search strategy แผนภูมิมัธยัสถ์สูงสุดที่ได้ทั้งหมดจะถูกนำมาสร้างแผนภูมิต้นไม้สอดคล้องแบบเข้มงวด (strict consensus tree) ค่าสนับสนุนทางสถิติ (statistic supporting value) อื่นๆ เช่น Bootstrap และ Jackknife (วิเคราะห์ 1000 ซ้ำ แบบ Fast-heuristic search) จะถูกคำนวณเพื่อใช้ประกอบในการพิจารณาถึงความมั่นใจของกิ่ง (branch) แต่ละกิ่งบนแผนภูมิต้นไม้

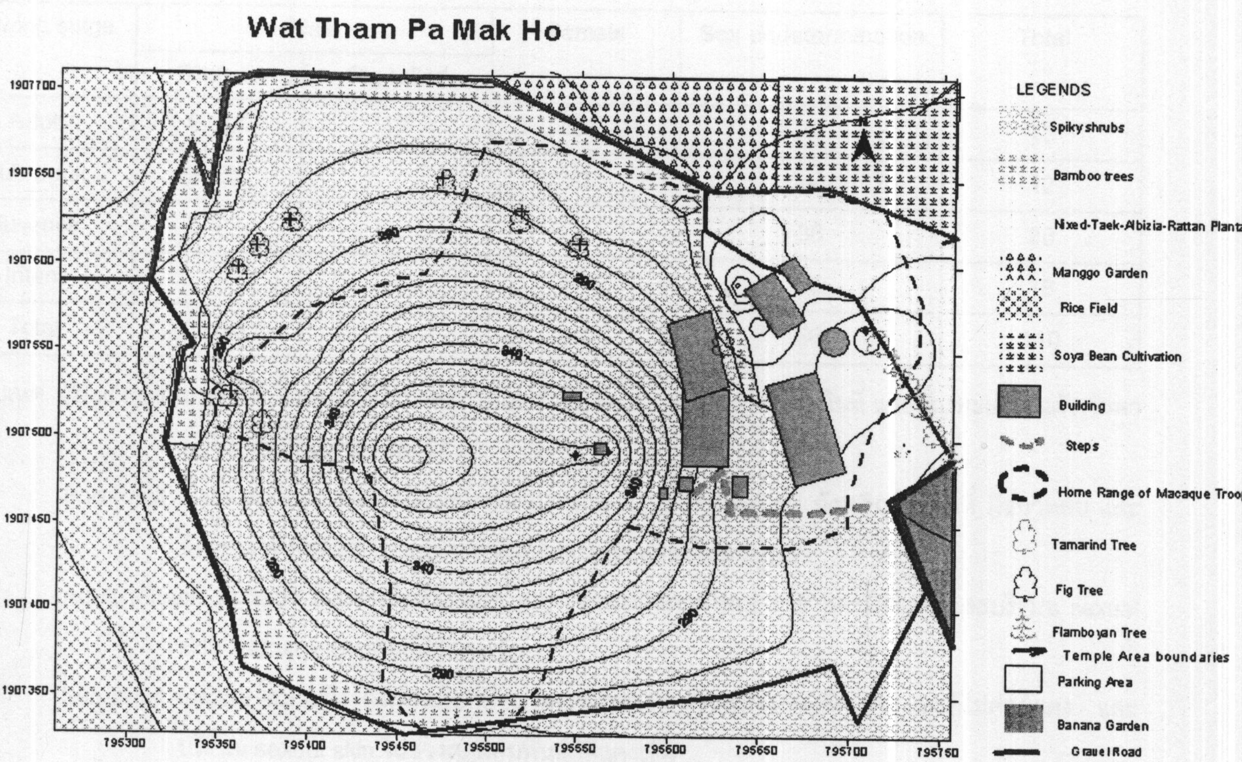
ในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลิโอไทด์ของ mtDNA ใช้ลำดับนิวคลิโอไทด์ของลิง Barbary macaque (*Macaca sylvanus*) (AJ309865, Arnason *et al.*, 2000) เป็น out-group reference และลิงวอก (*M. mulatta*) ที่มีแหล่งกำเนิดจากจีนและอินเดีย (เลี้ยงอยู่ที่ Primate Research Institute, Kyoto University, Japan) และลิงหางยาว (*Macaca fascicularis*) ในประเทศไทยเป็น in-group reference สำหรับในการวิเคราะห์ TSPY gene ใช้ลำดับนิวคลิโอไทด์ของลิงวอกที่มีแหล่งกำเนิดจากประเทศอินเดีย จีน และพม่า ลิงกัง (*M.nemestrina*) ลิงหางยาว และลิงเสน (*M. arctoides*) จากประเทศไทยเป็น references

4. ผลงานวิจัยที่ได้รับ

4.1. ข้อมูลพื้นฐานของพื้นที่ที่ศึกษา

ตำแหน่ง:	วัดถ้ำผาหมากฮ่อ อ.วังสะพุง จ.เลย GPS = 17° 14' 56"S 108° 39' 50"E
การเดินทาง:	ทางหลวงหมายเลข 2 จากกรุงเทพฯ ถึง อ.สีคิ้ว จ.นครราชสีมา ระยะทาง 240 กิโลเมตร และถนนสาย 201 จาก อ. สีคิ้ว ถึง วัดถ้ำผาหมากฮ่อ อ.วังสะพุง จ.เลย ระยะทาง 240 กิโลเมตร
ลักษณะพื้นที่:	วัดถ้ำผาหมากฮ่อ ตั้งอยู่บนเนินเขาซึ่งเป็นเขาหินปูนสูงประมาณ 400 เมตร บนเขามีต้นไม้ประเภทไม้เลื้อยที่มีหนามแหลมขึ้นอยู่เต็ม นอกจากนี้ยังพบต้นไทรที่ลิงใช้เป็นแหล่งอาหาร เนื่องจากจะออกลูกสลับกันทั้งปี ประมาณ 20 ต้น ด้านเชิงเขาเต็มไปด้วยป่าไผ่ พื้นที่โดยรอบเป็นพื้นที่เกษตรกรรมของชาวบ้าน โดยมีการปลูกข้าว, กล้วย, มะขามหวาน, ถั่วเหลือง, ข้าวโพด, ฝ้าย และสัก เป็นต้น (รูปที่ 6) จากการเดินสำรวจทั่วทั้งเนินเขา ไม่พบสัตว์ชนิดอื่นใดอีกเลยในพื้นที่ที่ลิงวอกฝูงนี้อาศัยอยู่ ทั้งชนิดที่จัดเป็นผู้ล่า (predator) และเหยื่อ (prey)

รูปที่ 6 แสดงลักษณะพื้นที่และอาณาเขตที่ลิงวอกอาศัยอยู่ ณ วัดถ้ำผาหมากฮ่อ อ.วังสะพุง จ.เลย



4.2. ลักษณะโครงสร้างประชากร พฤติกรรมการหาอาหาร การนอน การผสมพันธุ์ และการเกิดลิงลูกผสม

4.2.1. <u>จำนวนลิงที่พบ</u>

จากการสอบถามท่านเจ้าอาวาสวัด (พระคำแปลง ปุณณิช) ในเดือนกุมภาพันธุ์ 2546 พบว่ามีลิงวอกจำนวนทั้งหมด 142 ตัว ซึ่งมีจำนวนเพิ่มขึ้นตามลำดับในแต่ละปี โดยท่านเจ้าอาวาสได้ติดตามนับจำนวนลิงทุกปี (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 แสดงจำนวนลิงที่ทำการศึกษา ณ วัดถ้ำผาหมากฮ่อ จ. เลย ตั้งแต่ พ.ศ. 2541-2546

ปี พ.ศ.	จำนวน (ตัว)
2541	103
2544	115
2546	142

แต่จากที่ทำการนับโดยคณะนักวิจัยในเดือน มีนาคม 2546 พบว่าลิงมีทั้งหมด 110 ตัว ซึ่งแจกแจงตามเพศและระยะการเจริญได้ ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงจำนวนลิงจากการสำรวจ ณ วัดถ้ำผาหมากฮ่อ จ. เลย ในช่วงเดือน มีนาคม 2546 โดยจำแนกตามเพศและระยะการเจริญ

Growing stage	Male		Female	Sex undetermination	Total
	Rhesus	Pig-tailed			
Adult	6 (3)*	1**	35	-	42
Sub-adult	9 (6)*	-	3	-	12
Juvenile	-	-	-	38	38
Infant	-	-	-	18	18
Total	15 (9)*	1	38	56	110

หมายเหตุ: Adult male หมายถึง ลิงเพศผู้ที่มีขนาดตัวใหญ่ มีเขี้ยว (canine) ใหญ่เจริญเต็มที่ และอัณฑะเคลื่อนตัวเข้ามาอยู่ในถุงหุ้มอัณฑะหมดแล้ว

Sub-adult male หมายถึง ลิงเพศผู้ที่มีขนาดตัวปานกลาง เขี้ยว (canine) ยังเจริญไม่เต็มที่ มีขนาดสั้น และอัณฑะเคลื่อนตัวเข้ามาอยู่ในถุงหุ้มอัณฑะแล้ว แต่ยังไม่สมบูรณ์

Adult female หมายถึง ลิงเพศเมียที่มีขนาดใหญ่ หัวนมมีขนาดใหญ่ ยาว และมีสีแดง และบริเวณ sexual skin ในช่วงฤดูผสมพันธุ์มีสีแดงเข้ม

Sub-adult female หมายถึง ลิงเพศเมียที่มีขนาดปานกลาง หัวนมมีขนาดเล็ก สั้น และสีไม่ค่อยแดง และบริเวณ sexual skin ในช่วงฤดูผสมพันธุ์มีสีแดงเข้ม

Juvenile หมายถึง ถ้าเป็นลิงเพศผู้จะมีขนาดตัวเล็ก อัณฑะยังไม่เคลื่อนตัวลงมาอยู่ในถุงหุ้มอัณฑะ และมักอยู่รวมกันเป็นฝูงกับลิงตัวอื่น ๆ แต่ถ้าเป็นลิงเพศเมียจะเป็นลิงที่มีขนาดตัวเล็ก และมักอยู่รวมกันเป็นฝูงกับลิงตัวอื่น ๆ

Infant หมายถึง ลูกลิงที่ยังเกาะอกแม่ลิงอยู่ (อายุ < 1 ปี) มีขนาดเล็ก ผิวหนังที่บริเวณใบหน้ามีลักษณะเป็นรอยย่นและมีขนสีดำขึ้นรอบ ๆ และในขณะที่ลูกลิงเล่นอยู่มักจะมีแม่ลิงคอยดูแลอยู่ใกล้ ๆ

* จำนวนลิงวอกเพศผู้ที่อยู่ใน male group หรือ Robert group

** ลิงกัง (pig-tailed macaque; *Macaca nemestrina leonina*) เข้ามาอยู่ในฝูงนี้ได้ประมาณ 3 ปี และขณะนี้เป็นจ่าฝูงของฝูงลิงกังทั้งหมด (Malaivijitnond and Varavudhi, 2002)

4.2.2. <u>ลักษณะโครงสร้างประชากร</u>

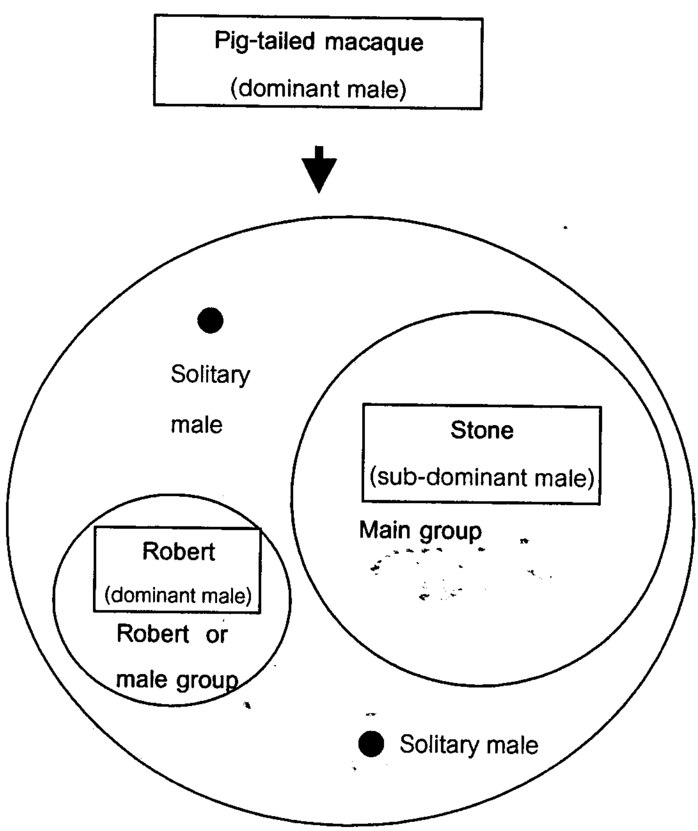
ขณะที่ดำเนินการศึกษาวิจัยพบว่าลิงวอกมีอยู่เพียงฝูงเดียว โดยมีลิงกังเป็นจ่าฝูง (dominant male or alpha-male) ของฝูงลิงวอกทั้งหมด ลักษณะโครงสร้างประชากรของฝูง ประกอบด้วย 1 ฝูงใหญ่ที่มีแนวโน้มแบ่งเป็น 2 กลุ่มย่อยแต่ไม่ชัดเจน (รูปที่ 7) ดังนี้

1. กลุ่มหลักให้ชื่อว่า "Main group" มีลิงวอกเพศผู้ให้ชื่อว่า "Stone" เป็นรองจ่าฝูง (sub-dominant male or beta-male) และมีลูกฝูงเป็นลิงวอกที่เหลือทั้งหมดประมาณ 98 ตัว

2. กลุ่มลิงเพศผู้ (male group) ให้ชื่อว่า "Robert group" ตามชื่อของจ่าฝูงย่อย ประกอบด้วยลิงเพศผู้ทั้งหมดจำนวน 9 ตัว อยู่ในระยะ adult 3 ตัว และ sub-adult 6 ตัว

นอกจากนี้ยังมีลิงวอกเพศผู้ที่ไม่สามารถเข้าฝูงได้อีก 2 ตัว ซึ่งจะแยกตัวออกมาจากลิงทั้งสองกลุ่ม โดยตัวหนึ่งจะพบอยู่ในบริเวณป่าสัก ส่วนอีกตัวหนึ่งมักพบอยู่บนศาลาวัดด้านบน ซึ่งการแยกตัวออกจากฝูง ของลิงวอกเพศผู้ดังกล่าวจะพบได้ในสังคมของลิงวอกทั่ว ๆ ไป โดยลูกลิงเพศผู้เมื่อเข้าสู่ระยะวัยรุ่นมักจะแยกตัวออกจากฝูงเดิมไปตั้งฝูงใหม่ (male migration effect of fission) หรือเข้าร่วมกับฝูงใหม่เพื่อปรับสถานะทางสังคม (social rank) ให้สูงขึ้นกว่าเดิม และเพื่อป้องกันการผสมกันเองระหว่างพี่น้องและเครือญาติ (Cheverud et al., 1978) ถ้าหากลิงวอกเพศผู้ดังกล่าวไม่สามารถเข้าไปรวมกับฝูงใหม่หรือตั้งฝูงใหม่เองไม่ได้ ก็จะมีการรวมกันเป็นฝูงใหม่ที่ประกอบด้วยลิงเพศผู้เท่านั้น (Seinfeld, 2001) ดังเช่นที่พบในลิงวอก วัดถ้ำผาหมากฮ่อฝูงนี้ แต่ที่ยังพบลิงสองฝูงย่อยนี้อาศัยอยู่ร่วมกันและไม่สามารถแบ่งพื้นที่อยู่อาศัยและแหล่งอาหารออกจากกันได้อย่างชัดเจน เนื่องจากข้อจำกัดที่ว่าพื้นที่ที่ลิงอาศัยอยู่นี้เป็นเนินเขาที่แยกตัวออกมาจากพื้นที่ป่าหรือพื้นที่ทางธรรมชาติอื่น ๆ และถูกล้อมรอบด้วยพื้นที่เกษตรกรรม ทำให้ลิงไม่สามารถเคลื่อนย้ายหรือแยกตัวออกไปได้ อีกทั้งลิงยังได้รับอาหารจากนักท่องเที่ยวและพระเป็นหลักอีกด้วย

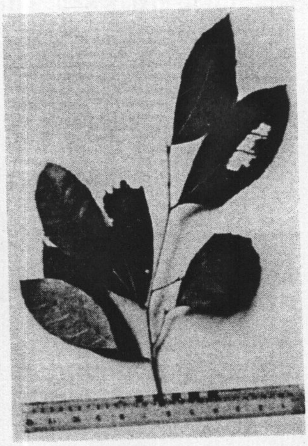
รูปที่ 7 แสดงลักษณะโครงสร้างประชากรของฝูงลิงวอกที่ถูกรุกล้ำโดยลิงกัง



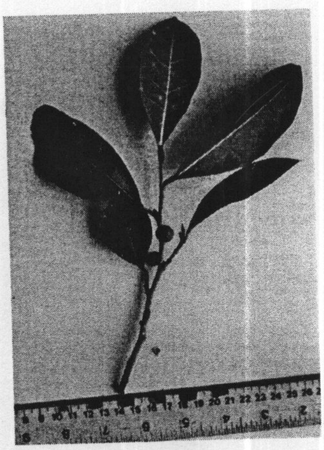
4.2.3. พฤติกรรมการหาอาหาร

ลิงออกหากินบริเวณหลังวัดในตอนเช้า ช่วงเวลาประมาณ 0600-0800 น. อาหารที่ได้จากธรรมชาติเป็นยอดอ่อนของใบไม้และลูกไทร ซึ่งมีต้นไทรอยู่ประมาณ 20 ต้น และในช่วงเวลาที่ทำการศึกษาพบว่ามีต้นไทรที่ลิงใช้เป็นอาหารอยู่ 2 ชนิด (ดังรูปที่ 8) หลังจากนั้นลิงจะย้ายฝูงมาทางด้านหน้าวัดเพื่อรอรับอาหารจากนักท่องเที่ยวและพระ ซึ่งอาหารที่ลิงมักจะได้รับคือ กล้วย, มะขามหวาน, ถั่ว, แตงโมและข้าวเหนียว เป็นต้น ลิงจะอยู่บริเวณหน้าวัดจนถึงตอนเย็น ในช่วงเวลาประมาณ 1800 น. พบว่าลิงบางตัวจะมีพฤติกรรมการกินดิน (soil-eating or geophagy behavior) หลังจากที่ไม่มีคนให้อาหารแล้ว ซึ่งลักษณะดังกล่าวสามารถพบได้ในลิงมะแคคชนิดอื่น ๆ เช่น ลิงญี่ปุ่น (Japanese macaque; *Macaca fuscata*) ซึ่งคาดว่าพฤติกรรมการกินดินเป็นการแสดงออกถึงพฤติกรรมการหากินร่วมกัน (co-feeding custom) และเพื่อให้ได้รับแร่ธาตุบางอย่างจากดินเพิ่มเติม เช่น แคลเซียม, แมกนีเซียม และโซเดียมเป็นต้น (Miho, 1987) ลิงจะพักผ่อน/เล่นกันอยู่ทั่วไป ในบริเวณหน้าวัด

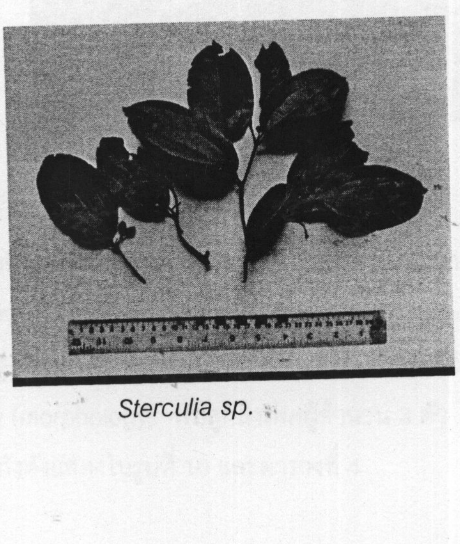
รูปที่ 8 แสดงลูกไทรและใบไม้ที่ลิงวอกกินเป็นอาหาร



Fiscus sp. 1



Fiscus sp. 2



Sterculia sp.

4.2.4. พฤติกรรมการนอน

ลิงจะนอนบริเวณยอดไม้ เช่นต้นไทรและไผ่ กระจายทั่วไปทั้งในบริเวณด้านหน้าและด้านข้างวัด

4.2.5. พฤติกรรมการผสมพันธุ์

จากการสอบถามชาวบ้านบริเวณใกล้เคียงและพระในวัดถ้ำผาหมากฮ่อ พบว่าลิงวอกฝูงนี้มีการผสมพันธุ์กันในช่วงเดือนธันวาคม – มีนาคม โดยพบว่าลิงเพศเมียวัยเจริญพันธุ์มี sexual skin (ผิวหนังบริเวณรอบ ๆ อวัยวะสืบพันธุ์ และ ischial callosity) สีแดงเข้ม และจะเห็นบาดแผลที่เป็นร่องรอยจากการกัดกันของลิงในลิงหลายตัว ซึ่งในช่วงฤดูกาลการผสมพันธุ์ลิงจะมีนิสัยก้าวร้าว (aggressive behavior) หลังจากนั้นลิงจะออกลูกประมาณเดือนเมษายน – กรกฎาคม (ระยะตั้งท้องนาน ประมาณ 165 วัน)

ในช่วงเดือนมีนาคมที่เข้ามาทำการศึกษาพบการเข้าผสมพันธุ์กันของลิงวอกเพศผู้และลิงวอกเพศเมียบ้างบางครั้ง และพบการเข้าผสมของลิงกังเพศผู้กับลิงวอกเพศเมีย (ซึ่งมักจะเป็นตัวเดิมที่มีลักษณะปลายหางงอ ให้ชื่อว่า "bending tail") จำนวน 2 วันในหนึ่งสัปดาห์ โดยแต่ละครั้งจะเข้าผสมนานประมาณ 30 วินาที ติดต่อกันประมาณ 4 ครั้ง (รูปที่ 9) ในช่วงเดือนมีนาคมที่เข้ามาทำการวางกรงดัก พบว่าลิงเพศเมียในระยะ adult และ sub-adult นั้น sexual skin ยังมีสีแดงอยู่

รูปที่ 9 แสดงการเข้าผสมพันธุ์ของลิงกังเพศผู้กับลิงวอกเพศเมีย

4.2.6. การเกิดลิงลูกผสมและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของลิงลูกผสม

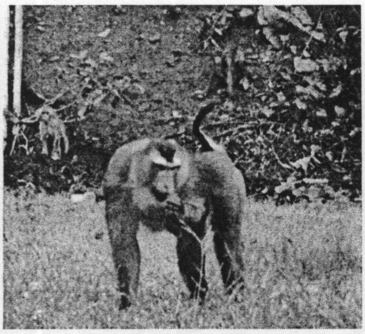
จากที่ว่าลิงกังที่ชาวบ้านจากแหล่งอื่นนำมาปล่อยเข้าฝูงลิงวอก มีขนาดใหญ่มาก (น้ำหนักตัว 13.10 กิโลกรัม) เมื่อเทียบกับลิงวอกเพศผู้โตเต็มวัย (ลิงวอกเพศผู้ที่จับได้ที่มีตำแหน่งเป็น subdominant male มีน้ำหนักเพียง 6.45 กิโลกรัม) ทำให้ลิงกังสามารถดำรงตำแหน่งเป็นจ่าฝูงของลิงวอกฝูงนี้ได้และสามารถเข้าผสมพันธุ์กับลิงวอกเพศเมียได้จำนวนมาก จากการสังเกตลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology) พบลูกลิงเพศผู้จำนวน 3 ตัว ที่มีลักษณะของขนบนหัว (crown) ขนบริเวณแก้ม หลังและหางคล้ายกับลิงกังดังแสดงในรูปที่ 10 และตารางที่ 4

จากลักษณะทางสัณฐานวิทยาของลิงกัง คือมีขนสีน้ำตาลเทา แสกกลาง โดยขนส่วน hindquarter จะจางกว่าด้านบน ขนที่หัว (crown) มีสีน้ำตาลดำ หางเรียวโค้งไปทางด้านหน้า ความยาวหางสัมพัทธ์ (tail-length/crown rump length) เท่ากับ 36.6% (รูปที่11 และ12) ลิงกังดังกล่าวจึงจัดเป็นชนิดย่อย *Macaca nemestrina leonina* (Fooden, 1975) ซึ่งเท่าที่ได้ค้นคว้าเอกสารทางวิชาการต่าง ๆ พบว่ายังไม่มีรายงานเกี่ยวกับลูกผสมของลิงที่เกิดจากลิงวอกเพศเมียและลิงกังเพศผู้เลย เท่าที่มีรายงานพบแต่ลูกผสมที่เกิดจากลิงวอกเพศผู้กับลิงกังเพศเมีย (Bernstein and Gordon, 1980) เท่านั้น

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบลักษณะภายนอกระหว่างลิงวอก, ลิงกัง และลิงลูกผสมระหว่างลิงวอกและลิงกังที่จับได้

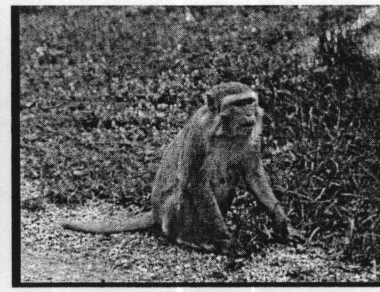
ลักษณะที่พบ	ลิงวอก	ลิงกัง	ลูกผสมระหว่างลิงวอกและลิงกัง
ขนบนหัว	สั้นและเรียบลู่ไปทางด้านหลัง	สีน้ำตาลดำหรือดำ (สีเข้มกว่าสีขนบริเวณลำตัว)มีลักษณะแสกกลาง	สีน้ำตาลดำหรือดำ (สีเข้มกว่าสีขนบริเวณลำตัว)มีลักษณะแสกกลาง
ขนบริเวณแก้ม	วนเป็นก้นหอย	ไม่วนเป็นก้นหอย	มีทั้งสองลักษณะ -ลูกลิงหมายเลข 014(หรือ 254) มีขนวนเป็นก้นหอย -ลูกลิงหมายเลข 019(หรือ 259) ไม่มีขนวนเป็นก้นหอย
ขนบริเวณหลัง	สีเหลืองน้ำตาลหรือสีน้ำตาลอ่อน	สีน้ำตาลดำ	สีน้ำตาลดำ
ขนบริเวณ hindquarter	สีเหลืองส้มหรือส้มแดง ทำให้ขนทั้งตัวแยกเป็น 2 สี ที่เรียกว่า "bipartite pattern"	สีน้ำตาลเทาคล้ายกับบริเวณอื่น ๆ	มีทั้ง 2 ลักษณะ -ลูกลิงหมายเลข 014(หรือ 254) แสดง bipartite pattern -ลูกลิงหมายเลข 019 (หรือ 259) ไม่แสดง bipartite pattern เช่นเดียวกับลิงกัง
หาง	หางยาวประมาณ 50-60% มีขนยาวเป็นพวง	หางยาวประมาณ 30% มีขนสั้นสีน้ำตาลดำ ไม่เป็นพวง ลักษณะคล้ายหางหมู	หางยาวประมาณ 50-60% แต่ขนสั้นไม่เป็นพวง ลักษณะค่อนไปทางลิงกัง

รูปที่ 10 แสดงลักษณะภายนอกของลิงลูกผสมที่เกิดจากลิงกังเพศผู้และลิงวอกเพศเมีย

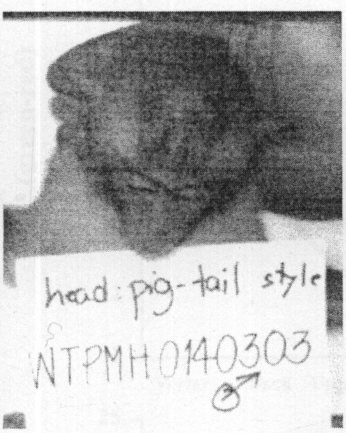


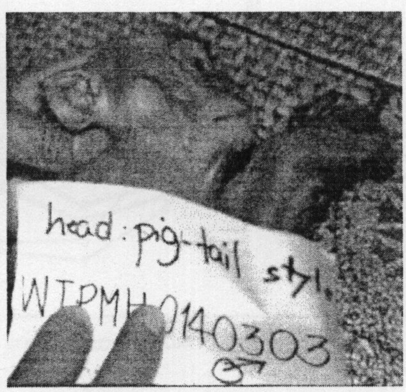
ลิงกัง

ลิงลูกผสม



ลิงวอก

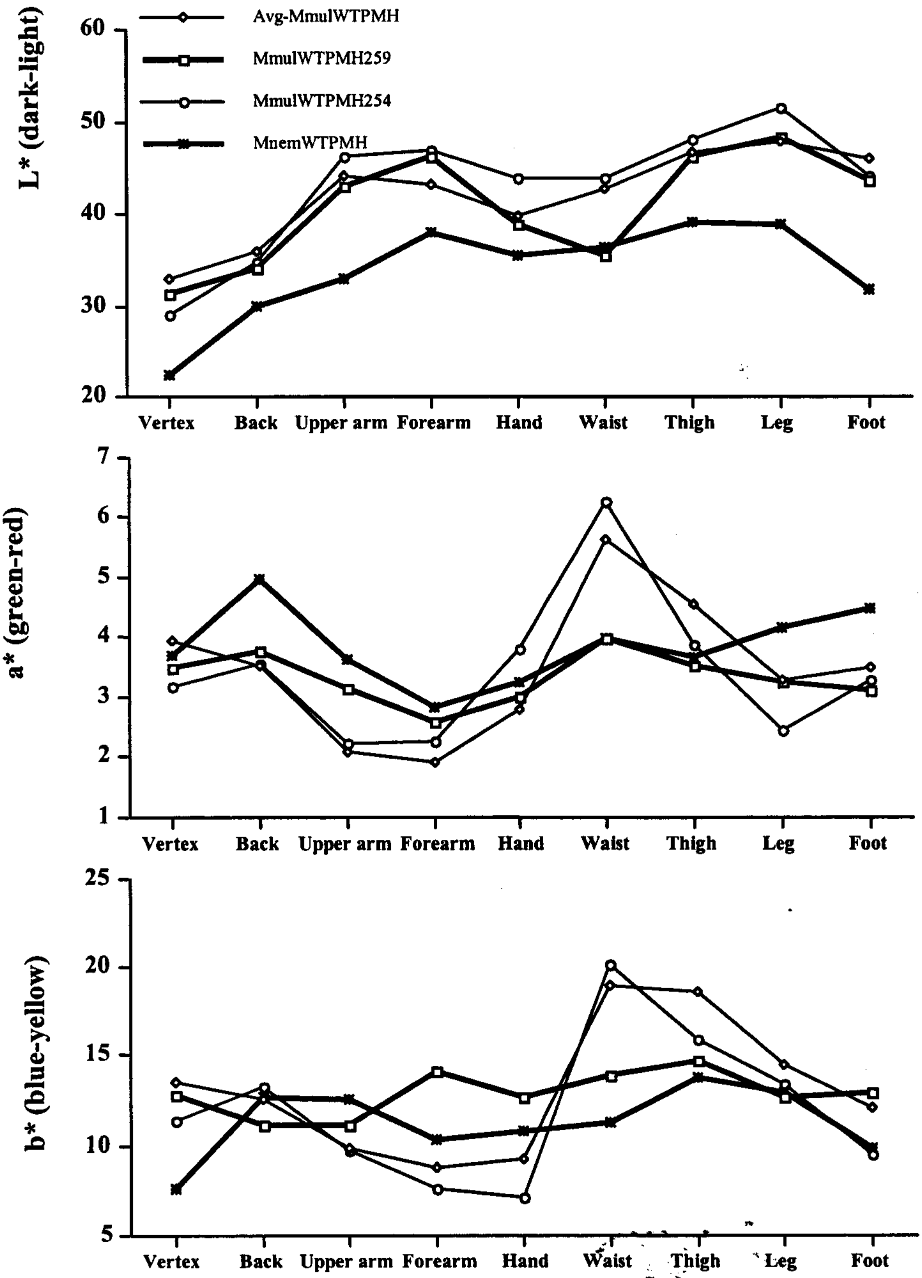




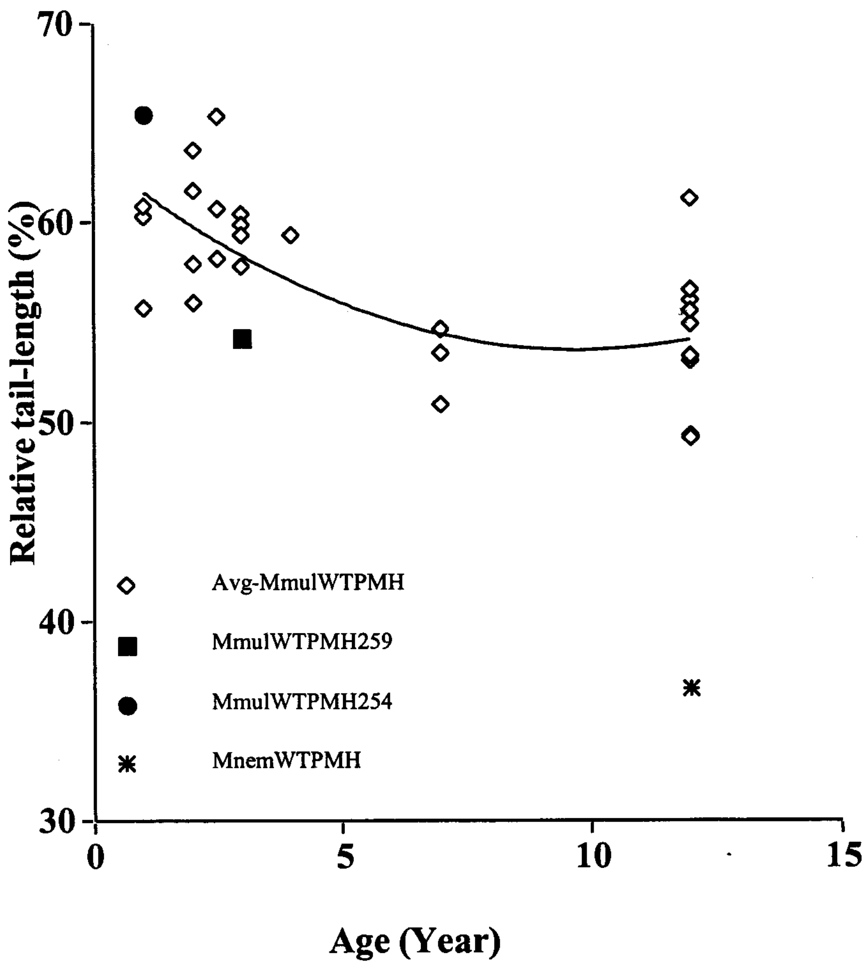
ลิงลูกผสมหมายเลข 014

ลิงลูกผสมหมายเลข 019

รูปที่ 11 แสดงค่าสีขน (pelage color) ทั้ง 3 ค่า คือ L*, a* และ b* ที่วัดจากบริเวณต่าง ๆ ของลิง (Avg Mmul = ค่าเฉลี่ยของลิงวอกทั้งหมด, Mmul = ลิงวอก, Mnem = ลิงกัง)



รูปที่ 12 แสดงความยาวหางสัมพัทธ์ (relative tail-length = tail-length/crown-rump length) ของลิงวอก (Mmul) ลิงกัง (Mnem) และลิงลูกผสม (no. 259 และ 254)



4.2.7. <u>ข้อมูลเพิ่มเติมอื่น ๆ</u>

จากที่ได้มีการซักถามชาวบ้านในบริเวณวัดที่ทำหน้าที่เลี้ยงลิงทุกวันและพระที่อยู่ในวัดถ้ำผาหมากฮ่อ พบว่าลิงกังได้เข้ามาอยู่ในฝูงลิงวอกนี้เนื่องจากมีชาวบ้าน ณ บริเวณอื่น นำมาปล่อยโดยที่ไม่ทราบว่าเป็นลิงคนละชนิดกัน เมื่อประมาณ 3 ปีที่แล้ว โดยลิงกังที่นำมาปล่อยนี้ชาวบ้านเคยเลี้ยงไว้เมื่อตอนยังเล็ก ๆ อยู่ แต่เมื่อลิงโตขึ้นเริ่มดุ และกัดคนเลี้ยง ชาวบ้านจึงได้นำมาปล่อย ซึ่งการนำลิงมะแคค (ลิงสกุล *Macaca*) ชนิดหนึ่งมาปล่อยเข้าฝูงลิงมะแคคอีกชนิดหนึ่งเป็นปัญหาใหญ่ที่กำลังเผชิญอยู่ในลิงสกุล Macaca ทั้ง 5 ชนิดของประเทศไทย เนื่องจากมีรายงานว่าลิงลูกผสม (hybrid) ที่ได้จากการผสมกันของพ่อและแม่ที่เป็นคนละชนิดกันไม่เป็นหมัน (Bernstein and Gordon, 1980)

4.3. จำนวนลิงที่จับได้จากการวางกรงดัก

จำนวนลิงที่จับได้จากการวางกรงดักและเป่าลูกดอกยาสลบมีจำนวนทั้งหมด 33 ตัว เป็นลิงกังเพศผู้ 1 ตัว ลิงวอกเพศผู้จำนวน 10 ตัว และลิงวอกเพศเมียจำนวน 22 ตัว ได้มีการศึกษาต่าง ๆ และได้ผลดังนี้

4.3.1. ประมาณการอายุลิงที่จับได้จากการวางกรงดัก

ประมาณการอายุลิงที่จับได้จำนวน 33 ตัว จากการวางกรงดักในเดือนมีนาคม 2546 จาก dental formula (Iwamoto *et al.*, 1984; Iwamoto *et al.*, 1987) ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แสดงอายุ, เพศ และน้ำหนักตัวของลิงวอกและลิงกังที่จับได้ในการวางกรงดักในเดือนมีนาคม 2546

No.	species-no.	Sex	Age (yr)	Body Weight (kg)
1	Mm 001	F	Adult	6.20
2	Mm 002	M	2.5	2.75
3	Mm 003	F	2	2.00
4	Mm 004	M	3	3.20
5	Mm 005	F	2	1.85
6	Mnem	M	Adult	13.1
7	Mm 007	M	2	2.10
8	Mm 008	M	2.5	2.90
9	Mm 009	F	Adult	6.55
10	Mm 010	M	1	1.25
11	Mm 011	F	3	4.55
12	Mm 012	F	Adult	6.90
13	Mm 013	M	2	2.00
14	**Mm 014***	M	1	1.50
15	Mm 015	F	7	5.35
16	Mm 016	F	1	1.10
17	Mm 017	F	7	4.45
18	Mm 018	F	2.5	2.50
19	**Mm 019***	M	3	3.20
20	Mm 020	F	Adult	6.30
21	Mm 021	F	7	5.50
22	Mm 022	F	Adult	6.45
23	Mm 023	F	7	6.10
24	Mm 024	F	3	2.70
25	Mm 025	F	1	1.35
26	Mm 026	M	4	3.10
27	Mm 027	M	Adult	6.45
28	Mm 028	F	2.5	2.85
29	Mm 029	F	3	2.30
30	Mm 030	F	Adult	6.65
31	Mm 031	F	Adult	9.10
32	Mm 032	F	7	6.00
33	Mm 033	F	Adult	7.50

หมายเหตุ Mm = ลิงวอก (*Macaca mulatta*)

Mnem = ลิงกัง (*Macaca nemestrina*)

F, M = ลิงเพศเมีย (female) และเพศผู้ (male) ตามลำดับ

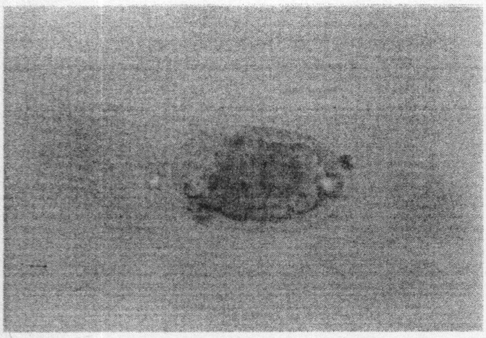
Adult = ลิงที่มีอายุมากกว่า 7 ปีขึ้นไป

*ลิงหมายเลข Mm014 และ Mm019 เป็นลูกลิงที่มีสัณฐานวิทยาผสมระหว่างลิงวอกและลิงกัง จากอายุที่ประมาณได้ 1 และ 3 ปีนี้ จัดอยู่ในระยะ juvenile ซึ่งลิงชนิดนี้จะเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์ที่สามารถสืบพันธุ์ให้ลูกหลานได้ที่อายุประมาณ 5 ปี (Burton and Eaton, 1995) **หากผลการตรวจทางดีเอนเอพบว่าลูกลิงทั้ง 2 ตัวเป็นลิงลูกผสมจริง จะต้องจับมาทำหมันต่อไป**

4.3.2 <u>ผลการวิเคราะห์หา parasites ในอุจจาระ</u>

จากตัวอย่างอุจจาระที่เก็บได้ทั้งหมด 27 ตัวอย่าง พบตรวจพบพยาธิในลิงทั้งหมด 18 ตัว หรือ 66.67% ของลิงทั้งหมด และพบพยาธิเพียงชนิดเดียวคือ *Oesophagostomum sp* ดังรูปที่ 13 ซึ่งทำให้เกิดโรค Oesophagostomiasis (Nodular Intestinal Worm Infection) *Oesophagostomum sp* เป็นพยาธิที่พบในลำไส้ของไพรเมทหลายชนิดและบางครั้งพบในคน ส่วนใหญ่พบที่แอฟริกา และพบบ้างในอเมริกาใต้และเอเชีย เนื่องจากพยาธิชนิดนี้มักจะแทรกและฝังตัวที่ผนังลำไส้ทำให้เกิดเป็นก้อนนูน ดังนั้นจึงอาจทำให้เกิดอาการปวด เลือดออก และอาจทำให้เกิดการติดเชื้อซ้ำซ้อนและเป็นหนองในทางเดินอาหารได้ (Karr et al., 1980; Son, 2002)

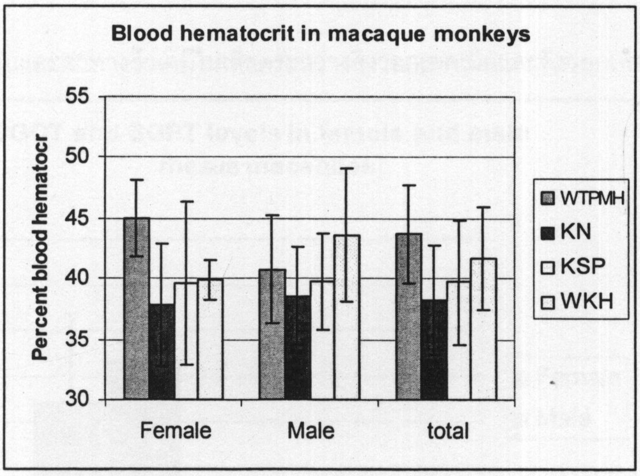
รูปที่ 13 แสดงพยาธิ *Oesophagostomum sp* ที่พบในลิงวอก ณ วัดถ้ำผาหมากฮ่อ จ.เลย ที่ทำการวางกรงดักในเดือนมีนาคม 2546



4.3.3 <u>ผลการวิเคราะห์ค่าฮีมาโตคริตในเลือด (blood haematocrit)</u>

เมื่อเปรียบเทียบค่าฮีมาโตคริตในเลือดลิงวอกกับลิงหางยาวจากแหล่งต่าง ๆ ในประเทศไทย 3 แห่ง (ดังรูปที่ 14) คือ ลิงหางยาวจากอุทยานหินเขางู จ.ราชบุรี จากวนอุทยานโกสัมพี จ.มหาสารคาม ($p<0.01$) และจากวัดคูหาภิมุข จ.ยะลา พบว่าค่าฮีมาโตคริตของลิงวอกเพศเมียมีค่าสูงกว่าลิงหางยาวเพศเมียทั้ง 3 แห่ง ในขณะที่ค่าฮีมาโตคริตของลิงวอกเพศผู้ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) กับลิงหางยาวเพศผู้จากทั้ง 3 แห่ง และเมื่อเปรียบเทียบโดยรวมพบว่าค่าฮีมาโตคริตในลิงวอกทั้งสองเพศมีค่าใกล้เคียงกับลิงหางยาวที่อาศัยอยู่บนเนินเขาคือลิงหางยาวจากวัดคูหาภิมุข จ.ยะลา ($p>0.05$) แต่มีค่าสูงกว่าลิงหางยาวที่ส่วนใหญ่อาศัยอยู่บนพื้นคือจากอุทยานหินเขางู จ.ราชบุรี และวนอุทยานโกสัมพี จ.มหาสารคามอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$) อาจเนื่องมาจากว่าลิงวอก วัดถ้ำผาหมากฮ่อมีการปรับตัวต่อแหล่งที่อยู่อาศัยบนเขา ที่มีปริมาณออกซิเจนต่ำ จึงมีการเพิ่มปริมาณเม็ดเลือดแดงขึ้น จึงทำให้ค่าฮีมาโตคริตสูง

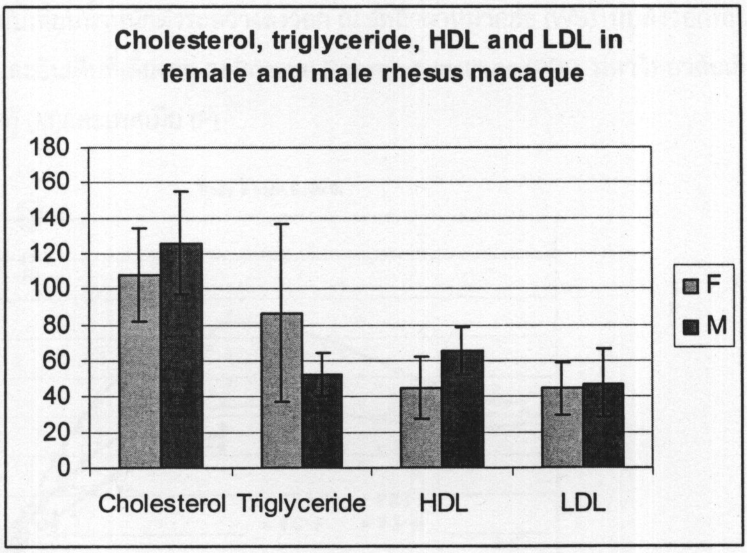
รูปที่ 14 แสดงค่าฮีมาโตคริตของลิงวอก ณ วัดถ้ำผาหมากฮ่อ (WTPMH) จ. เลย เปรียบเทียบกับลิงหางยาว ณ อุทยานหินเขางู (KNG) จ.ราชบุรี, วนอุทยานโกสัมพี (KSP) จ.มหาสารคาม และวัดคูหาภิมุข (WKH) จ.ยะลา



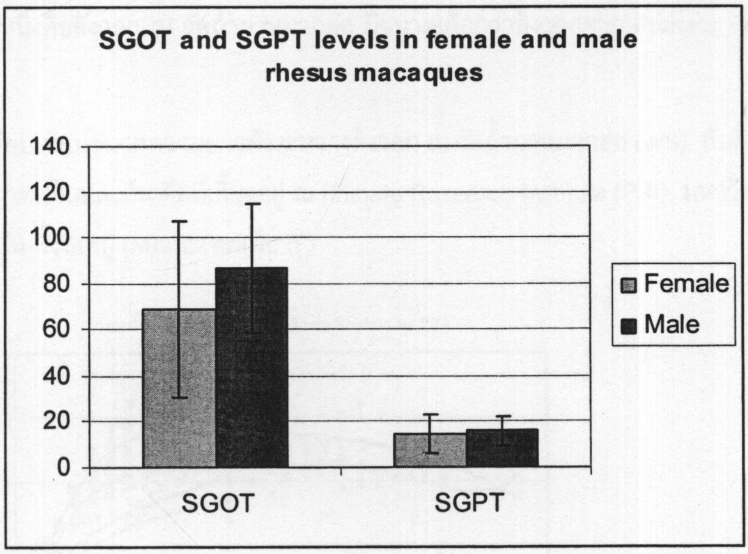
4.3.4. <u>ผลการวิเคราะห์ระดับไขมันและค่าทางชีวเคมีในเลือด</u>

เปรียบเทียบระดับไขมัน (triglyceride, HDL, LDL และคอเลสเตอรอล) และค่าทางชีวเคมีในเลือด (alkaline phosphatases, SGOT และ SGPT) ในลิงวอกเพศผู้และเพศเมียพบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังรูปที่ 15และ16 ซึ่งแสดงว่าลิงวอกเพศผู้และเพศเมียมีโอกาสได้รับอาหารทั้งจากธรรมชาติและจากพระ/นักท่องเที่ยวเท่า ๆ กัน

รูปที่ 15 เปรียบเทียบระดับไขมันและค่าทางชีวเคมีในเลือดระหว่างลิงวอกเพศเมีย (F) และลิงวอกเพศผู้ (M)



รูปที่ 16 เปรียบเทียบระดับไขมันและค่าทางชีวเคมีในเลือดระหว่างลิงวอกเพศเมียและลิงวอกเพศผู้

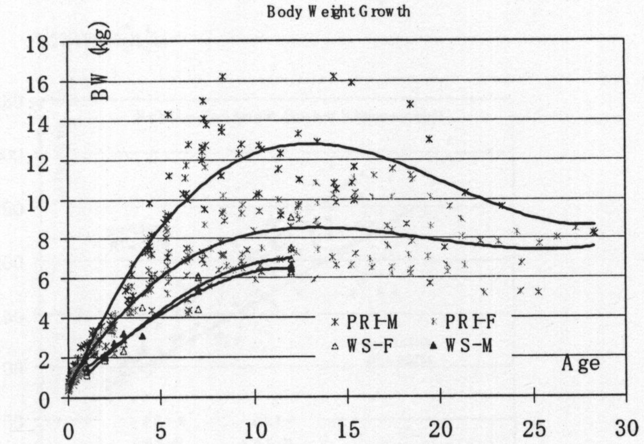


4.3.5. <u>ผลการวิเคราะห์ค่า morphometrics</u>

จากการวิเคราะห์เปรียบเทียบค่า morphometrics ระหว่างลิงวอก ณ วัดถ้ำผาหมากฮ่อ เทียบกับลิงวอกที่มีแหล่งกำเนิดจากประเทศจีนและอินเดียที่เลี้ยงอยู่ ณ Primate Research Institute, มหาวิทยาลัยเกียวโต ประเทศญี่ปุ่น พบว่า

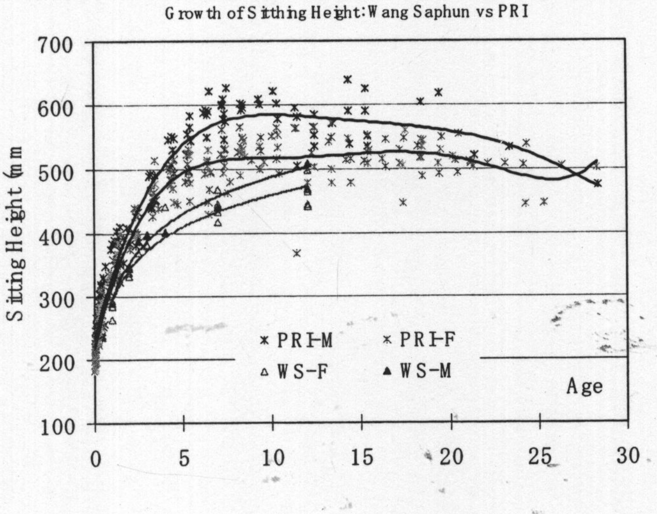
1.น้ำหนักตัวของลิงวอก ณ วัดถ้ำผาหมากฮ่อ ต่ำกว่าลิงวอกจาก Primate Research Institute (ดังรูปที่ 17)

รูปที่ 17 เปรียบเทียบน้ำหนักตัวระหว่างลิงวอก ณ วัดถ้ำผาหมากฮ่อ (WS) กับลิงวอกที่มีแหล่งกำเนิดจากประเทศจีนและอินเดียที่เลี้ยงอยู่ ณ Primate Research Institute (PRI), มหาวิทยาลัยเกียวโต ประเทศญี่ปุ่น ทั้งเพศผู้ (M)และเพศเมีย (F)



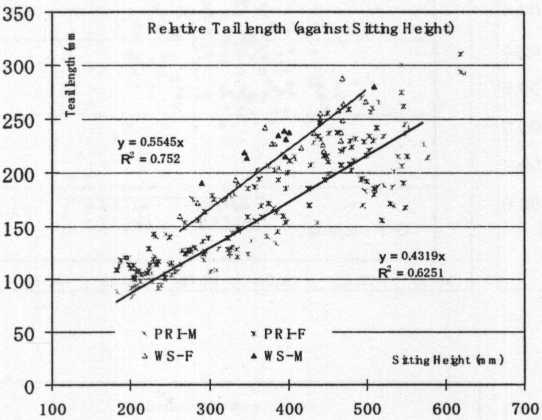
2.ขนาดความยาวตัว (sitting height) ของลิงวอก ณ วัดถ้ำผาหมากฮ่อ ต่ำกว่าลิงวอกจาก Primate Research Institute หรืออีกนัยหนึ่งคือลิงวอก ณ วัดถ้ำผาหมากฮ่อ มีขนาดเล็กกว่าลิงวอกจาก Primate Research Institute นั่นเอง (ดังรูปที่ 18)

รูปที่ 18 เปรียบเทียบขนาดความยาวตัวระหว่างลิงวอก ณ วัดถ้ำผาหมากฮ่อ (WS) กับลิงวอกที่มีแหล่งกำเนิดจากประเทศจีนและอินเดียที่เลี้ยงอยู่ ณ Primate Research Institute (PRI), มหาวิทยาลัยเกียวโต ประเทศญี่ปุ่น ทั้งเพศผู้ (M)และเพศเมีย (F)



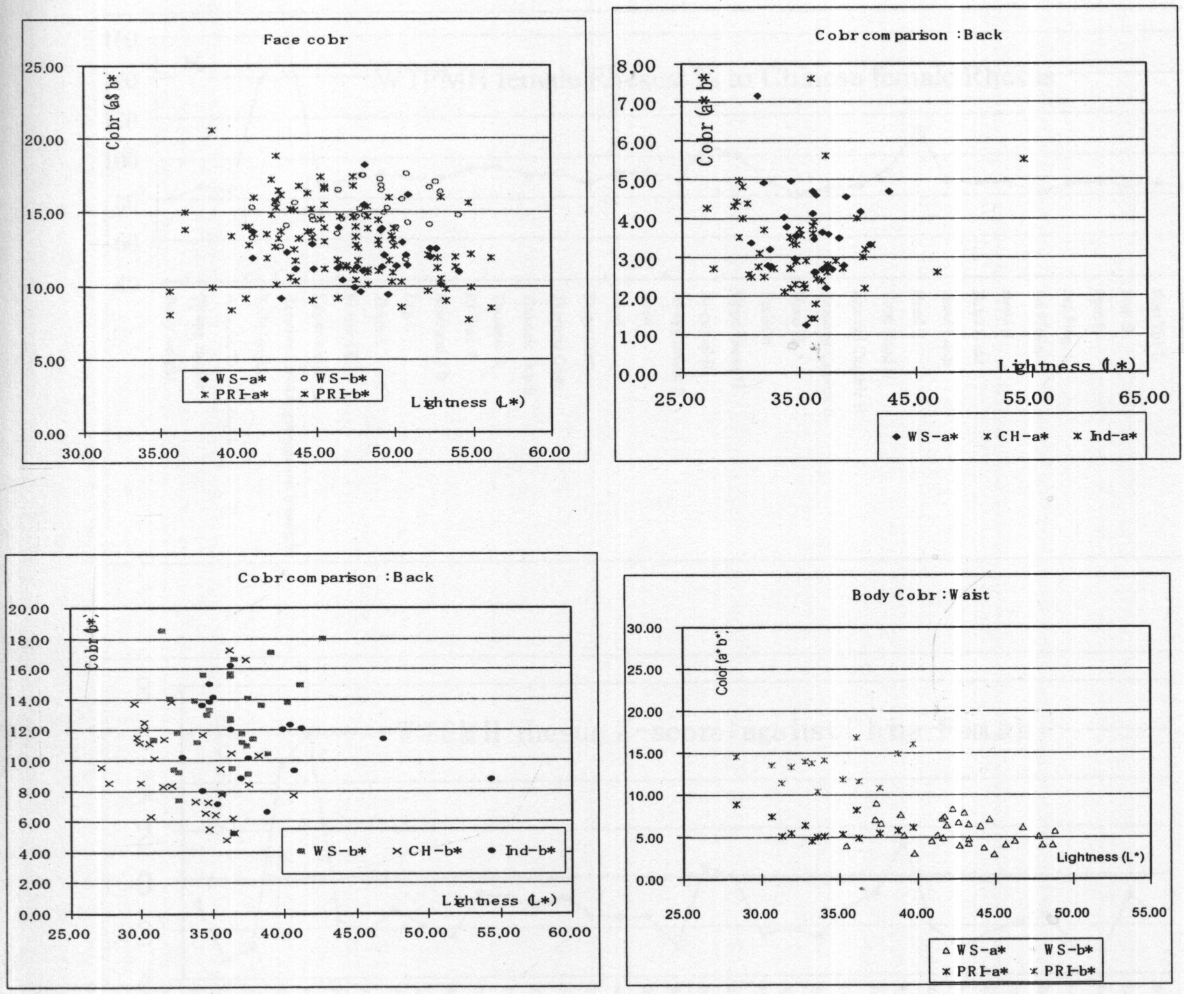
3.ความยาวหาง (tail length) เมื่อเปรียบเทียบความยาวหางโดยไม่ได้จำแนกตามเพศ เนื่องจากไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p>0.05$) ของความยาวหางระหว่างลิงทั้งสองเพศ พบว่าลิงวอก ณ วัดถ้ำผาหมากฮ่อ มีหางยาวกว่าลิงวอกจาก Primate Research Institute (รูปที่ 19)

รูปที่ 19. เปรียบเทียบขนาดความยาวหางระหว่างลิงวอก ณ วัดถ้ำผาหมากฮ่อ (WS) กับลิงวอกที่มีแหล่งกำเนิดจากประเทศจีนและอินเดียที่เลี้ยงอยู่ ณ Primate Research Institute (PRI), มหาวิทยาลัยเกียวโต ประเทศญี่ปุ่น



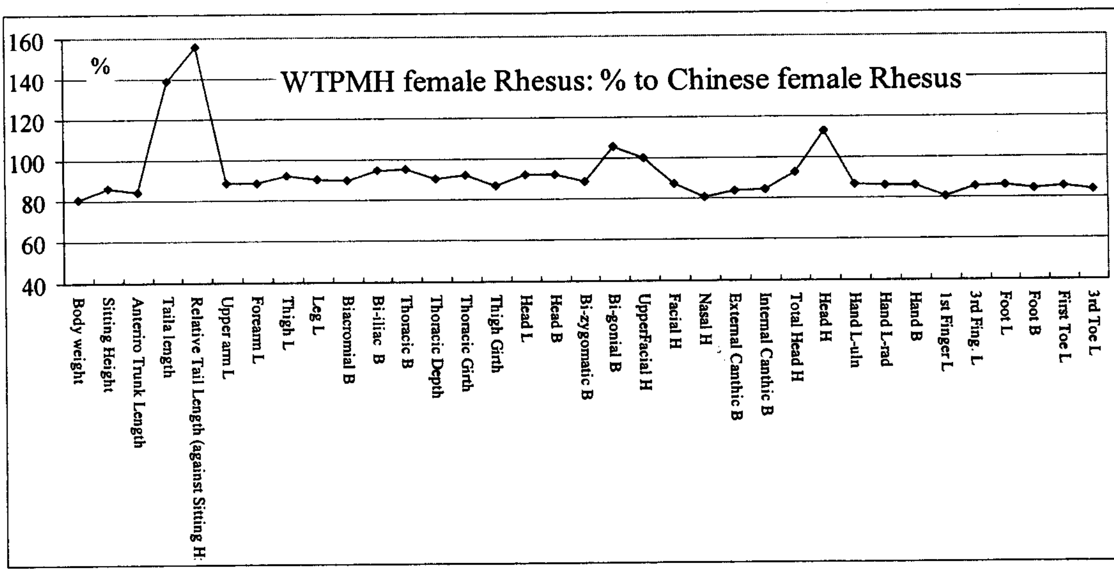
4.เมื่อเปรียบเทียบสีขนที่หน้า หลังและลำตัว (ดังรูปที่ 20) พบว่าไม่มีความแตกต่างกันระหว่างลิงวอก ณ วัดถ้ำผาหมากฮ่อและ จาก Primate Research Institute ซึ่งอาจเนื่องมาจากว่าลิงวอก ณ Primate Research Institute เลี้ยงในกรงเลี้ยงเปิด (Out-door enclosure) จึงทำให้ลิงถูกแสงแดดตลอดเวลาเช่นเดียวกันกับลิงวอกที่วัดถ้ำผาหมากฮ่อ แต่อย่างไรก็ตามพบว่าสีขนที่บริเวณข้อมือของลิงวอก ณ วัดถ้ำผาหมากฮ่อจะมีสีอ่อนและออกเหลืองมากกว่าลิงวอก ณ Primate Research Institute และลิงวอกจากทั้งสองแห่งมีรูปแบบของสีขน (pelage color) เป็น “bipartite pattern” เช่นเดียวกัน ซึ่งลักษณะดังกล่าวจัดเป็น key-character ของลิงวอก (Fooden, 2000)

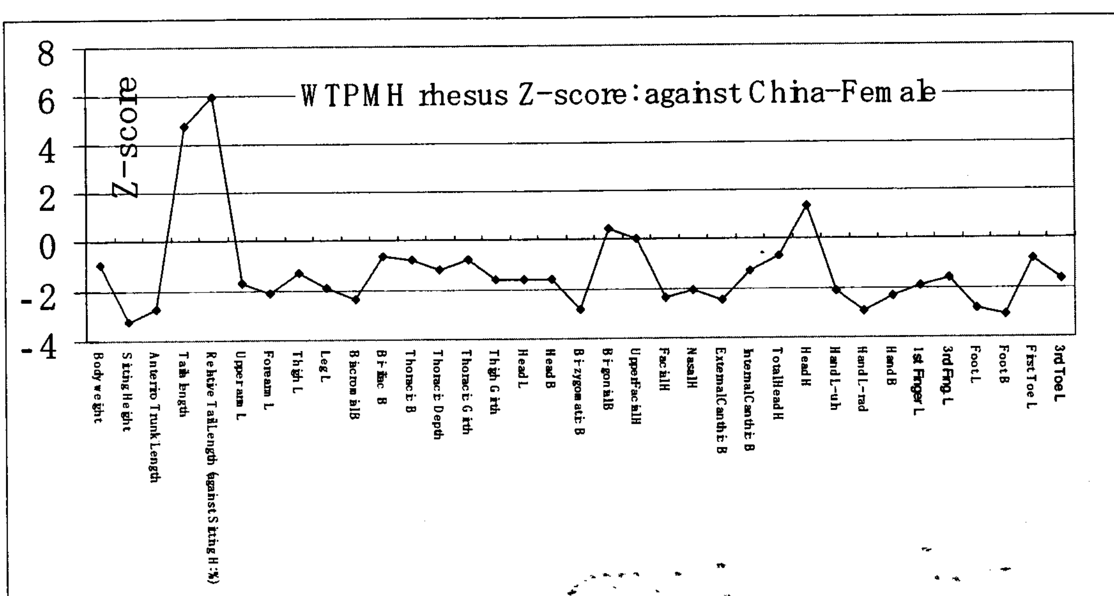
รูปที่ 20. เปรียบเทียบสีขนที่หน้า หลังและลำตัวระหว่างลิงวอก ณ วัดถ้ำผาหมากฮ่อ (WS) กับลิงวอกที่มีแหล่งกำเนิดจากประเทศจีนและอินเดียที่เลี้ยงอยู่ ณ Primate Research Institute (PRI), มหาวิทยาลัยเกียวโต ประเทศญี่ปุ่น



เมื่อทำการเปรียบเทียบค่า morphometric dimension ที่วัดได้จำนวน 35 ค่า ของลิงวอกโตเต็มวัยเพศเมีย ณ วัดถ้ำผาหมากฮ่อ กับลิงวอกเพศเมียที่มีแหล่งกำเนิดจากประเทศจีน ที่เลี้ยงอยู่ ณ Primate Research Institute (คิดเทียบเป็นเปอร์เซ็นต์กับลิงวอก ณ Primate Research Institute และคิดเป็นค่า Z-score) พบว่าค่าต่าง ๆ ของลิงวอก ณ วัดถ้ำผาหมากฮ่อ มีขนาดต่ำกว่า (มีค่าประมาณ 90%) ของลิงวอกจีน (รูปที่ 21) ยกเว้นความยาวหาง (tail-length และ relative tail-length) ที่มีค่าสูงกว่า (140 – 160%)

รูปที่ 21. เปรียบเทียบค่า morphometric dimension จำนวน 35 ค่า ของลิงวอกโตเต็มวัยเพศเมียจากวัดถ้ำผาหมากฮ่อ (WTPMH) กับลิงวอกเพศเมียที่มีแหล่งกำเนิดจากประเทศจีน ที่เลี้ยงอยู่ ณ Primate Research Institute





Fooden (2000) ได้จำแนกลิงวอกออกเป็น 3 กลุ่ม คือ 1) Eastern group ประกอบด้วยลิงวอกที่มีแหล่งกำเนิดในประเทศจีน และเวียดนาม มีหางยาวประมาณ 30% 2) Western-group ประกอบด้วยลิงวอกที่มีแหล่งกำเนิดในประเทศอินเดียทางเหนือ (northern India) ปากีสถาน และพม่า มีหางยาวประมาณ 45 – 50% และ 3) Southern group ประกอบด้วยลิงวอกที่มีแหล่งกำเนิดในประเทศแถบอินโดจีน รวมทั้งประเทศไทย มีหางยาวประมาณ 50 – 60% โดย Fooden ได้

ตั้งสมมติฐานชื่อว่า "The Hybridization Hypothesis" นั่นคือ ลิงวอก Southern group เป็นลิงวอกลูกผสมที่เกิดจากการผสมพันธุ์ระหว่างลิงวอกสายพันธุ์แท้กับลิงหางยาว จึงทำให้ลิงวอก Southern group มีขนาดเล็กกว่า แต่หางยาวกว่า ลิงวอกอีก 2 กลุ่มที่เหลือ

จากการศึกษาของ Fooden (1980) ลิงวอกและลิงหางยาว จัดอยู่ใน species group เดียวกัน (จัดจำแนกตามอวัยวะสืบพันธุ์) คือ Fascicularis group ลิงวอกมีการแพร่กระจายตั้งแต่ภาคเหนือตอนบนของประเทศไทย (ที่ 15 องศาเหนือของเส้นรุ้ง) ไปยังลาว เวียดนาม จีน อินเดีย และอัฟกานิสถาน (Fooden, 2000) ในขณะที่ลิงหางยาวมีการแพร่กระจายตั้งแต่ภาคเหนือตอนล่างของประเทศไทย (ที่ 17 องศาเหนือของเส้นรุ้ง) ลงมา (Fooden, 1995) และลิงมะแคคทั้งสองชนิดจะมีการอยู่ร่วมกันแบบ allopatric หรือ parapatric (Fooden, 1971) โดยมี boundary zone ที่ 15 – 20 องศาเหนือ (Fooden, 1982) และวัดถ้ำผาหมากฮ่อ จังหวัดเลย อยู่ในบริเวณดังกล่าว GPS = 17° 14' 56"S 108° 39' 50"E ดังนั้นข้อมูลที่ได้จากการศึกษาทางสัณฐานวิทยาในครั้งนี้ จึงมีแนวโน้มที่จะสนับสนุนสมมติฐาน "The Hybridization Hypothesis"

4.3.6. <u>ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลิโอไทด์เพื่อตอบคำถามเกี่ยวกับวิวัฒนาการของลิงวอก ณ วัดถ้ำผาหมากฮ่อโดยใช้ mtDNA และ TSPY gene</u>

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลิโอไทด์ mtDNA

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลิโอไทด์ mtDNA ส่วน D-loop โดยใช้ primer 554F และ 567F สามารถวิเคราะห์หา mtDNA D-loop ได้ประมาณ 477 คู่เบส ตารางแม็ตทริกซ์ข้อมูลลำดับดีเอ็นเอ (appendix 1) ขนาด 477 คู่เบสได้ถูกเตรียมขึ้นมาจากดีเอ็นเอจำนวน 59 ตัวอย่างซึ่งเป็นของ 1) ลิงวอกจากวัดถ้ำผาหมากฮ่อ (MmulWTPMH) จำนวน 32 ตัวอย่าง 2)ลิงวอกจากอุทยานแห่งชาติภูเขียว จังหวัดชัยภูมิ (MmulPRU)1 ตัวอย่าง 3) ลิงวอกจากสวนสัตว์เชียงใหม่ ที่เก็บไว้ที่ Primate Research Institute, Japan (MmulPRI) จำนวน 6 ตัวอย่าง 4) ลิงวอกจากประเทศจีน (MmulCN) จำนวน 7 ตัวอย่าง 8) ลิงวอกจากประเทศอินเดีย (MmulID) จำนวน 3 ตัวอย่าง 9) ลิงหางยาวจากจังหวัดนครสวรรค์ ประเทศไทย (MfasKN) จำนวน 5 ตัวอย่าง และ10) ลิงหางยาวจากจังหวัดสงขลา ประเทศไทย (MfasKN-KTK) จำนวน 4 ตัวอย่าง โดยมีตัวอย่างดีเอ็นเอของลิง Barbary (Msyl) (Arnason *et al.*, 2000) อีกหนึ่งตัวอย่าง ที่ได้ถูกกำหนดให้เป็นสิ่งมีชีวิตนอกกลุ่มศึกษา (outgroup) แผนภูมิต้นไม้ชี้นำแบบ NJ ที่ได้ (รูปที่ 22) แสดงให้เห็นถึงการจับกลุ่มของลิงตามลักษณะทางพันธุกรรมอย่างชัดเจน โดยแรกสุดได้มีการแบ่งลิงที่ศึกษาออกเป็นสองกลุ่มใหญ่ทางพันธุกรรม คือ **กลุ่มแรก**เป็นกลุ่มของลิงวอกจากสวนสัตว์ชียงใหม่ (MmulPRI) จากประเทศจีน (MmulCN) และจากประเทศอินเดีย (เกือบทั้งหมด) (MmulID) โดย**กลุ่มที่สอง**จะเป็นกลุ่มของลิงวอกจากวัดถ้ำผาหมากฮ่อ (MmulWTPMH) จากภูเขียว (MmulPRU) และจากประเทศอินเดีย (เพียงหนึ่งตัวอย่าง) (MmulID) รวมกับลิงหาวยาวจากจังหวัดนครสวรรค์ (MfasKN) และสงขลา (MfasKN-KTK) ค่าสถิติสนับสนุน Bootstrap ของทั้งสองกลุ่มอยู่ที่ 99% และ 90% ตามลำดับ

จากการพิจารณาแผนภูมิต้นไม้ NJ ที่ได้ พบว่าลิงวอกจากวัดถ้ำผาหมากฮ่อ (MmulWTPMH) ซึ่งเป็นสิ่งมีชีวิตหลักในงานวิจัยนี้มีลักษณะทางพันธุกรรมจำเพาะเป็นของตนเองแต่มีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมภายในประชากรสูงสามารถที่จะแบ่งกลุ่มตัวอย่างลิงวอกจากวัดถ้ำผาหมากฮ่อทั้งหมดนี้ออกเป็นสองกลุ่มตามลักษณะพันธุกรรม โดยกลุ่มที่หนึ่งมี 18 ตัวอย่าง (ค่า Bootstrap เท่ากับ 100%) และกลุ่มที่สองมี 14 ตัวอย่าง (Bootstrap เท่ากับ 62% โดยจะเท่ากับ

100% ถ้าไม่นับตัวอย่างลิง MmulWTPMH260) ในขณะที่ลิงจากบริเวณอื่นๆ ในประเทศไทยถูกพบว่ามีลักษณะทางพันธุกรรมจำเพาะของแต่ละกลุ่มเช่นกัน ดังที่จะเห็นได้จากการจับกลุ่มตามพันธุกรรมของลิงหางยาวจากจังหวัดนครสวรรค์ (MfasKN) เป็นกลุ่มจำเพาะแยกออกไป (ค่า Bootstrap เท่ากับ 96%) และการจับกลุ่มของลิงหางยาวจากจังหวัดสงขลา (MfasKN-KTK) ในแบบเดียวกัน (Bootstrap เท่ากับ 100%)

แผนภูมิต้นไม้ NJ ได้ช่วยเสนอแนะในการตัดข้อมูลลำดับดีเอ็นเอของลิงบางตัวอย่างออกก่อนการวิเคราะห์ขั้นต่อไป โดยได้ตัดออก 31 ตัวอย่าง เป็นตัวอย่างของลิง MfasKN85, MmulPRI1990, MmulID464 และ MmulCN564 และตัวอย่างลำดับดีเอ็นเอของลิงวอกจากวัดถ้ำผาหมากฮ่อจำนวน 27 ตัวอย่างเพื่อลดความซ้ำซ้อนของข้อมูล ตารางแม็ตทริกซ์ที่ได้ภายหลังจากการลดจำนวนข้อมูลลำดับดีเอ็นเอแล้ว ยังคงมีขนาดเท่าเดิม คือ 477 คู่เบส ซึ่งเมื่อวิเคราะห์แบบมัธยัสถ์สูงสุดด้วยวิธีการค้นหาแบบ Branch-and-bound แล้ว พบว่าตารางแม็ตทริกซ์ประกอบด้วยข้อมูลที่มีความหมายในเชิงวิเคราะห์อยู่ 73 คู่เบส (15.5% ของข้อมูลทั้งหมด) และสามารถค้นพบว่าแผนภูมิต้นไม้ที่มีความมัธยัสถ์สูงสุดเท่าเทียมกัน (equally parsimonious tree) ทั้งหมด 143 แผนภูมิ โดยมีความยาวแผนภูมิต้นไม้รวมเท่ากับ 174 การเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์

แผนภูมิต้นไม้ไฟโลเจเนติกส์ของลิงทั้ง 28 ตัวอย่าง (รูปที่ 23) เป็นแผนภูมิสอดคล้องแบบเข้มงวดที่สร้างจากการพิจารณาถึงความสอดคล้องกันทั้งหมดของแผนภูมิต้นไม้ที่วิเคราะห์ได้ทั้ง 5 แผนภูมิ ค่าสนับสนุนทางสถิติ Bootstrap และค่า Jackknife ได้ถูกคำนวณขึ้นและแสดงไว้ประกอบกับกิ่งแต่ละกิ่งบนแผนภูมิต้นไม้ (ค่า Bootstrap อยู่เหนือกิ่ง ค่า Jackknife อยู่ใต้กิ่ง) แผนภูมิต้นไม้ที่ได้นี้เป็นตัวแทนแสดงถึงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของตัวอย่างลิงจากที่ต่างๆ โดยจะพบว่าแผนภูมิมีลักษณะโดยรวมคล้ายคลึงกับแผนภูมิต้นไม้ NJ ที่สร้างขึ้นมาก่อนนี้ กล่าวคือมีการแยกสายวิวัฒนาการของลิงที่สนใจศึกษาออกเป็นสองสายชัดเจน มีค่าสนับสนุนทางสถิติสูง (ค่า Bootstrap และ Jackknife ของสายที่หนึ่งเท่ากับ 86% และ 83% ตามลำดับ ส่วนค่าของสายที่สองเท่ากับ 97% และ 97%) โดยที่สายแรกแสดงถึงการมีบรรพบุรุษเมื่อไม่นานมานี้ร่วมกัน (recent common ancestor) ของลิงวอกจากสวนสัตว์เชียงใหม่ (MmulPRI) จากประเทศจีน (MmulCN) และจากประเทศอินเดีย (เกือบทั้งหมด) (MmulID) ส่วนสายที่สองแสดงถึงวิวัฒนาการที่มีมาร่วมกันของลิงวอกจากวัดถ้ำผาหมากฮ่อ (MmulWTPMH) จากอุทยานแห่งชาติภูเขียว (MmulPRU) และจากประเทศอินเดีย (MmulID) รวมกับลิงหางยาวจากจังหวัดนครสวรรค์ (MfasKN) และจังหวัดสงขลา (MfasKN-KTK)

เมื่อพิจารณาถึงลักษณะการจับกลุ่มของลิงภายในสายวิวัฒนาการเหล่านี้ ตามผลการวิเคราะห์เชิงวิวัฒนาการอิงข้อมูลลำดับดีเอ็นเอของยีน TSPY gene โดยเฉพาะเมื่อเน้นถึงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของลิงวอกจากวัดถ้ำผาหมากฮ่อเทียบกับตัวอย่างลิงอื่นๆ แล้ว พบว่า จากแผนภูมิต้นไม้แบบสอดคล้องเข้มงวด ตัวแทนทั้งสี่ของลิงวอกจากวัดถ้ำผาหมากฮ่อนั้นมีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้ชิดอย่างมากกับลิงวอกจากอุทยานแห่งชาติภูเขียวโดยที่ยังแสดงให้เห็นด้วยว่ามีความเป็นไปได้สูงมากที่ลิงทั้ง 6 ตัวอย่างดังกล่าวนี้จะมีบรรพบุรุษร่วมที่ใกล้ชิดกับตัวอย่างของลิงต่างสปีชีส์ออกไป คือ ลิงหางยาวจากจังหวัดนครสวรรค์ซึ่งมาจากบริเวณภาคเหนือในประเทศไทย (GPS =N15° 57' 01.5", E99° 52' 56.6") เช่นกัน (Malaivijitnond and Hamada, 2004) (มีค่า Bootstrap และ Jackknife ของการจับกลุ่มระหว่างลิงเหล่านี้เท่ากับ 98% และ 97% ตามลำดับ) ในขณะที่ตัวอย่างลิงหางยาวจากจังหวัดสงขลาซึ่งอยู่ในบริเวณภาคใต้ของประเทศ (GPS = N7° 12' 33.2", E100° 35' 49.8") (Malaivijitnond and Hamada, 2004) มีการจับกลุ่มแยกออกไปต่างหากจากลิงอื่นๆ ที่มาจากภาคเหนือในสายวิวัฒนาการหลักนี้ (Bootstrap และ Jackknife เท่ากับ 99% และ 97% ตามลำดับ) ส่วนสายวิวัฒนาการ

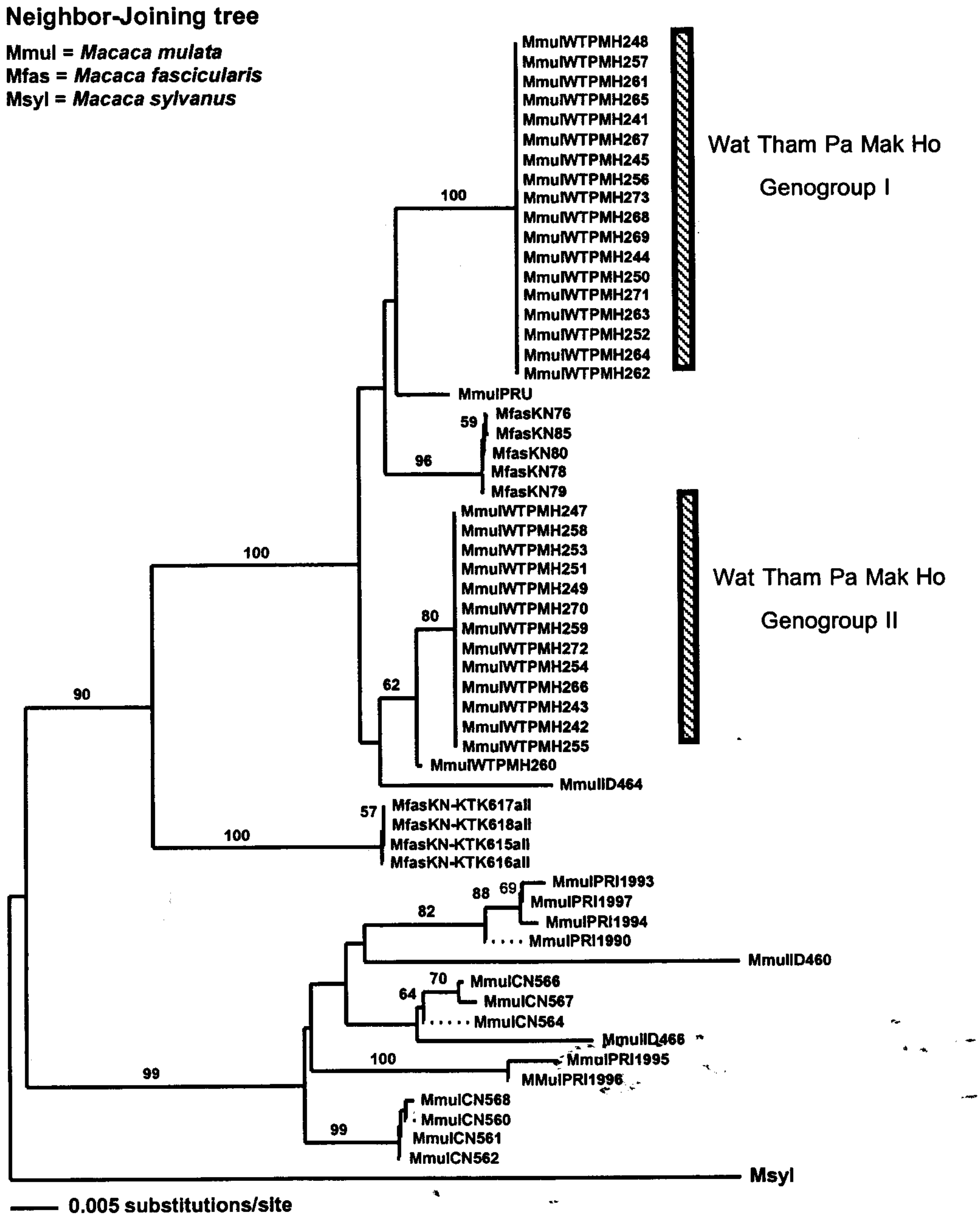
สายที่สองที่ประกอบด้วยลิงวอกจากสวนสัตว์เชียงใหม่ จากประเทศจีน และจากประเทศอินเดีย (เกือบทั้งหมด) นั้น ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระหว่างลิงเหล่านี้แม้ว่าจะถูกแสดงในลักษณะของแผนภูมิต้นไม้ที่แก้ไขเรียบร้อย (resolved tree) เป็นส่วนใหญ่แล้ว แต่ค่าสนับสนุนทางสถิติของแต่ละกิ่งย่อยหลายกิ่งมีค่าค่อนข้างต่ำมาก (<50%) ซึ่งแสดงถึงการที่ตัวอย่างลิงทั้งหมดความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่ใกล้ชิดกันร่วมกันหมด แม้ว่าจะมาจากต่างสถานที่กัน

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลิโอไทด์ TSPY gene

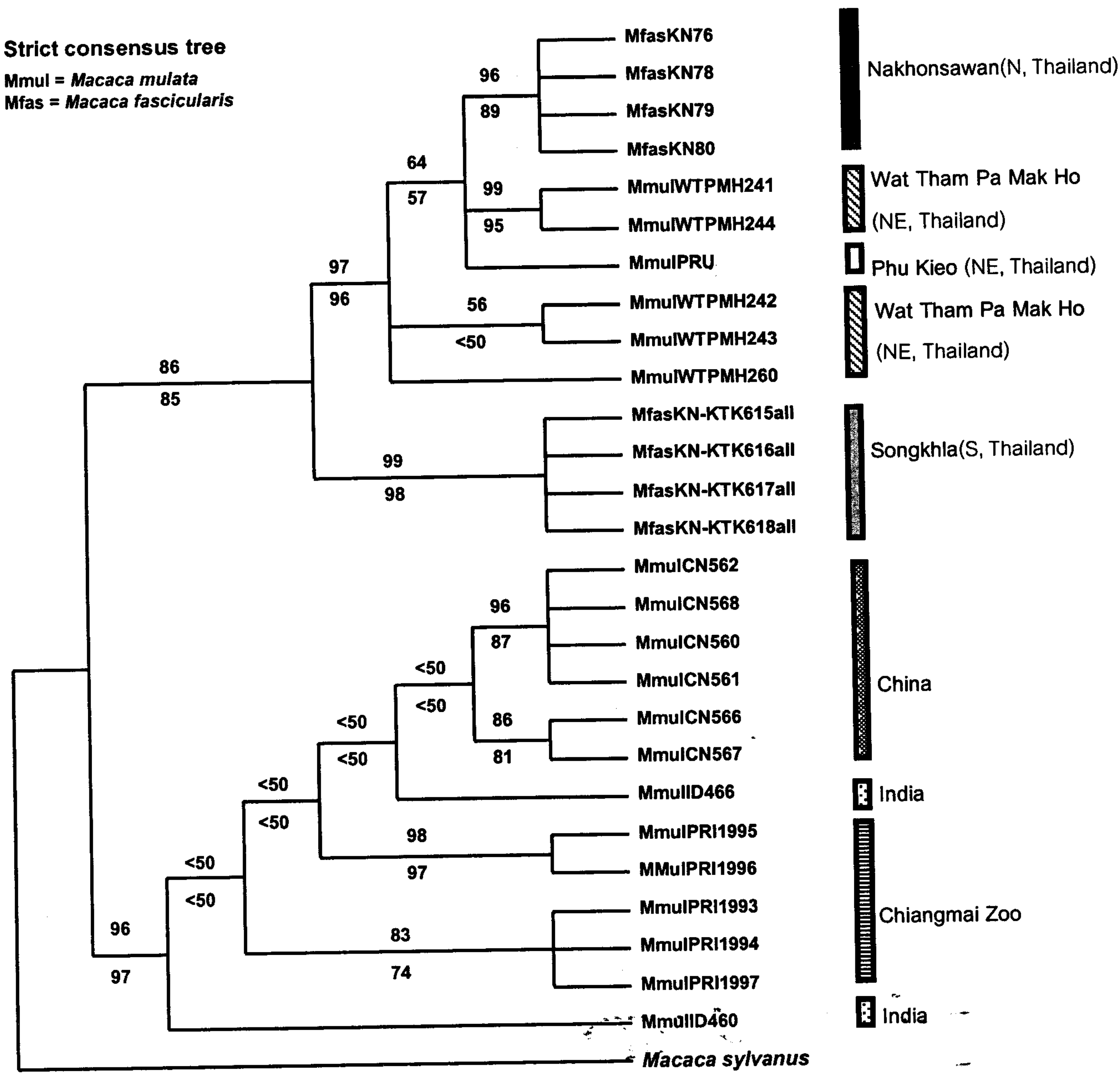
จาก phylogenetic tree ที่ได้จาก TSPY gene ลิงวอกวัดถ้ำผาหมากฮ่อ (MmulWTPMH) จะอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับลิงวอกที่มีแหล่งกำเนิดจากประเทศพม่า, อินเดีย และจีน (Tosi *et al.*, 2000) และลิงหางยาว อ.กุมภวาปี จ.อุดรธานี และลิงหางยาววัดถ้ำเทพบันดาล จ.เพชรบูรณ์ และอยู่แยกกลุ่มจากลิงหางยาวในประเทศไทย (Tosi *et al.*, 2000) และลิงหางยาวจากเขาน้อยเขาตังกวน จ.สงขลา (รูปที่ 24)

ผลที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลิโอไทด์ของ mtDNA และ TSPY gene สอดคล้องกันกับผลทางสัณฐานวิทยาที่ว่าลิงวอกวัดถ้ำผาหมากฮ่อมีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับลิงหางยาวไทยมากกว่าลิงวอกอินเดียและจีน ซึ่งผลที่ได้จากการวิจัยในเบื้องต้นนี้มีแนวโน้มที่จะสนับสนุนสมมติฐาน “The Hybridization Hypothesis” ของ Fooden (2000) ที่ว่าลิงวอกที่มีอยู่ในประเทศแถบอินโดจีน (รวมประเทศไทย) ในปัจจุบัน เป็นลิงลูกผสมที่เกิดจากการผสมพันธุ์ระหว่างลิงวอกสายพันธุ์แท้และลิงหางยาวในอดีต แต่อย่างไรก็ตามเพื่อให้ได้ข้อสรุปที่ชัดเจนจะต้องรอผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลิโอไทด์ของลิงวอกฝูงอื่น ๆ ในประเทศไทยมาสนับสนุน

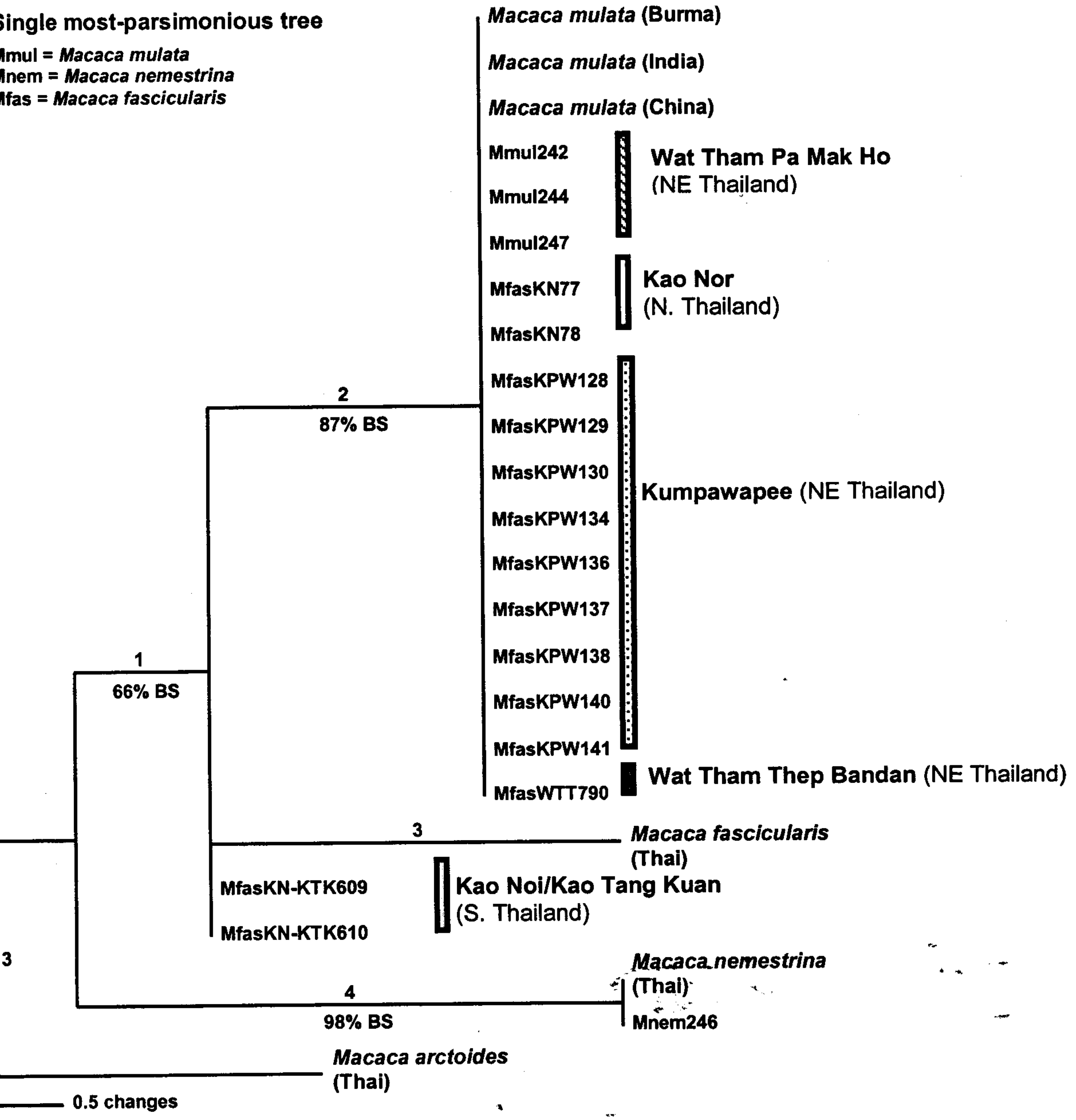
รูปที่ 22 แสดงแผนภูมิต้นไม้ชี้นำแบบ Neighbour Joining ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลิโอไทด์ mtDNA ส่วน D-loop จำนวน 477 คู่เบสของลิงวอกจากวัดถ้ำผาหมากฮ่อ (MmulWTPMH) ลิงวอกจากอุทยานแห่งชาติภูเขียว (MmulPRU) ลิงวอกจากสวนสัตว์เชียงใหม่ (MmulPRI) ลิงวอกจากประเทศจีน (MmulCN) ลิงวอกจากประเทศอินเดีย (MmulID) ลิงหางยาวจากจังหวัดนครสวรรค์ (MfasKN) และลิงหางยาวจากจังหวัดสงขลา (MfasKN-KTK) โดยมีตัวอย่างดีเอ็นเอของลิง Barbary (Msyl) (Arnason *et al.*, 2000) เป็น outgroup



รูปที่ 23 แผนภูมิต้นไม้ไฟโลเจเนติกส์ของลิงทั้ง 28 ตัวอย่าง โดยตัดตัวอย่างลำดับนิวคลีโอไทด์ของลิง MfasKN85, MmulPRI1990 MmulID464 และ MmulCN564 และลิงวอกจากวัดถ้ำผาหมากฮ่อจำนวน 27 ตัวอย่าง จากแผนภูมิต้นไม้ชี้นำแบบ Neighbour Joining ที่ได้จาก รูปที่ 22 (ค่า Bootstrap อยู่เหนือกิ่ง ค่า Jackknife อยู่ใต้กิ่ง)



รูปที่ 24 แสดงแผนภูมิต้นไม้ชี้นำแบบ Neighbor Joining ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลิโอไทด์ TSPY gene จำนวน 711 คู่เบสของลิงวอก (Mmul) จากวัดถ้ำผาหมากฮ่อ (WTPMH), พม่า (Burma), อินเดีย (India) และจีน (China) ลิงหางยาว (Mfas) จากกุมภวาปี (KPW), วัดถ้ำเทพบันดาล (WTT), เขาน้อยเขาตังกวน (KN/KTK) และประเทศไทย (Thai) โดยมีตัวอย่างดีเอนเอของลิงเสนในประเทศไทย (MarcThai) (Tosi *et al.*, 2000) เป็น outgroup

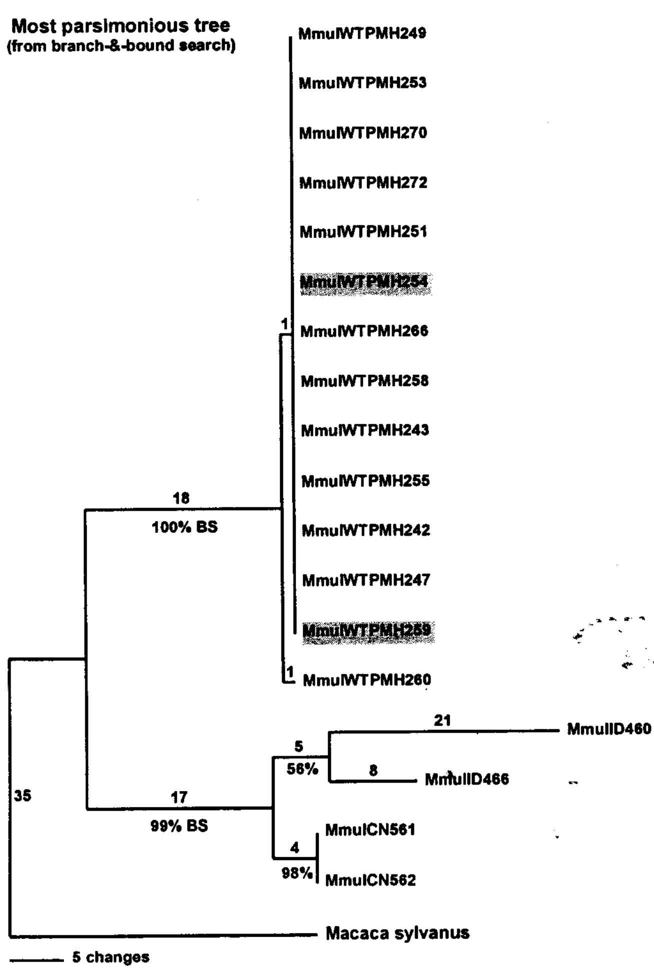


4.3.7. <u>ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลิโอไทด์เพื่อตอบคำถามเกี่ยวกับลิงลูกผสม ณ วัดถ้ำผาหมากฮ่อโดยใช้ mtDNA และ TSPY gene</u>

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลิโอไทด์ mtDNA

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลิโอไทด์ mtDNA ส่วน D-loop ของลิงวอกจากวัดถ้ำผาหมากฮ่อ (MmulWTPMH) จำนวน 12 ตัวอย่าง ลิงลูกผสมหมายเลข MmulWTPMH 254 และ 259 ลิงวอกจากประเทศจีน (MmulCN) และลิงวอกจากประเทศอินเดีย (MmulID) อย่างละ 2 ตัวอย่าง โดยมีตัวอย่างดีเอ็นเอของลิง Barbary (Msyl) (Arnason *et al.*, 2000) เป็น outgroup พบว่าลิงลูกผสมทั้งสองตัวจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับลิงวอกจากวัดถ้ำผาหมากฮ่อ และแยกกลุ่มออกจากลิงวอกจีนและอินเดีย และลิง Barbary ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าลิงลูกผสมทั้งสองตัวมีแม่ (maternal lineage) เป็นลิงวอกจากวัดถ้ำผาหมากฮ่อ

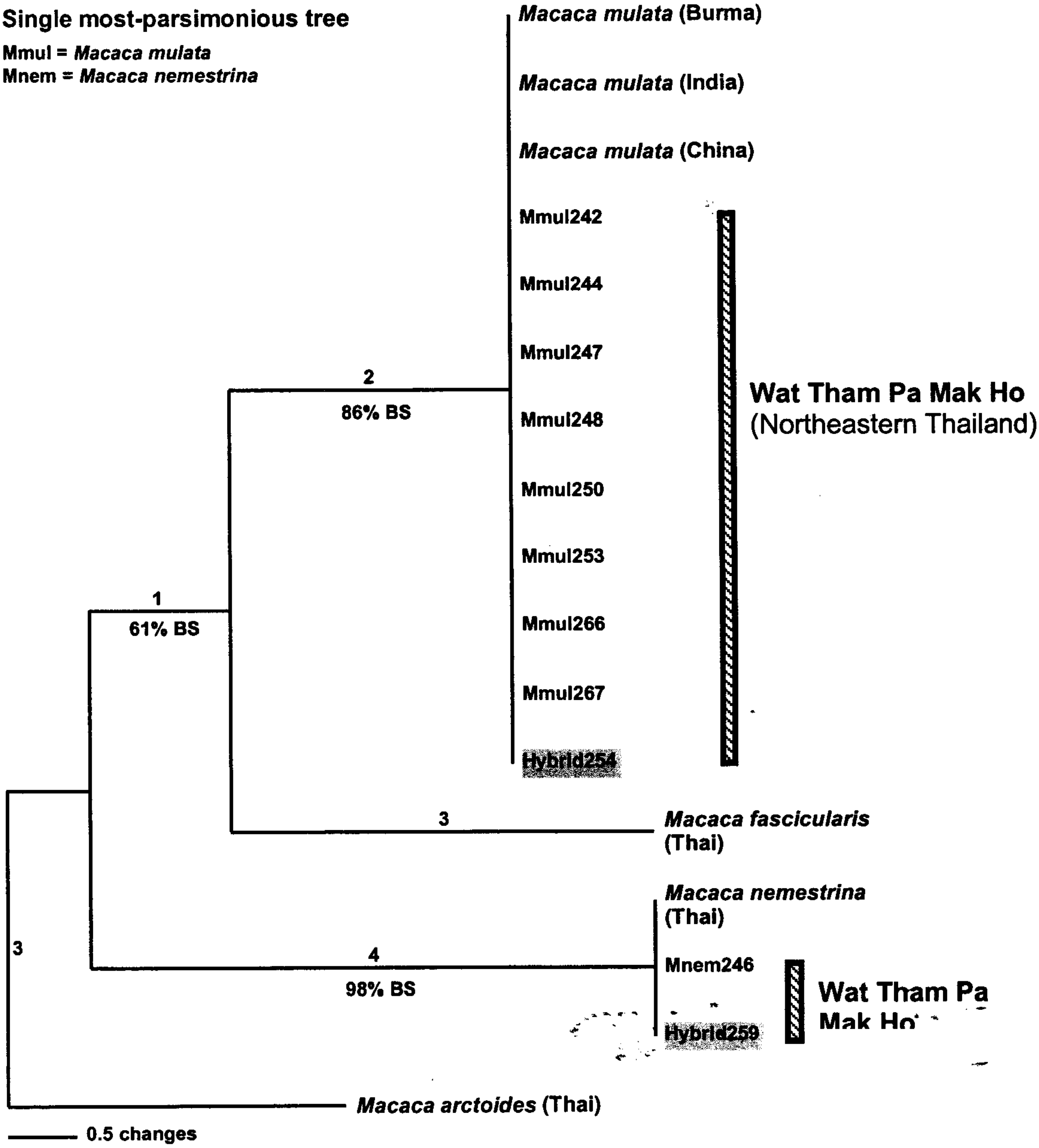
รูปที่ 25 แสดงแผนภูมิต้นไม้ชี้นำแบบ Neighbour Joining ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลิโอไทด์ mtDNA ส่วน D-loop จำนวน 477 คู่เบสของลิงวอกจากวัดถ้ำผาหมากฮ่อ (MmulWTPMH) ลิงลูกผสมหมายเลข MmulWTPMH 254 และ 259 ลิงวอกจากประเทศจีน (MmulCN) และลิงวอกจากประเทศอินเดีย (MmulID) โดยมีตัวอย่างดีเอ็นเอของลิง Barbary (Msyl) (Arnason *et al.*, 2000) เป็น outgroup



- การวิเคราะห์ลำดับนิวคลิโอไทด์ TSPY gene

ผลการทดลองที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลิโอไทด์ TSPY gene ในลิงวอกเพศผู้จำนวน 10 ตัว (รวมลูกลิงที่คาดว่าเป็นลิงลูกผสมจำนวน 2 ตัว คือ หมายเลข 254 และ 259) และลิงกัง 1 ตัว โดยใช้ primer TSPY-SEQ และ TSPY-SEQR ที่ครอบคลุมส่วนของ exon 1, exon 2 และ intron ลำดับที่ 1 สามารถวิเคราะห์หาลำดับนิวคลิโอไทด์ได้ 711 และ 713 คู่เบส ในลิงวอกและลิงกัง ตามลำดับ พบว่าเมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลิโอไทด์ของ TSPY gene จำนวน 711 คู่เบส ระหว่างลิงวอกวัดถ้ำผาหมากฮ่อจำนวน 8 ตัว ลิงวอกที่มีแหล่งกำเนิดจากประเทศอินเดีย จีนและพม่า (Tosi *et al.*, 2000) พบว่ามีค่าความคล้ายคลึง 100% และเมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลิโอไทด์ของ TSPY gene จำนวน 713 คู่เบส ระหว่างลิงกังวัดถ้ำผาหมากฮ่อ กับลิงกังไทย (Tosi *et al.*, 2000) พบว่ามีค่าความคล้ายคลึง 100% เช่นกัน แต่เมื่อเปรียบเทียบ TSPY gene ระหว่างลิงวอกและลิงกังพบว่ามีความแตกต่างของลำดับนิวคลิโอไทด์ทั้งหมด 7 คู่เบส (the 78th, 153rd, 320th, 428th, 483rd, 626th, and 778th) และเกิด insertion ในลิงกัง 2 คู่เบส (the 324th and 325th) จึงสามารถใช้ TSPY gene ในการจำแนกลิงกังออกจากลิงวอกได้ เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลิโอไทด์ของลิงลูกผสมหมายเลข 254 และ 259 พบว่าลำดับนิวคลิโอไทด์ของ TSPY gene ของลิงลูกผสมหมายเลข 254 มีค่าความคล้ายคลึง 100% กับของลิงวอก ในขณะที่ลำดับนิวคลิโอไทด์ของ TSPY gene ของลิงลูกผสมหมายเลข 259 มีค่าความคล้ายคลึง 100% กับของลิงกัง นั่นคือสามารถสรุปได้ว่าลิงลูกผสมหมายเลข 254 ไม่ใช่ลิงลูกผสมจากการวิเคราะห์ทางดีเอนเอ แต่ลิงลูกผสมหมายเลข 259 เป็นลิงลูกผสมที่เกิดจากแม่ลิงวอกและพ่อลิงกังจริง ซึ่งลักษณะดังกล่าวจะสอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา คือลิงลูกผสมหมายเลข 254 มีขนวนเป็นก้นหอยที่แก้ม pelage color แสดง bipartite pattern ในขณะที่หมายเลข 259 ขนที่แก้มไม่วนเป็นก้นหอย pelage color ไม่แสดง bipartite pattern แต่ลูกลิงทั้งสองตัวมีหางยาวประมาณ 50%

รูปที่ 26 แสดงแผนภูมิต้นไม้ชี้นำแบบ Neighbour Joining ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลิโอไทด์ TSPY gene จำนวน 711 คู่เบสของลิงวอก (Mmul) จากวัดถ้ำผาหมากฮ่อ (WTPMH), จีน (China),อินเดีย (India) และพม่า (Burma) ลิงกัง (Mnem) จากวัดถ้ำผาหมากฮ่อ (WTPMH246) ไทย (Thai) ลิงลูกผสมหมายเลข MmulWTPMH 254 และ 259 และลิงหางยาวจากประเทศไทย (MfasThai) โดยมีตัวอย่างดีเอ็นเอของลิงเสนจากประเทศไทย (MarcThai) (Tosi *et al.*, 2000) เป็น outgroup



4.4. **การทำหมันลิงกัง**

จากที่ใช้วิธีการเป่าลูกดอกยาสลบ ketamine hydrochloride ทำให้ลิงกังเพศผู้สลบแล้วจากนั้นจึงทำหมันลิงโดยการตัดท่อนำอสุจิ (vas deference; vasectomy) แล้วตัดอัณฑะออกมา 1 ข้าง (orchidectomy) ดองใน 10% buffer formalin เพื่อใช้ในการศึกษาทางด้านจุลกายวิภาคศาสตร์ต่อไป นอกจากนี้ยังได้ตัดเขี้ยวลิงออก เนื่องจากหลวงพ่อได้แจ้งว่าลิงกังค่อนข้างดุ และเกรงว่าจะกัดนักท่องเที่ยวและชาวบ้านในบริเวณใกล้เคียง

4.4.1. <u>ลักษณะโครงสร้างทางสังคมของลิงวอกภายหลังจากทำหมันลิงกังเพศผู้</u>

จากที่ได้ติดตามศึกษาลักษณะโครงสร้างประชากรของลิงวอก ในวันที่ 1 กันยายน 2546 หรือภายหลังจากที่ทำหมันลิงกังเพศผู้นานประมาณ 6 เดือน พบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะโครงสร้างประชากรของลิงวอกจากที่ได้ทำการศึกษาไปเมื่อเดือนมีนาคม 2546 นั่นคือ ลิงกังยังทำหน้าที่เป็นจ่าฝูงของฝูงลิงวอกทั้งหมด โดยในฝูงหลักนั้นพบลิงแม่ลูกอ่อน (จากการประมาณขนาดของลูกที่พบ มีอายุเท่ากับ 1-4 เดือน นั่นคือเกิดในราวเดือนเมษายน – กรกฎาคม) ซึ่งก็ตรงกันกับที่ได้ตั้งสมมติฐานไว้ว่าลิงวอกที่วัดถ้ำผาหมากฮ่อ มีการผสมพันธุ์ในช่วงเดือน ธันวาคม – กุมภาพันธ์ เป็นส่วนใหญ่ และพบบ้างประปรายในช่วงเดือนมีนาคม เพราะเนื่องจากลิงจะใช้เวลาในการตั้งท้องนานประมาณ 165 วัน (Burton and Eaton, 1995) แม่ลิงที่คลอดลูกในปีนี้พบว่าเป็นลิงที่เคยจับมาทำการศึกษาเมื่อเดือนมีนาคม จากการวางกรงดัก และสักสัญญลักษณ์ไว้ที่หน้า (code) มีหมายเลขดังนี้ หมายเลข 31 (คลอดลูกเป็นตัวแรกของฝูงในเดือนเมษายน) หมายเลข 10, 12, 21 และ 22 จากการสังเกตพบว่าลูกที่เกิดใหม่มีลักษณะภายนอกผสมกันระหว่างลิงกังและลิงวอกอย่างน้อย 2 ตัว **ลักษณะที่ใช้สังเกตลูกที่เกิดใหม่อย่างง่ายว่าลูกที่เกิดเป็นลิงวอกหรือลิงลูกผสมให้ดูจากสีขน เนื่องจากลูกลิงวอกที่เกิดใหม่จะมีขนสีน้ำตาลอ่อนออกเหลือง ในขณะที่ลิงลูกผสมจะมีขนสีดำเข้ม** นอกจากนี้ยังอาจใช้ลักษณะการเรียงตัวของขนที่หัว (hair pattern) ช่วยในการบ่งบอกได้ โดยลูกลิงวอกที่เกิดใหม่จะมีขนลู่เรียบไปทางด้านหลังสีขนเป็นสีเดียวกันกับสีตัว ในขณะที่ลิงลูกผสมขนจะมีลักษณะแสกกลางเป็นร่องและสีดำเข้ม

5. เอกสารอ้างอิง

วิฑูรย์ ไวยนันท์ และพีรพรรณ ตันอารีย์. (2540). ปรสิตวิทยาทางการแพทย์. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ: คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

Affara N, Bishop C, Brown W, Cooke H, Davey P, Ellis N, et al (1996). Report of the second international workshop on Y chromosome mapping 1995. *Cytogenet Cell Genet* 73: 33-76.

Altman J (1974). Observational study of behavior: sampling methods. Behavior 49: 227–267.

Arnason U, Gullberg A, Burguete AS, Janke A (2000). Molecular estimates of primates divergences and new hypotheses for primate dispersal and the origin of modern humans. *Hereditas* 133: 217-228.

Bernstein IS, Gordon TP (1980). Mixed taxa introductions, hybrids and macaque systematics. In: Lindburg DG (ed.) *The Macaques: Studies in Ecology, Behavior and Evolution*. Van Nostrand Reinhold: New York. pp 125-147.

Burton F, Eaton M. (1995). *The Multimedia Guide to the Non-human Primates (printed version).* Scarborough: Prentice Hall Canada Inc.

Cheverud JM, Buettner-Janusch J, Sade D. (1987). Social group fission and the origin of intergroup genetic differentiation among rhesus monkeys of Cayo Santiago. *Am J Phys Anthropol.* **49**: 449-456.

Data Analysis Products Division. (1997). *S-Plus User's Guide version 4.*0. MathSoft, Inc. Seattle, Washington.

Dittus WPJ (1980). The social regulation of primate populations: a synthesis. In: Lindburg DE (ed.) *The Macaques: Study in Ecology, Behavior, and Evolution.* Van Nostrand Reinhold Company, New York, pp 1-9.

Fooden J. (1971). Report on primates collected in western Thailand January-April, 1967. *Fieldiana Zoology.* **59**: 1-62.

Fooden J (1975). Taxonomy and evolution of liontail and pigtail macaques (Primates: Cercopithecidae). *Fieldiana Zoology* **67**, pp. 169.

Fooden J (1976). Provisional classification and key to living species of macaques (Primates: *Macaca*), *Folia Primatol* **25**: 225 – 236.

Fooden J (1980). Classification and distribution of living macaques (*Macaca Lacepede*, 1799). In: Lindburg DG (ed.) *The Macaques: Studies in Ecology, Behavior and Evolution.* Van Nostrand Reinhold: New York. pp 1-9.

Fooden J (1982). Ecogeographic segregation of macaque species. *Primates* **23**: 574 – 579.

Fooden J. (1995). Systematic review of southeast Asian longtail macaques, *Macaca fascicularis* (Raffles, (1821)). *Fieldiana Zoology. New series*, **No.81**, pp.205.

Fooden J (1997). Tail length variation in *Macaca fascicularis* and *M. mulatta. Primates* **38**: 221 – 231.

Fooden J (2000). Systematic review of rhesus macaque, *Macaca mulatta* (Zimmermann, 1780). *Fieldiana Zoology.* New series, **96**, pp.180.

Glaser B, Grutzner F, Willman U, Stanyon R, Arnold N, Taylor K, et al (1998). Simian Y chromosomes: Species-specific rearrangements of DAZ, RBM, and TSPY versus contiguity of PAR and SRY. *Mamm Genome* **9**: 226-231.

Hamada Y, Watanabe T, Iwamoto M (1992). Body color variation in macaques, especially in Japanese macaques (*Macaca fuscata*). *Primate Res* **8**: 1-23. (in Japanese with English abstract).

Hamada Y, Watanabe T, Takenaka O, Suryobroto B, Kawamoto Y (1988). Morphological studies of the Sulawesi macaques: I. Phyletic analysis of body color. *Primates* **29**: 65-80.

Hayasaka K, Ishida T, Horai S (1991). Heteroplasmy and polymorphism in the major noncoding region of mitochondrial DNA in Japanese monkeys: association with tandemly repeatedn sequences. *Mol Biol Evol* **8**: 399-415.

Iwamoto M (1971). Morphological studies of *Macaca fuscata*: VI. Somatometry. *Primates* 12: 151-174.

Iwamoto M, Hamada Y, Watanabe T (1984). Eruption of deciduous teeth in Japanese monkeys (*Macaca fuscata*). *J Anthrop Soc Nippon* 92: 273-279.

Iwamoto M, Watanabe T, Hamada Y (1987). Eruption of permanent teeth in Japanese monkeys (*Macaca fuscata*). *Primate Res* 3: 18-28.

Iwamoto M, Suryobroto B (1990). Palmar and plantar dermatoglyphics in macaques: a revised method for their description. *Primates* 31: 431-438.

Karr SL Jr, Henrickson RV, Else JD. (1980). A survey for intestinal helminthes in recently wild-caught Macaca mulatto and results of treatment with mebendazole and thiabendazole. *J Med Primatol.* 9: 200-204.

Kim HS, Takenaka O (1996). A comparison of TSPY genes from Y-chromosomal DNA of the great apes and humans: sequence, evolution, and phylogeny. *Am J Phys Anthropol* 100: 301-309.

Kim HS, Hirai H, Takenaka O (1996). Molecular features of the TSPY gene of gibbons and Old World monkeys. *Chromosome Res* 4: 500-506.

Malaivijitnond S, Takenaka O. (1998). Nucleotide sequences of parathyroid gene in five species of macaque of Thailand. *J Sci Res Chula Unvi.* 23: 135-142.

Malaivijitnond S, Varavudhi P (2002). The last possible troop of semi-wild rhesus macaque (*Macaca mulatta*) in Thailand. *Nat Hist J Chulalongkorn Univ* 2: 59-61.

Malaivijitnond S, Takenaka O, Anukulthanakorn K, Cherdshewasart W (2002). The nucleotide sequences of the parathyroid gene in primates (suborder Anthropoidea). *Gen Comp Endocrinol* 125: 67-78.

Malaivijitnond S, Hamada Y. (2004). Sympatric distribution of two macaque species, long-tailed and stump-tailed macaques, in the southern Thailand. *Oryx*. (submitted)

Miho I. (1987) Soil-eating of Japanese macaques (Macaca fuscata) at Arashiyama, Kyoto. *Primate Res.* 3: 103-111. (in Japanese)

Nei M (1973). Analysis of gene diversity in sub-divided populations. *Proc Natl Acad Sci USA* 20: 3321-3323.

Saitou N, Nei M (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4: 406-425.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edn,. Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York.

Schempp W, Binkele A, Arnemann J, Glaser B, Ma K, Taylor K, et al (1995). Comparative mapping ~~of~~ YRRM- and TSPY-related cosmids in man and hominid apes. *Chromosome Res* 3: 227-234.

Seinfeld J. (2001). http://animaldiversity.ummz.umich.edu/accounts/macaca/m, mulatta$narrative.html. (9/7/01)

Smith BH, Crummett TL, Brandt KL (1994). Ages of eruption of primate teeth: A compendium for aging individuals and comparing life histories. *Yearbook Phys Anthropol* 37: 177-231.

Son VD.(2002). Intestinal parasites of Macaca fascicularis in a mangrove forest, Ho Chi Minh City, Vietnam. *Laboratory Primate Newsletter*. 41.

Tosi AJ, Morales JC, Melnick DJ (2000). Comparison of Y chromosome and mtDNA phylogenies leads to unique inferences of macaque evolutionary history. *Mol Phylogenet Evol* 17: 133–144.

Zhang JS, Yang-Feng TL, Muller U, Mohandas TK, de Jong PJ, Lau Y-FC (1992). Molecular isolation and characterization of an expressed gene from the human Y chromosome. *Hum Mol Genet* 1: 717-726.

6. ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับชาติ/นานาชาติ

6.1. บทความในวารสารวิชาการ (Papers)

1. Malaivijitnond S, Takenaka O, Urasopon N, Hadi I, Hamada Y. 2004. Hybridization between a released pigtail male and semi-wild rhesus females in northern Thailand resolved by TSPY gene analysis. (*submitted to Heredity*) (เอกสารแนบหมายเลข 1)

2. Yuzuru Hamada, Islamul Hadi, Nontakorn Urasopon, Suchinda Malaivijitnond. 2004. Morphometry and pelage color of free-ranging rhesus macaques in northern Thailand: Are they rhesus (*Macaca mulatta*) or hybrids? (*submitted to Primates*) (เอกสารแนบหมายเลข 2)

6.2. บทความในรายงานการประชุมวิชาการ (Proceedings)

-Suchinda Malaivijitnond, Nontakorn Urasopon, Kwanta Tansa, Yuzuru Hamada. 2546. Biodiversity of macaque monkeys in Thailand. การประชุมวิชาการ "ชมรมนักสัตววิทยา โครงการ BRT ครั้งที่ 1. Biodiversity and Biogeography" ระหว่างวันที่ 14-15 มิถุนายน 2546 (เอกสารแนบหมายเลข 3)

-Yuzuru Hamada, Nontakorn Urasopon, Kwanta Tansa, Hadi Islamul, Kanya Kawin, Suchinda Malaivijitnond. 2003. Morphological characteristics of free-ranging macaques in northern Thailand. The 57th Conference of the Anthropological Society of Japan. Hokkaido, Japan, 3-5 October 2003. (เอกสารแนบหมายเลข 4)

-Suchinda Malaivijitnond, Osamu Takenaka, Yuzuru Hamada. 2004. The present status of Thai macaques from wide view. In Mini-Symposium "Current Topics in Animal Biodiversity", 13 February 2004, Faculty of Science, Chulalongkorn University, pp.8-11.

-Suchinda Malaivijitnond, Jessada Denduangboripant, Osamu Takenaka, Yuzuru Hamada. 2004. Biodiversity of macaque monkeys in Thailand. Proceedings of the Fifth Congress of AOSCE in Conjunction with the Annual Meeting of JSCE, 26-30 March 2004, Nara, Japan, pp.64-66. (เอกสารแนบหมายเลข 5)

-Yuzuru Hamada, Islamul Hadi, Nontakorn Urasopon, Suchinda Malaivijitnond. 2004. Phylogeographical study on the rhesus macaque (*Macaca mulatta*) distributing Indochinese peninsula-I. Conference of Mammalogy Society, Nagoya, Japan.

7. กิจกรรมอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้อง

7.1. การได้รับเชิญไปเป็นวิทยากรในต่างประเทศ

-ได้รับเชิญให้บรรยายเรื่อง "The study of macaque monkeys in Thailand" ณ Laboratory of Veterinary Physiology, Department of Veterinary Medicine, Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology, Japan ในวันที่ 28 ตุลาคม 2545

-ได้รับเชิญให้บรรยายเรื่อง "Biodiversity of macaque monkeys in Thailand" ณ Faculty of Agriculture, Gifu University, Gifu, Japan ในวันอังคารที่ 16 มีนาคม 2547

-ได้รับเชิญให้บรรยายเรื่อง "Biodiversity of macaque monkeys in Thailand" ณ Primate Research Institute, Kyoto University, Japan, ในวันที่ 10 พฤษภาคม 2547

-ได้รับเชิญให้บรรยายเรื่อง "Hybridization and genetic variation of rhesus macaques in northern Thailand." ณ Department of Cellular and Molecular Biology, Primate Research Institute, Kyoto University, Japan, ในวันที่ 17 พฤษภาคม 2547

7.2. การสัมภาษณ์ออกรายการทางวิทยุ

-ได้รับเชิญไปเป็นวิทยากรทางวิทยุในรายการ "สารสนทนา" ทางสถานีวิทยุจุฬาฯ FM 101.5 MHz ออกอากาศในวันเสาร์เวลา 13.00 – 13.30 น. ในหัวข้อเรื่อง "การผสมข้ามพันธ์และความแตกต่างแปรผันทางพันธุกรรมของลิงวอก ณ วัดถ้ำผาหมากฮ่อ จ.เลย" ในวันพุธที่ 11 มิถุนายน 2546

-ได้รับเชิญไปเป็นวิทยากรทางวิทยุในรายการ "ทันโลกวิทยาศาสตร์" ทางสถานีวิทยุ อส. พระราชวังดุสิต FM 104 MHz และ AM 1332 KHz ออกอากาศทุกวันพุธเว้นพุธ ระหว่างเวลา 18.00 – 18.30 น. ในหัวข้อเรื่อง "การศึกษาการแพร่กระจายและลักษณะประชากรของลิงวอกในประเทศไทย" ในวันพุธที่ 10 สิงหาคม 2546

7.3. การประชาสัมพันธ์ผลงานวิจัยทางสื่ออื่น ๆ

-ประชาสัมพันธ์และเผยแพร่ผลงานวิจัยในวารสาร "ข่าวคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย" ปีที่ 26 ฉบับที่ 4 เดือนพฤษภาคม 2546 หน้า 2 (เอกสารแนบหมายเลข 6)

-ประชาสัมพันธ์และเผยแพร่ผลงานวิจัยในวารสาร "จุฬาสัมพันธ์" ปีที่ 46 ฉบับที่ 33 วันจันทร์ที่ 1 กันยายน 2546 หน้า 2 (เอกสารแนบหมายเลข 7)

-ประชาสัมพันธ์และเผยแพร่ผลงานวิจัยในหนังสือพิมพ์ "The Nation" ในหัวข้อเรื่อง "Last wild rhesus studied" ในวันที่ 8 กันยายน 2546 (เอกสารแนบหมายเลข 8)

-ประชาสัมพันธ์และเผยแพร่ผลงานวิจัยในหนังสือพิมพ์ "มติชน" ในหัวข้อเรื่อง "หวั่นลิงวอกฝูงสุดท้ายในไทยกลายพันธุ์" ในวันที่ 11 กันยายน 2546 หน้าที่ 21 (เอกสารแนบหมายเลข 9)

-ประชาสัมพันธ์และเผยแพร่ผลงานวิจัยในหนังสือพิมพ์ "Bangkok Post" ในวันที่ 22 กันยายน 2546 ส่วน outlook (เอกสารแนบหมายเลข 10)

-ประชาสัมพันธ์และเผยแพร่ผลงานวิจัยในหนังสือพิมพ์ "โพสต์ทูเดย์" ในหัวข้อเรื่อง "ลิงวอกฝูงสุดท้าย" ในวันที่ 4 มกราคม 2547 (เอกสารแนบหมายเลข 11)

-ประชาสัมพันธ์และเผยแพร่ผลงานวิจัยในหนังสือพิมพ์ "ผู้จัดการ" ในวันที่ 21 มกราคม 2547 (เอกสารแนบหมายเลข 12)

-ประชาสัมพันธ์และเผยแพร่ผลงานวิจัยในหนังสือพิมพ์ "ไทยรัฐ" หมวดข่าววิทยาการ ในวันที่ 22 มกราคม 2547 (เอกสารแนบหมายเลข 13)

-ประชาสัมพันธ์และเผยแพร่ผลงานวิจัยในหนังสือพิมพ์ "บ้านเมือง" ในวันที่ 22 มกราคม 2547 (เอกสารแนบหมายเลข 14)

-ประชาสัมพันธ์และเผยแพร่ผลงานวิจัยในหนังสือพิมพ์ "แนวหน้า" ในวันที่ 26 มกราคม 2547 (เอกสารแนบหมายเลข 15)

-ประชาสัมพันธ์และเผยแพร่ผลงานวิจัยใน "รายงานการวิจัยของสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.)" (เอกสารแนบหมายเลข 16)

-สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ได้จัดทำ web site http://pr.trf.or.th/news/Question.asp?GID=43 เกี่ยวกับลิงลูกผสมระหว่างลิงวอกเพศเมียและลิงกังเพศผู้ ผลงานจากโครงการวิจัย "การผสมข้ามพันธุ์และความแตกต่างแปรผันทางพันธุกรรมของลิงวอก (*Macaca mulatta*) ณ วัดถ้ำผาหมากฮ่อ จ. เลย"

8. การเชื่อมโยงทางวิชาการกับนักวิชาการอื่น ๆ ทั้งในและต่างประเทศ

-ได้เชิญนิสิตปริญญาโท จาก Department of Biology, Borgor Agricultural University ประเทศอินโดนีเซีย ที่กำลังทำวิทยานิพนธ์เรื่อง Socioecology of color-blind long-tailed macaques at Pagandaran National Park มาร่วมทำการศึกษาเกี่ยวกับ Socioecology ของลิงวอก ณ วัดถ้ำผาหมากฮ่อฝูงนี้ด้วย

-ได้ติดต่อและไปทำการเก็บข้อมูลต่าง ๆ เช่น morphometrics, dermatoglyphics และสีขน และเจาะเก็บเลือดลิงวอกสายพันธุ์แท้จากอินเดียและจีนที่เลี้ยงอยู่ที่ Primate Research Institute มหาวิทยาลัยเกียวโต โดยความร่วมมือกับ Associate Professor Dr. Yuzuru Hamada, Section of Morphology, Department of Evolution and Phylogeny และ Professor Dr. Osamu Takenaka, Department of Cellular and Molecular Biology ในระหว่างวันที่ 30 กันยายน – 9 พฤศจิกายน 2546 และ 1 – 31 เมษายน 2547 เพื่อนำข้อมูลที่ได้มาเปรียบเทียบกับลิงวอก ณ วัดถ้ำผาหมากฮ่อ

9. ปัญหาและอุปสรรค

-เนื่องจากในการศึกษาลิงในภาคสนาม (capture-and-release field work) จำต้องใช้คนจำนวนมาก (ประมาณ 10 คนขึ้นไป) และต้องอาศัยความร่วมมือจากนักวิจัยต่างชาติในการตรวจวัดทางสัณฐานวิทยา (morphometrics, pelage color, age estimation from dental formula) ดังนั้นการที่จะให้บุคลากรทุกคนมีเวลาว่างพร้อมกันจึงค่อนข้างยาก และใน

การศึกษาในภาคสนามแต่ละครั้งจะใช้เวลานานหลายวันติดต่อกัน ซึ่งช่วงเวลาที่บุคลากรทุกคนมีเวลาว่างพร้อมกันคือประมาณเดือนกันยายน-ตุลาคม และเดือนมีนาคม-พฤษภาคม ซึ่งเป็นช่วงปิดเทอม แต่เนื่องจากลิงวอกวัดถ้ำผาหมากฮ่ออาศัยอยู่บนเขาและการวาง trap จะวางที่เชิงเขา นั่นคือต้องล่อให้ลิงลงมาจากเขาโดยใช้อาหารล่อ ซึ่งช่วงฤดูกาลที่ลิงมักจะลงจากเขามาหาอาหาร คือ ฤดูแล้ง นั่นคือระหว่างเดือน มีนาคม-พฤษภาคม ดังนั้นช่วงเวลาที่เหมาะสมที่สุดในการจับลิงจึงสั้นลง นั่นคืออยู่ในช่วงระหว่างเดือนมีนาคม-พฤษภาคม เท่านั้น จึงทำให้แผนงานในการจับลิงที่ได้วางไว้ล่าช้ากว่ากำหนด

-เนื่องจากพบลักษณะภายนอกของลูกลิงวอก ณ วัดถ้ำผาหมากฮ่อจำนวนมากกว่า 5 ตัว ในวันที่ 1 กันยายน 2546 ที่มีลักษณะผสมระหว่างลิงกังและลิงวอก ดังนั้นเพื่อที่จะตอบคำถามที่ว่าลูกลิงดังกล่าวเป็นลูกผสมระหว่างลิงกังเพศผู้และลิงวอกเพศเมียหรือไม่ ในระดับดีเอนเอ จึงต้องมีการเจาะเก็บเลือดลิงกังและลิงวอกสายพันธุ์แท้ที่รู้เชื้อสายที่ชัดเจนมาทำการศึกษาเปรียบเทียบ ดังนั้นจึงต้องเดินทางไปเจาะเก็บเลือดลิงดังกล่าว ณ Primate Research Institute มหาวิทยาลัยเกียวโต ซึ่งไม่ได้เขียนงบประมาณไว้ในโครงการวิจัย จึงต้องนำเงินทุนส่วนตัวมาใช้จ่าย

10. ความเห็นและข้อเสนอแนะ

-ทาง BRT ควรจะมีการพิจารณาให้ทุนสนับสนุนในส่วนค่าเดินทางให้แก่นักวิจัยชาวต่างชาติ เช่น นักวิจัยชาวญี่ปุ่นที่เข้ามาช่วยทำการวิจัยในครั้งนี้ เนื่องจากงานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยที่จำเป็นต้องขอความช่วยเหลือจากนักวิจัยชาวต่างชาติอย่างยิ่ง เพราะขณะนี้ประเทศไทยยังมีผู้เชี่ยวชาญทางด้านนี้น้อยมาก ทำให้โครงการวิจัยนี้ต้องใช้เงินทุนส่วนตัวเพื่อเป็นค่าใช้จ่ายในการเชิญนักวิจัยชาวญี่ปุ่นและอินโดนีเซียมาร่วมทำวิจัย ซึ่งการเชิญนักวิจัยชาวต่างชาติเข้ามาร่วมทำวิจัยดังกล่าวนอกจากจะทำให้งานวิจัยก้าวหน้าไปอย่างรวดเร็วแล้ว นักวิจัยไทยยังได้รับการถ่ายทอดความรู้ทางด้านวานรวิทยาจากนักวิจัยชาวต่างชาตินั้น ๆ อีกด้วย

APPENDIX

1. ตารางแม็ตทริกซ์ข้อมูลลำดับลำดับนิวคลิโอไทด์ของไมโตคอนเดรียลดีเอนเอจำนวน 477 คู่เบส จากดีเอ็นเอจำนวน 59 ตัวอย่างซึ่งเป็นของ 1) ลิงวอกจากวัดถ้ำผาหมากฮ่อ (MmulWTPMH) จำนวน 32 ตัวอย่าง 2)ลิงวอกจากอุทยานแห่งชาติภูเขียว จังหวัดชัยภูมิ (MmulPRU)1 ตัวอย่าง 3) ลิงวอกจากสวนสัตว์เชียงใหม่ (MmulPRI) จำนวน 6 ตัวอย่าง 4) ลิงวอกจากประเทศจีน (MmulCN) จำนวน 7 ตัวอย่าง 8) ลิงวอกจากประเทศอินเดีย (MmulID) จำนวน 3 ตัวอย่าง 9) ลิงหางยาวจากจังหวัดนครสวรรค์ (MfasKN) จำนวน 5 ตัวอย่าง และ10) ลิงหางยาวจากจังหวัดสงขลา (MfasKN-KTK) จำนวน 4 ตัวอย่าง โดยมีตัวอย่างดีเอ็นเอของลิง Barbary (Msyl) (Arnason *et al.*, 2000) เป็น out-group

out-group

```
                    ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                           10         20         30         40         50         60
Msyl                ???CCATGCA TTTGGTATCT TTTATCTCTG GTCTGCACGC AAACCCCATC GCAGTATGCT
MmulID460           ???CCATGCA TTTGGTATCT TTTATCTCTG GTCTGCACGC AA-CCCCATC GCAGAATGCT
MmulID464           ???CCATGCA TTTGGTATCT TTTATCTCTG GTCTGCACGC AA-CCCCATC GCAGAATGCT
MmulID466           ?????????? ??TGGTATCT TTTATCTCTG GTCTGCACGC AA-CCCCATT GCAGAATGCT
MmulCN562           ????CATGCA TTTGGTATCT TTTATCTCTG GTCTGCACGC AA-CCCCATC GCAGAATGCT
MmulCN564           ???????GCA TTTGGTATCT TTTATCTCTG GTCTGCACGC AA-CCCCATT GCAGAATGCT
MmulCN566           ?????????? ??TGGTATCT TTTATCTCTG GTCTGCACGC AA-CCCCATT GCAGAATGCT
MmulCN567           ?????????? ??TGGTATCT TTTATCTCTG GTCTGCACGC AA-CCCCATT GCAGAATGCT
MmulCN568           ?????????? ??TGGTATCT TTTATCTCTG GTCTGCACGC AA-CCCCATC GCAGAATGCT
MmulCN560           ????CATGCA TTTGGTATCT TTTATCTCTG GTCTGCACGC AA-CCCCATC GCAGAATGCT
MmulCN561           ????CATGCA TTTGGTATCT TTTATCTCTG GTCTGCACGC AA-CCCCATC GCAGAATGCT
MmulPRI1990         ???????GCA TTTGGTATCT TTTATCTCTG GTCTGCACGC AA-CCCCATC GCAGAATGCT
MmulPRI1993         ???????GCA TTTGGTATCT TTTATCTCTG GTCTGCACGC AA-CCCCATC GCAGAATGCT
MmulPRI1994         ???????GCA TTTGGTATCT TTTATCTCTG GTCTGCACGC AA-CCCCATT GCAGAATGCT
MmulPRI1995         ???????GCA TTTGGTATCT TTTATCTCTG GTCTGCACGC AA-CCCCATC GCAGAATGCT
MMulPRI1996         ???????GCA TTTGGTATCT TTTATCTCTG GTCTGCACGC AA-CCCCATC GCAGAATGCT
MmulPRI1997         ???????GCA TTTGGTATCT TTTATCTCTG GTCTGCACGC AA-CCCCATC GCAGAATGCT
MmulPRU             ???????GCA TTTGGTATCT TTTATCTCTG GTCTGCACGC AA-CCCCATC GCAGAATGCT
MmulWTPMH241        ???CCATGCA TTTGGTATCT TTTATCTCTG GTCTGCACGC AA-CCCCATC GCAGAATGCT
MmulWTPMH242        ???CCATGCA TTTGGTATCT TTTATCTCTG GTCTGCACGC AA-CCCCATC GCAGAATGCT
MmulWTPMH243        ???CCATGCA TTTGGTATCT TTTATCTCTG GTCTGCACGC AA-CCCCATC GCAGAATGCT
MmulWTPMH244        ???CCATGCA TTTGGTATCT TTTATCTCTG GTCTGCACGC AA-CCCCATC GCAGAATGCT
MmulWTPMH245        ???CCATGCA TTTGGTATCT TTTATCTCTG GTCTGCACGC AA-CCCCATC GCAGAATGCT
MmulWTPMH247        ???CCATGCA TTTGGTATCT TTTATCTCTG GTCTGCACGC AA-CCCCATC GCAGAATGCT
MmulWTPMH248        ???CCATGCA TTTGGTATCT TTTATCTCTG GTCTGCACGC AA-CCCCATC GCAGAATGCT
MmulWTPMH249        ???CCATGCA TTTGGTATCT TTTATCTCTG GTCTGCACGC AA-CCCCATC GCAGAATGCT
MmulWTPMH250        ???CCATGCA TTTGGTATCT TTTATCTCTG GTCTGCACGC AA-CCCCATC GCAGAATGCT
MmulWTPMH251        ???CCATGCA TTTGGTATCT TTTATCTCTG GTCTGCACGC AA-CCCCATC GCAGAATGCT
MmulWTPMH252        ???CCATGCA TTTGGTATCT TTTATCTCTG GTCTGCACGC AA-CCCCATC GCAGAATGCT
MmulWTPMH253        ???CCATGCA TTTGGTATCT TTTATCTCTG GTCTGCACGC AA-CCCCATC GCAGAATGCT
MmulWTPMH254        ???CCATGCA TTTGGTATCT TTTATCTCTG GTCTGCACGC AA-CCCCATC GCAGAATGCT
MmulWTPMH255        ???CCATGCA TTTGGTATCT TTTATCTCTG GTCTGCACGC AA-CCCCATC GCAGAATGCT
MmulWTPMH256        ???CCATGCA TTTGGTATCT TTTATCTCTG GTCTGCACGC AA-CCCCATC GCAGAATGCT
MmulWTPMH257        ???CCATGCA TTTGGTATCT TTTATCTCTG GTCTGCACGC AA-CCCCATC GCAGAATGCT
MmulWTPMH258        ???CCATGCA TTTGGTATCT TTTATCTCTG GTCTGCACGC AA-CCCCATC GCAGAATGCT
MmulWTPMH259        ???CCATGCA TTTGGTATCT TTTATCTCTG GTCTGCACGC AA-CCCCATC GCAGAATGCT
MmulWTPMH260        ???CCATGCA TTTGGTATCT TTTATCTCTG GTCTGCACGC AA-CCCCATC GCAGAATGCT
MmulWTPMH261        ???CCATGCA TTTGGTATCT TTTATCTCTG GTCTGCACGC AA-CCCCATC GCAGAATGCT
MmulWTPMH262        ???CCATGCA TTTGGTATCT TTTATCTCTG GTCTGCACGC AA-CCCCATC GCAGAATGCT
MmulWTPMH263        ???CCATGCA TTTGGTATCT TTTATCTCTG GTCTGCACGC AA-CCCCATC GCAGAATGCT
MmulWTPMH264        ???CCATGCA TTTGGTATCT TTTATCTCTG GTCTGCACGC AA-CCCCATC GCAGAATGCT
MmulWTPMH265        ???CCATGCA TTTGGTATCT TTTATCTCTG GTCTGCACGC AA-CCCCATC GCAGAATGCT
MmulWTPMH266        ???CCATGCA TTTGGTATCT TTTATCTCTG GTCTGCACGC AA-CCCCATC GCAGAATGCT
MmulWTPMH267        ???CCATGCA TTTGGTATCT TTTATCTCTG GTCTGCACGC AA-CCCCATC GCAGAATGCT
MmulWTPMH268        ???CCATGCA TTTGGTATCT TTTATCTCTG GTCTGCACGC AA-CCCCATC GCAGAATGCT
MmulWTPMH269        ???CCATGCA TTTGGTATCT TTTATCTCTG GTCTGCACGC AA-CCCCATC GCAGAATGCT
MmulWTPMH270        ???CCATGCA TTTGGTATCT TTTATCTCTG GTCTGCACGC AA-CCCCATC GCAGAATGCT
MmulWTPMH271        ???CCATGCA TTTGGTATCT TTTATCTCTG GTCTGCACGC AA-CCCCATC GCAGAATGCT
MmulWTPMH272        ???CCATGCA TTTGGTATCT TTTATCTCTG GTCTGCACGC AA-CCCCATC GCAGAATGCT
MmulWTPMH273        ???CCATGCA TTTGGTATCT TTTATCTCTG GTCTGCACGC AA-CCCCATC GCAGAATGCT
MfasKN76            ???????GCA TTTGGTATCT TTTATCTCTG GTCTGCACGC AA-CCCCATC GCAGAATGCT
MfasKN78            ???????GCA TTTGGTATCT TTTATCTCTG GTCTGCACGC AA-CCCCATC GCAGAATGCT
MfasKN79            ???????GCA TTTGGTATCT TTTATCTCTG GTCTGCACGC AA-CCCCATC GCAGAATGCT
MfasKN80            ???????GCA TTTGGTATCT TTTATCTCTG GTCTGCACGC AA-CCCCATC GCAGAATGCT
MfasKN85            ???????GCA TTTGGTATCT TTTATCTCTG GTCTGCACGC AA-CCCCATC GCAGAATGCT
MfasKN-KTK615all    TTTCCATGCA TTTGGTATCT TTTATCTCTG GTCTGCACGC AA-CCCCATT GCAGTATGCT
MfasKN-KTK616all    TTTCCATGCA TTTGGTATCT TTTATCTCTG GTCTGCACGC AA-CCCCATT GCAGTATGCT
MfasKN-KTK617all    ?????ATGCA TTTGGTATCT TTTATCTCTG GTCTGCACGC AA-CCCCATT GCAGTATGCT
MfasKN-KTK618all    ????CATGCA TTTGGTATCT TTTATCTCTG GTCTGCACGC AA-CCCCATT GCAGTATGCT
```

	....|....|	....|....|	....|....|	....|....|	....|....|	....|....|
	70	80	90	100	110	120
Msyl	GACTCCCACC	ACATCTCGTC	CTGAATGCGC	CTGTCTTTGA	TTCCTAGTAC	ATGCAGTTAT
MmulID460	GACTCCCACC	ACATCCCGTC	CTGTATGCGC	CTGTCTTTGA	TCCCTAGTAC	ATGCAGTTAT
MmulID464	GACTCCCACC	ACATCCCGTC	CTGTATGCGC	CTGTCTTTGA	TTCCTAGTAC	ATGCAGTTAT
MmulID466	GACTCCCACC	ACATCCCGTC	CTGTATGCGC	CTGTCTTTGA	TTCCTAGTAC	ATGCAGTTGT
MmulCN562	GACTCCCACC	ACATCCCGTC	CTGTATGCGC	CTGTCTTTGA	TTCCTAGTAC	ATGCAGTTGT
MmulCN564	GACTCCCACC	ACATCTCGTC	CTGTATGCGC	CTGTCTTTGA	TTCCTAGTAC	ATGCAGTTGT
MmulCN566	GACTCCCACC	ACATCTCGTC	CTGTATGCGC	CTGTCTTTGA	TTCCTAGTAC	ATGCAGTTGT
MmulCN567	GACTCCCACC	ACATCTCGTC	CTGTATGCGC	CTGTCTTTGA	TTCCTAGTAC	ATGCAGTTGT
MmulCN568	GACTCCCACC	ACATCCCGTC	CTGTATGCGC	CTGTCTTTGA	TTCCTAGTAC	ATGCAGTTGT
MmulCN560	GACTCCCACC	ACATCCCGTC	CTGTATGCGC	CTGTCTTTGA	TTCCTAGTAC	ATGCAGTTGT
MmulCN561	GACTCCCACC	ACATCCCGTC	CTGTATGCGC	CTGTCTTTGA	TTCCTAGTAC	ATGCAGTTGT
MmulPRI1990	GACTCCCACC	ACAACCCGTC	CTGTATGCGC	CTGTCTTTGA	TTCCTAGTAC	ATGCAGTTAT
MmulPRI1993	GACTCCCACC	ACAACCCGTC	CTGTATGCGC	CTGTCTTTGA	TTCCTAGTAC	ATGCAGTTAT
MmulPRI1994	GACTCCCACC	ACAACCCGTC	CTGTATGCGC	CTGTCTTTGA	TTCCTAGTAC	ATGCAGTTAT
MmulPRI1995	GACTCCCACC	ACATCCCGTC	CTGTATGCGC	CTGTCTTTGA	TTCCTAGTAC	ATGCAGTTGT
MMulPRI1996	GACTCCCACC	ACATCCCGTC	CTGTATGCGC	CTGTCTTTGA	TTCCTAGTAC	ATGCAGTTGT
MmulPRI1997	GACTCCCACC	ACAACCCGTC	CTGTATGCGC	CTGTCTTTGA	TTCCTAGTAC	ATGCAGTTAT
MmulPRU	GACTCCCACC	ACATCCCGTC	CTGTATGCGC	CTGTCTTTGA	TTCCTAGTAC	ATGCAGTTAT
MmulWTPMH241	GACTCCCACC	ACATCCCGTC	CTGTATGCGC	CTGTCTTTGA	TTCCTAGTAC	ATGCAATTAT
MmulWTPMH242	GACTCCCACC	ACATCCCGTC	CTGTATGCGC	CTGTCTTTGA	TTCCTAGTAC	ATGCAGTTAT
MmulWTPMH243	GACTCCCACC	ACATCCCGTC	CTGTATGCGC	CTGTCTTTGA	TTCCTAGTAC	ATGCAGTTAT
MmulWTPMH244	GACTCCCACC	ACATCCCGTC	CTGTATGCGC	CTGTCTTTGA	TTCCTAGTAC	ATGCAATTAT
MmulWTPMH245	GACTCCCACC	ACATCCCGTC	CTGTATGCGC	CTGTCTTTGA	TTCCTAGTAC	ATGCAATTAT
MmulWTPMH247	GACTCCCACC	ACATCCCGTC	CTGTATGCGC	CTGTCTTTGA	TTCCTAGTAC	ATGCAGTTAT
MmulWTPMH248	GACTCCCACC	ACATCCCGTC	CTGTATGCGC	CTGTCTTTGA	TTCCTAGTAC	ATGCAATTAT
MmulWTPMH249	GACTCCCACC	ACATCCCGTC	CTGTATGCGC	CTGTCTTTGA	TTCCTAGTAC	ATGCAGTTAT
MmulWTPMH250	GACTCCCACC	ACATCCCGTC	CTGTATGCGC	CTGTCTTTGA	TTCCTAGTAC	ATGCAATTAT
MmulWTPMH251	GACTCCCACC	ACATCCCGTC	CTGTATGCGC	CTGTCTTTGA	TTCCTAGTAC	ATGCAGTTAT
MmulWTPMH252	GACTCCCACC	ACATCCCGTC	CTGTATGCGC	CTGTCTTTGA	TTCCTAGTAC	ATGCAATTAT
MmulWTPMH253	GACTCCCACC	ACATCCCGTC	CTGTATGCGC	CTGTCTTTGA	TTCCTAGTAC	ATGCAGTTAT
MmulWTPMH254	GACTCCCACC	ACATCCCGTC	CTGTATGCGC	CTGTCTTTGA	TTCCTAGTAC	ATGCAGTTAT
MmulWTPMH255	GACTCCCACC	ACATCCCGTC	CTGTATGCGC	CTGTCTTTGA	TTCCTAGTAC	ATGCAGTTAT
MmulWTPMH256	GACTCCCACC	ACATCCCGTC	CTGTATGCGC	CTGTCTTTGA	TTCCTAGTAC	ATGCAATTAT
MmulWTPMH257	GACTCCCACC	ACATCCCGTC	CTGTATGCGC	CTGTCTTTGA	TTCCTAGTAC	ATGCAATTAT
MmulWTPMH258	GACTCCCACC	ACATCCCGTC	CTGTATGCGC	CTGTCTTTGA	TTCCTAGTAC	ATGCAGTTAT
MmulWTPMH259	GACTCCCACC	ACATCCCGTC	CTGTATGCGC	CTGTCTTTGA	TTCCTAGTAC	ATGCAGTTAT
MmulWTPMH260	GACTCCCACC	ACATCCCGTC	CTGTATGCGC	CTGTCTTTGA	TTCCTAGTAC	ATGCAGTTAT
MmulWTPMH261	GACTCCCACC	ACATCCCGTC	CTGTATGCGC	CTGTCTTTGA	TTCCTAGTAC	ATGCAATTAT
MmulWTPMH262	GACTCCCACC	ACATCCCGTC	CTGTATGCGC	CTGTCTTTGA	TTCCTAGTAC	ATGCAATTAT
MmulWTPMH263	GACTCCCACC	ACATCCCGTC	CTGTATGCGC	CTGTCTTTGA	TTCCTAGTAC	ATGCAATTAT
MmulWTPMH264	GACTCCCACC	ACATCCCGTC	CTGTATGCGC	CTGTCTTTGA	TTCCTAGTAC	ATGCAATTAT
MmulWTPMH265	GACTCCCACC	ACATCCCGTC	CTGTATGCGC	CTGTCTTTGA	TTCCTAGTAC	ATGCAATTAT
MmulWTPMH266	GACTCCCACC	ACATCCCGTC	CTGTATGCGC	CTGTCTTTGA	TTCCTAGTAC	ATGCAGTTAT
MmulWTPMH267	GACTCCCACC	ACATCCCGTC	CTGTATGCGC	CTGTCTTTGA	TTCCTAGTAC	ATGCAATTAT
MmulWTPMH268	GACTCCCACC	ACATCCCGTC	CTGTATGCGC	CTGTCTTTGA	TTCCTAGTAC	ATGCAATTAT
MmulWTPMH269	GACTCCCACC	ACATCCCGTC	CTGTATGCGC	CTGTCTTTGA	TTCCTAGTAC	ATGCAATTAT
MmulWTPMH270	GACTCCCACC	ACATCCCGTC	CTGTATGCGC	CTGTCTTTGA	TTCCTAGTAC	ATGCAGTTAT
MmulWTPMH271	GACTCCCACC	ACATCCCGTC	CTGTATGCGC	CTGTCTTTGA	TTCCTAGTAC	ATGCAATTAT
MmulWTPMH272	GACTCCCACC	ACATCCCGTC	CTGTATGCGC	CTGTCTTTGA	TTCCTAGTAC	ATGCAGTTAT
MmulWTPMH273	GACTCCCACC	ACATCCCGTC	CTGTATGCGC	CTGTCTTTGA	TTCCTAGTAC	ATGCAATTAT
MfasKN76	GACTCCCACC	ACATCCCGTC	CTGTATGCGC	CTGTCTTTGA	TCCCTAGTAC	ATGCAGTTAT
MfasKN78	GACTCCCACC	ACATCCCGTC	CTGTATGCGC	CTGTCTTTGA	TCCCTAGTAC	ATGCAGTTAT
MfasKN79	GACTCCCACC	ACATCCCGTC	CTGTATGCGC	CTGTCTTTGA	TCCCTAGTAC	ATGCAGTTAT
MfasKN80	GACTCCCACC	ACATCCCGTC	CTGTATGCGC	CTGTCTTTGA	TCCCTAGTAC	ATGCAGTTAT
MfasKN85	GACTCCCACC	ACATCCCGTC	CTGTATGCGC	CTGTCTTTGA	TCCCTAGTAC	ATGCAGTTAT
MfasKN-KTK615all	GACTCCCACC	ACATCCCGTC	CTGAATGCGC	CTGTCTTTGA	TTCCTAGTAC	ATGCAGTTAT
MfasKN-KTK616all	GACTCCCACC	ACATCCCGTC	CTGAATGCGC	CTGTCTTTGA	TTCCTAGTAC	ATGCAGTTAT
MfasKN-KTK617all	GACTCCCACC	ACATCCCGTC	CTGAATGCGC	CTGTCTTTGA	TTCCTAGTAC	ATGCAGTTAT
MfasKN-KTK618all	GACTCCCACC	ACATCCCGTC	CTGAATGCGC	CTGTCTTTGA	TTCCTAGTAC	ATGCAGTTAT

```
                    ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                           130        140        150        160        170        180
Msyl                TAATCGCACC TACG-TTCAA TATTCTAGCT CCACACGGAC TTCAGCAATG TGTTATTTAA
MmulID460           TGATCGCACC TACG-TTCAA TATTCTAGCT CCACGCAAAC TTCAGCAAGG TGTTATTTAA
MmulID464           TAATCGCACC TACGGTTCAA TATTCTAGCT CCACGCAAAC TTTAGCAGGG TGTTATTTAA
MmulID466           TGATCGCACC TACG-TTCAA TATTCTAGCT CCACGCAGAC TTTAGCAAGG TGTTATTTAA
MmulCN562           TGATCGCACC TACG-TTCAA TATTCTAGCT CCACGCAAAC CTTAGCAAGG TGTTATTTAA
MmulCN564           TGATCGCACC TACG-TTCAA TATTCTAGCT CCACGCAAAC CTTAGCAAGG TGTTATTTAA
MmulCN566           TGATCGCACC TACG-TTCAA TATTCTAGCT CCACGCAAAC CTTAGCAAGG TGTTATTTAA
MmulCN567           TGATCGCACC TACG-TTCAA TATTCTAGCT CCACGCAAAC CTTAGCAAGG TGTTATTTAA
MmulCN568           TGATCGCACC TACG-TTCAA TATTCTAGCT CCACGCAAAC CTTAGCAAGG TGTTATTTAA
MmulCN560           TGATCGCACC TACG-TTCAA TATTCTAGCT CCACGCAAAC CTTAGCAAGG TGTTATTTAA
MmulCN561           TGATCGCACC TACG-TTCAA TATTCTAGCT CCACGCAAAC CTTAGCAAGG TGTTATTTAA
MmulPRI1990         TGATCGCACC TACG-TTCAA TATTCTAGCT CCACGCAAAC CTTAGCAAGG TGTTATTTAA
MmulPRI1993         TGATCGCACC TACG-TTCAA TATTCTAGCT CCACGCAAAC CTTAGCAAGG TGTTATTTAA
MmulPRI1994         TGATCGCACC TACG-TTCAA TATTCTAGCT CCACGCAAAC CTTAGCAAGG TGTTATTTAA
MmulPRI1995         TGATCGCACC TACG-TTCAA TATTCTAGCT CCACGCAAAC TCTAACAAGG TGTTATTTAA
MMulPRI1996         TGATCGCACC TACG-TTCAA TATTCTAGCT CCACGCAAAC TCTAACAAGG TGTTATTTAA
MmulPRI1997         TGATCGCACC TACG-TTCAA TATTCTAGCT CCACGCAAAC CTTAGCAAGG TGTTATTTAA
MmulPRU             TAATCGCACC TATGGTTCAA TATTCTAGCT CCACGCAAAC TTTAGCAGGG TGTTATTTAA
MmulWTPMH241        TAATCGCACC TATGGTCCAA TATTCTAGCT CCACGCAAAC TTTAGCAGGG TGTTATTTAA
MmulWTPMH242        TAATCGCACC TACGGTTCAA TATTCTAGCT CCACGCAAAC TTTAGCAGGG TGTTATTTAA
MmulWTPMH243        TAATCGCACC TACGGTTCAA TATTCTAGCT CCACGCAAAC TTTAGCAGGG TGTTATTTAA
MmulWTPMH244        TAATCGCACC TATGGTCCAA TATTCTAGCT CCACGCAAAC TTTAGCAGGG TGTTATTTAA
MmulWTPMH245        TAATCGCACC TATGGTCCAA TATTCTAGCT CCACGCAAAC TTTAGCAGGG TGTTATTTAA
MmulWTPMH247        TAATCGCACC TACGGTTCAA TATTCTAGCT CCACGCAAAC TTTAGCAGGG TGTTATTTAA
MmulWTPMH248        TAATCGCACC TATGGTCCAA TATTCTAGCT CCACGCAAAC TTTAGCAGGG TGTTATTTAA
MmulWTPMH249        TAATCGCACC TACGGTTCAA TATTCTAGCT CCACGCAAAC TTTAGCAGGG TGTTATTTAA
MmulWTPMH250        TAATCGCACC TATGGTCCAA TATTCTAGCT CCACGCAAAC TTTAGCAGGG TGTTATTTAA
MmulWTPMH251        TAATCGCACC TACGGTTCAA TATTCTAGCT CCACGCAAAC TTTAGCAGGG TGTTATTTAA
MmulWTPMH252        TAATCGCACC TATGGTCCAA TATTCTAGCT CCACGCAAAC TTTAGCAGGG TGTTATTTAA
MmulWTPMH253        TAATCGCACC TACGGTTCAA TATTCTAGCT CCACGCAAAC TTTAGCAGGG TGTTATTTAA
MmulWTPMH254        TAATCGCACC TACGGTTCAA TATTCTAGCT CCACGCAAAC TTTAGCAGGG TGTTATTTAA
MmulWTPMH255        TAATCGCACC TACGGTTCAA TATTCTAGCT CCACGCAAAC TTTAGCAGGG TGTTATTTAA
MmulWTPMH256        TAATCGCACC TATGGTCCAA TATTCTAGCT CCACGCAAAC TTTAGCAGGG TGTTATTTAA
MmulWTPMH257        TAATCGCACC TATGGTCCAA TATTCTAGCT CCACGCAAAC TTTAGCAGGG TGTTATTTAA
MmulWTPMH258        TAATCGCACC TACGGTTCAA TATTCTAGCT CCACGCAAAC TTTAGCAGGG TGTTATTTAA
MmulWTPMH259        TAATCGCACC TACGGTTCAA TATTCTAGCT CCACGCAAAC TTTAGCAGGG TGTTATTTAA
MmulWTPMH260        TAATCGCACC TACGGTTCAA TATTCTAGCT CCACGCAAAC TTTAGCAGGG TGTTATTTAA
MmulWTPMH261        TAATCGCACC TATGGTCCAA TATTCTAGCT CCACGCAAAC TTTAGCAGGG TGTTATTTAA
MmulWTPMH262        TAATCGCACC TATGGTCCAA TATTCTAGCT CCACGCAAAC TTTAGCAGGG TGTTATTTAA
MmulWTPMH263        TAATCGCACC TATGGTCCAA TATTCTAGCT CCACGCAAAC TTTAGCAGGG TGTTATTTAA
MmulWTPMH264        TAATCGCACC TATGGTCCAA TATTCTAGCT CCACGCAAAC TTTAGCAGGG TGTTATTTAA
MmulWTPMH265        TAATCGCACC TATGGTCCAA TATTCTAGCT CCACGCAAAC TTTAGCAGGG TGTTATTTAA
MmulWTPMH266        TAATCGCACC TACGGTTCAA TATTCTAGCT CCACGCAAAC TTTAGCAGGG TGTTATTTAA
MmulWTPMH267        TAATCGCACC TATGGTCCAA TATTCTAGCT CCACGCAAAC TTTAGCAGGG TGTTATTTAA
MmulWTPMH268        TAATCGCACC TATGGTCCAA TATTCTAGCT CCACGCAAAC TTTAGCAGGG TGTTATTTAA
MmulWTPMH269        TAATCGCACC TATGGTCCAA TATTCTAGCT CCACGCAAAC TTTAGCAGGG TGTTATTTAA
MmulWTPMH270        TAATCGCACC TACGGTTCAA TATTCTAGCT CCACGCAAAC TTTAGCAGGG TGTTATTTAA
MmulWTPMH271        TAATCGCACC TATGGTCCAA TATTCTAGCT CCACGCAAAC TTTAGCAGGG TGTTATTTAA
MmulWTPMH272        TAATCGCACC TACGGTTCAA TATTCTAGCT CCACGCAAAC TTTAGCAGGG TGTTATTTAA
MmulWTPMH273        TAATCGCACC TATGGTCCAA TATTCTAGCT CCACGCAAAC TTTAGCAGGG TGTTATTTAA
MfasKN76            TAATCGCACC TACGGTTCAA TATTCTAGCT CCACACAAAC CTTAGCAGGG TGTTATTTAA
MfasKN78            TAATCGCACC TACGGTTCAA TATTCTAGCT CCACACAAAC CTTAGCAGGG TGTTATTTAA
MfasKN79            TAATCGCACC TACGGTTCAA TATTCTAGCT CCACACAAAC CTTAGCAGGG TGTTATTTAA
MfasKN80            TAATCGCACC TACGGTTCAA TATTCTAGCT CCACACAAAC CTTAGCAGGG TGTTATTTAA
MfasKN85            TAATCGCACC TACGGTTCAA TATTCTAGCT CCACACAAAC CTTAGCAGGG TGTTATTTAA
MfasKN-KTK615all    TGATCGCACC TACG-TTCAA TATTCTAGCT CCACGCAAAC CTTAGCAGGG TGTTATTTAA
MfasKN-KTK616all    TGATCGCACC TACG-TTCAA TATTCTAGCT CCACGCAAAC CTTAGCAGGG TGTTATTTAA
MfasKN-KTK617all    TGATCGCACC TACG-TTCAA TATTCTAGCT CCACGCAAAC CTTAGCAGGG TGTTATTTAA
MfasKN-KTK618all    TGATCGCACC TACG-TTCAA TATTCTAGCT CCACGCAAAC CTTAGCAGGG TGTTATTTAA
```

	190	200	210	220	230	240
Msyl	TTCATGCTTG	TAGGACATAC	CAATTAACCA	ACCCAAC-AA	-------CAC	CACCCCCGCC
MmulID460	TTCATGCTTG	TAGGACATAT	TAAT-AATCA	TTCCAACCAA	CACCACACCA	CACCACACCA
MmulID464	TTCATGCTTG	TAGGACATAC	CAAT-AATTA	TTTCAGCCAA	------ATAC	CATTCTCATC
MmulID466	TTCATGCTTG	TAGGACATAT	TAAT-AACCA	TTCCAACCAA	-------CAT	CGCCCACACC
MmulCN562	TTCATGCTTG	TAGGACATAC	CAAT-AACCA	TTCCAGCCAA	----------	------CACC
MmulCN564	TTCATGCTTG	TAGGACATAC	CAAT-AACCA	CTCCAACCAA	----------	------CACC
MmulCN566	TTCATGCTTG	TAGGACATAC	CAAT-AACCA	CTCCAACCAA	----------	------CACC
MmulCN567	TTCATGCTTG	TAGGACATAC	CAAT-AACCA	CTCCAACCAA	----------	------CACC
MmulCN568	TTCATGCTTG	TAGGACATAC	CAAT-AACCA	TTCCAGCCAA	----------	------CACC
MmulCN560	TTCATGCTTG	TAGGACATAC	CAAT-AACCA	TTCCAGCCAA	----------	------CACC
MmulCN561	TTCATGCTTG	TAGGACATAC	CAAT-AACCA	TTCCAGCCAA	----------	------CACC
MmulPRI1990	TTCATGCTTG	TAGGACATAT	TAAT-AACCA	TTCCAACCAA	-------CAT	CACCCACACC
MmulPRI1993	TTCATGCTTG	TAGGACATAT	TAAT-AACCA	TTCCAACCAA	-------CAT	CACCCACACC
MmulPRI1994	TTCATGCTTG	TAGGACATAT	TAAT-AACCA	TTCCAACCAA	-------CAT	CACCCACACC
MmulPRI1995	TTCATGCTTG	TAGGACATAT	TAAT-AACCA	TTCCAACCAA	-------TAT	CACCCACACC
MMulPRI1996	TTCATGCTTG	TAGGACATAT	TAAT-AACCA	TTCCAGCCAA	-------TAT	CACCCACACC
MmulPRI1997	TTCATGCTTG	TAGGACATAT	TAAT-AACCA	TTCCAACCAA	-------CAT	CACCCACACC
MmulPRU	TTCATGCTTG	TAGGACATAC	CAAT-AATTA	TTTCAGCCAA	------ATAC	CATTCTCGTC
MmulWTPMH241	TTCATGCTTG	TAGGACATAC	CAAT-AATTA	TCTCAGCCAA	------ATAC	CATTCTCATC
MmulWTPMH242	TTCATGCTTG	TAGGACATAC	CAAT-AATTA	TTTCAGCCAA	------ATAC	CATTCTCATC
MmulWTPMH243	TTCATGCTTG	TAGGACATAC	CAAT-AATTA	TTTCAGCCAA	------ATAC	CATTCTCATC
MmulWTPMH244	TTCATGCTTG	TAGGACATAC	CAAT-AATTA	TCTCAGCCAA	------ATAC	CATTCTCATC
MmulWTPMH245	TTCATGCTTG	TAGGACATAC	CAAT-AATTA	TCTCAGCCAA	------ATAC	CATTCTCATC
MmulWTPMH247	TTCATGCTTG	TAGGACATAC	CAAT-AATTA	TTTCAGCCAA	------ATAC	CATTCTCATC
MmulWTPMH248	TTCATGCTTG	TAGGACATAC	CAAT-AATTA	TCTCAGCCAA	------ATAC	CATTCTCATC
MmulWTPMH249	TTCATGCTTG	TAGGACATAC	CAAT-AATTA	TTTCAGCCAA	------ATAC	CATTCTCATC
MmulWTPMH250	TTCATGCTTG	TAGGACATAC	CAAT-AATTA	TCTCAGCCAA	------ATAC	CATTCTCATC
MmulWTPMH251	TTCATGCTTG	TAGGACATAC	CAAT-AATTA	TTTCAGCCAA	------ATAC	CATTCTCATC
MmulWTPMH252	TTCATGCTTG	TAGGACATAC	CAAT-AATTA	TCTCAGCCAA	------ATAC	CATTCTCATC
MmulWTPMH253	TTCATGCTTG	TAGGACATAC	CAAT-AATTA	TTTCAGCCAA	------ATAC	CATTCTCATC
MmulWTPMH254	TTCATGCTTG	TAGGACATAC	CAAT-AATTA	TTTCAGCCAA	------ATAC	CATTCTCATC
MmulWTPMH255	TTCATGCTTG	TAGGACATAC	CAAT-AATTA	TTTCAGCCAA	------ATAC	CATTCTCATC
MmulWTPMH256	TTCATGCTTG	TAGGACATAC	CAAT-AATTA	TCTCAGCCAA	------ATAC	CATTCTCATC
MmulWTPMH257	TTCATGCTTG	TAGGACATAC	CAAT-AATTA	TCTCAGCCAA	------ATAC	CATTCTCATC
MmulWTPMH258	TTCATGCTTG	TAGGACATAC	CAAT-AATTA	TTTCAGCCAA	------ATAC	CATTCTCATC
MmulWTPMH259	TTCATGCTTG	TAGGACATAC	CAAT-AATTA	TTTCAGCCAA	------ATAC	CATTCTCATC
MmulWTPMH260	TTCATGCTTG	TAGGACATAC	CAAT-AATTA	TTTCAGCCAA	------ATAC	CATTCTCATC
MmulWTPMH261	TTCATGCTTG	TAGGACATAC	CAAT-AATTA	TCTCAGCCAA	------ATAC	CATTCTCATC
MmulWTPMH262	TTCATGCTTG	TAGGACATAC	CAAT-AATTA	TCTCAGCCAA	------ATAC	CATTCTCATC
MmulWTPMH263	TTCATGCTTG	TAGGACATAC	CAAT-AATTA	TCTCAGCCAA	------ATAC	CATTCTCATC
MmulWTPMH264	TTCATGCTTG	TAGGACATAC	CAAT-AATTA	TCTCAGCCAA	------ATAC	CATTCTCATC
MmulWTPMH265	TTCATGCTTG	TAGGACATAC	CAAT-AATTA	TCTCAGCCAA	------ATAC	CATTCTCATC
MmulWTPMH266	TTCATGCTTG	TAGGACATAC	CAAT-AATTA	TTTCAGCCAA	------ATAC	CATTCTCATC
MmulWTPMH267	TTCATGCTTG	TAGGACATAC	CAAT-AATTA	TCTCAGCCAA	------ATAC	CATTCTCATC
MmulWTPMH268	TTCATGCTTG	TAGGACATAC	CAAT-AATTA	TCTCAGCCAA	------ATAC	CATTCTCATC
MmulWTPMH269	TTCATGCTTG	TAGGACATAC	CAAT-AATTA	TCTCAGCCAA	------ATAC	CATTCTCATC
MmulWTPMH270	TTCATGCTTG	TAGGACATAC	CAAT-AATTA	TTTCAGCCAA	------ATAC	CATTCTCATC
MmulWTPMH271	TTCATGCTTG	TAGGACATAC	CAAT-AATTA	TCTCAGCCAA	------ATAC	CATTCTCATC
MmulWTPMH272	TTCATGCTTG	TAGGACATAC	CAAT-AATTA	TTTCAGCCAA	------ATAC	CATTCTCATC
MmulWTPMH273	TTCATGCTTG	TAGGACATAC	CAAT-AATTA	TCTCAGCCAA	------ATAC	CATTCTCATC
MfasKN76	TTCATGCTTG	TAGGACATAC	CAAT-AATTA	TTTCAGCCAA	------ATAC	CATTCTCGTC
MfasKN78	TTCATGCTTG	TAGGACATAC	CAAT-AATTA	TTTCAGCCAA	------ATAC	CATTCTCGTC
MfasKN79	TTCATGCTTG	TAGGACATAC	CAAT-AATTA	TTTCAGCCAA	------ATAC	CATTCTCGTC
MfasKN80	TTCATGCTTG	TAGGACATAC	CAAT-AATTA	TTTCAGCCAA	------ATAC	CATTCTCGTC
MfasKN85	TTCATGCTTG	TAGGACATAC	CAAT-AATTA	TTTCAGCCAA	------ATAC	CATTCTCGTC
MfasKN-KTK615all	TTCATGCTTG	TAGGACATAC	TAAT-AATTA	TCTTAACCAA	------ATAC	CATTCCTACC
MfasKN-KTK616all	TTCATGCTTG	TAGGACATAC	TAAT-AATTA	TCTTAACCAA	------ATAC	CATTCCTACC
MfasKN-KTK617all	TTCATGCTTG	TAGGACATAC	TAAT-AATTA	TCTTAACCAA	------ATAC	CATTCCTACC
MfasKN-KTK618all	TTCATGCTTG	TAGGACATAC	TAAT-AATTA	TCTTAACCAA	------ATAC	CATTCCTACC

```
                    ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                           250        260        270        280        290        300
Msyl                ATACCA-CAA A-CCACGAT- AAATCTCATC AAACCCCCCC GACCCCCATC ---TCTGACC
MmulID460           CAACCA-TTA A-CCACAACC GTGTCTTATC AAACCCCCCC -ACCCCCATC ---TCCGACC
MmulID464           GTGTCAATCA AACCACAACC ATACCTCGTC AAACCCCCCC -ACCCCCATC ---TCCGATC
MmulID466           ACACCA-CCA A-CCACAACC GTGTCTTATC AAACCCCCCC -ACCCCCATC ---TCCGACC
MmulCN562           ACACCA-CTA A-TCACAACC GTGTCTTGTC AAACCCCCCC -ACCCCCATC ATCTCCGACC
MmulCN564           ACACCA-CTA A-CCACAACC GTGTCTTATC AAACCCCCCC -ACCCCCATC ---TCCGACC
MmulCN566           ACACCA-CTA A-CCACAACC GTGTCTTATC AAACCCCCCC -ACCCCCATC ---TCCGACC
MmulCN567           ACACCA-CTA A-CCACAACC GTGTCTTATC AAACCCCCCC -ACCCCCATC ---TCCGACC
MmulCN568           ACACCA-CTA A-TCACAACC GTGTCTTGTC AAACCCCCCC -ACCCCCATC ATCTCCGACC
MmulCN560           ACACCA-CTA A-TCACAACC GTGTCTTGTC AAACCCCCCC -ACCCCCATC ATCTCCGACC
MmulCN561           ACACCA-CTA A-TCACAACC GTGTCTTGTC AAACCCCCCC -ACCCCCATC ATCTCCGACC
MmulPRI1990         ACACCA-TTA A-CCACAACC GTGTCTTATC AAACCCCCCC -ACCCCCATC ---TCCGACC
MmulPRI1993         ACACCA-TTA A-CCACAACC GTGTCTTATC AAACCCCCCC -ACCCCCATC ---TCCGACC
MmulPRI1994         ACACCA-TTA A-CCACAACC GTGTCTTATC AAACCCCCCC -ACCCCCATC ---TCCGACC
MmulPRI1995         ACGCCA-TTA A-CCACAACC GTATCTTATC AAACCCCCCC -ACCCCCATC ---TCTGACC
MMulPRI1996         ACGCCA-TTA A-CCACAACC GTATCTTATC AAACCCCCCC -ACCCCCATC ---TCTGACC
MmulPRI1997         ACACCA-TTA A-CCACAACC GTGTCTTATC AAACCCCCCC -ACCCCCATC ---TCCGACC
MmulPRU             ATGTCAATCA AACCACAACC ACACCTCGTC AAACCCCCCC -ACCCCCATC ---TCCGACC
MmulWTPMH241        ATGTCAATCA AACCACAACC ACACCTCGTC AAACCCCCCC -ACCCCCATC ---TCCGACC
MmulWTPMH242        GTGTCAATCA AACCACAACC ATATCTCATC AAACCCCCCC -ACCCCCATC ---TCCGACC
MmulWTPMH243        GTGTCAATCA AACCACAACC ATATCTCATC AAACCCCCCC -ACCCCCATC ---TCCGACC
MmulWTPMH244        ATGTCAATCA AACCACAACC ACACCTCGTC AAACCCCCCC -ACCCCCATC ---TCCGACC
MmulWTPMH245        ATGTCAATCA AACCACAACC ACACCTCGTC AAACCCCCCC -ACCCCCATC ---TCCGACC
MmulWTPMH247        GTGTCAATCA AACCACAACC ATATCTCATC AAACCCCCCC -ACCCCCATC ---TCCGACC
MmulWTPMH248        ATGTCAATCA AACCACAACC ACACCTCGTC AAACCCCCCC -ACCCCCATC ---TCCGACC
MmulWTPMH249        GTGTCAATCA AACCACAACC ATATCTCATC AAACCCCCCC -ACCCCCATC ---TCCGACC
MmulWTPMH250        ATGTCAATCA AACCACAACC ACACCTCGTC AAACCCCCCC -ACCCCCATC ---TCCGACC
MmulWTPMH251        GTGTCAATCA AACCACAACC ATATCTCATC AAACCCCCCC -ACCCCCATC ---TCCGACC
MmulWTPMH252        ATGTCAATCA AACCACAACC ACACCTCGTC AAACCCCCCC -ACCCCCATC ---TCCGACC
MmulWTPMH253        GTGTCAATCA AACCACAACC ATATCTCATC AAACCCCCCC -ACCCCCATC ---TCCGACC
MmulWTPMH254        GTGTCAATCA AACCACAACC ATATCTCATC AAACCCCCCC -ACCCCCATC ---TCCGACC
MmulWTPMH255        GTGTCAATCA AACCACAACC ATATCTCATC AAACCCCCCC -ACCCCCATC ---TCCGACC
MmulWTPMH256        ATGTCAATCA AACCACAACC ACACCTCGTC AAACCCCCCC -ACCCCCATC ---TCCGACC
MmulWTPMH257        ATGTCAATCA AACCACAACC ACACCTCGTC AAACCCCCCC -ACCCCCATC ---TCCGACC
MmulWTPMH258        GTGTCAATCA AACCACAACC ATATCTCATC AAACCCCCCC -ACCCCCATC ---TCCGACC
MmulWTPMH259        GTGTCAATCA AACCACAACC ATATCTCATC AAACCCCCCC -ACCCCCATC ---TCCGACC
MmulWTPMH260        GTGTCAATCA AACCACAACC ATATCTCATC AAACCCCCCC -ACCCCCATC ---TCCGACC
MmulWTPMH261        ATGTCAATCA AACCACAACC ACACCTCGTC AAACCCCCCC -ACCCCCATC ---TCCGACC
MmulWTPMH262        ATGTCAATCA AACCACAACC ACACCTCGTC AAACCCCCCC -ACCCCCATC ---TCCGACC
MmulWTPMH263        ATGTCAATCA AACCACAACC ACACCTCGTC AAACCCCCCC -ACCCCCATC ---TCCGACC
MmulWTPMH264        ATGTCAATCA AACCACAACC ACACCTCGTC AAACCCCCCC -ACCCCCATC ---TCCGACC
MmulWTPMH265        ATGTCAATCA AACCACAACC ACACCTCGTC AAACCCCCCC -ACCCCCATC ---TCCGACC
MmulWTPMH266        GTGTCAATCA AACCACAACC ATATCTCATC AAACCCCCCC -ACCCCCATC ---TCCGACC
MmulWTPMH267        ATGTCAATCA AACCACAACC ACACCTCGTC AAACCCCCCC -ACCCCCATC ---TCCGACC
MmulWTPMH268        ATGTCAATCA AACCACAACC ACACCTCGTC AAACCCCCCC -ACCCCCATC ---TCCGACC
MmulWTPMH269        ATGTCAATCA AACCACAACC ACACCTCGTC AAACCCCCCC -ACCCCCATC ---TCCGACC
MmulWTPMH270        GTGTCAATCA AACCACAACC ATATCTCATC AAACCCCCCC -ACCCCCATC ---TCCGACC
MmulWTPMH271        ATGTCAATCA AACCACAACC ACACCTCGTC AAACCCCCCC -ACCCCCATC ---TCCGACC
MmulWTPMH272        GTGTCAATCA AACCACAACC ATATCTCATC AAACCCCCCC -ACCCCCATC ---TCCGACC
MmulWTPMH273        ATGTCAATCA AACCACAACC ACACCTCGTC AAACCCCCCC -ACCCCCATC ---TCCGACC
MfasKN76            GTGTCAATCA AACCACAACC ACACCTCGTC AAACCCCCCC -ACCCCCATC ---TCCGACC
MfasKN78            GTGTCAATCA AACCACAACC ACACCTCGTC AAACCCCCCC -ACCCCCATC ---TCCGACC
MfasKN79            GTGTCAATCA AACCACAACC ACACCTCGTC AAACCCCCCC -ACCCCCATC ---TCCGACC
MfasKN80            GTGTCAATCA AACCACAACC ACACCTCGTC AAACCCCCCC -ACCCCCATC ---TCCGACC
MfasKN85            GTGTCAATCA AACCACAACC ACACCTCGTC AAACCCCCCC -ACCCCCATC ---TCCGACC
MfasKN-KTK615all    ACACCAAT-A AACCACAACC ATACCTCATC AAACCCCCCC -ACCCCCATC ---TCCGACC
MfasKN-KTK616all    ACACCAAT-A AACCACAACC ATACCTCATC AAACCCCCCC -ACCCCCATC ---TCCGACC
MfasKN-KTK617all    ACACCAAT-A AACCACAACC ATACCTCATC AAACCCCCCC -ACCCCCATC ---TCCGACC
MfasKN-KTK618all    ACACCAAT-A AACCACAACC ATACCTCATC AAACCCCCCC -ACCCCCATC ---TCCGACC
```

```
                     ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                           310        320        330        340        350        360
Msyl                 CCCATCCAAG A---CCCACT TTTGCCAAAC CCCAAAAACA AAAGTTTTAA TAT-ACCGGA
MmulID460            TTCATCCAAT A---CCCACT CTTGCCAAAA CCCAAAAACA AAAGTCTTAA CATGATCCGG
MmulID464            TTCATCCAAA AAACCCGACT CTTGCCAAAA CCCAAAAACA AAAGTCTTAA TAT-ATCCGA
MmulID466            TTCATCCAAA ----CCCACT CTTGCCAAAC CCCAAAAACA AAAGTCTTAA CAT-ATCCGG
MmulCN562            TTCATCCAAA ----CCCACT CTTGCCAAAC CCCAAAAACA AAAGTCTTAA CAT-ATCCGG
MmulCN564            TTCATCCAAA ----CCCACT CTTGCCAAAC CCCAAAAACA AAAGTCTTAA CAT-ATCCGG
MmulCN566            TTCATCCAAA ----CCCACT CTTGCCAAAC CCCAAAAACA AAAGTCTTAA CAT-ATCCGG
MmulCN567            TTCATCCAAA ----CCCACT CTTGCCAAAC CCCAAAAACA AAAGTCTTAA CAT-ATCCGG
MmulCN568            TTCATCCAAA ----CCCACT CTTGCCAAAC CCCAAAAACA AAAGTCTTAA CAT-ATCCGG
MmulCN560            TTCATCCAAA ----CCCACT CTTGCCAAAC CCCAAAAACA AAAGTCTTAA CAT-ATCCGG
MmulCN561            TTCATCCAAA ----CCCACT CTTGCCAAAC CCCAAAAACA AAAGTCTTAA CAT-ATCCGG
MmulPRI1990          TTCATCCAAA ----CCCACT CTTGCCAAAC CCCAAAAACA AAAGTCTTAA CAT-ATCCGG
MmulPRI1993          TTCATCCAAA ----CCCACT CTTGCCAAAC CCCAAAAACA AAAGTGTTAA CAT-ATCCGG
MmulPRI1994          TTCATCCAAA ----CCCACT CTTGCCAAAC CCCAAAAACA AAAGTCTTAA CAT-ATCCGG
MmulPRI1995          CTCATCCAAA ----CCCACT CTTGCCAAAC CCCAAAAACA AAAGTCTTAA CAT-ATCCGG
MMulPRI1996          CTCATCCAAA ----CCCACT CTTGCCAAAC CCCAAAAACA AAAGTCTTAA CAT-ATCCGG
MmulPRI1997          TTCATCCAAA ----CCCACT CTTGCCAAAC CCCAAAAACA AAAGTCTTAA CAT-ATCCGG
MmulPRU              TTCATCCAAA AAA-CCCACT CTTGCCAAAC CCCAAAAACA AAAGTCTTAA TAT-ATCCGA
MmulWTPMH241         TTCATCCAAA AAA-CCCACT CTTGCCAAAC CCCAAAAACA AAAGTCTTAA TAT-ATCCGA
MmulWTPMH242         TTCATCCAAA AAA-CCCACT CTTGCCAAAC CCCAAAAACA AAAGTCTTAA TAT-ATCCGA
MmulWTPMH243         TTCATCCAAA AAA-CCCACT CTTGCCAAAC CCCAAAAACA AAAGTCTTAA TAT-ATCCGA
MmulWTPMH244         TTCATCCAAA AAA-CCCACT CTTGCCAAAC CCCAAAAACA AAAGTCTTAA TAT-ATCCGA
MmulWTPMH245         TTCATCCAAA AAA-CCCACT CTTGCCAAAC CCCAAAAACA AAAGTCTTAA TAT-ATCCGA
MmulWTPMH247         TTCATCCAAA AAA-CCCACT CTTGCCAAAC CCCAAAAACA AAAGTCTTAA TAT-ATCCGA
MmulWTPMH248         TTCATCCAAA AAA-CCCACT CTTGCCAAAC CCCAAAAACA AAAGTCTTAA TAT-ATCCGA
MmulWTPMH249         TTCATCCAAA AAA-CCCACT CTTGCCAAAC CCCAAAAACA AAAGTCTTAA TAT-ATCCGA
MmulWTPMH250         TTCATCCAAA AAA-CCCACT CTTGCCAAAC CCCAAAAACA AAAGTCTTAA TAT-ATCCGA
MmulWTPMH251         TTCATCCAAA AAA-CCCACT CTTGCCAAAC CCCAAAAACA AAAGTCTTAA TAT-ATCCGA
MmulWTPMH252         TTCATCCAAA AAA-CCCACT CTTGCCAAAC CCCAAAAACA AAAGTCTTAA TAT-ATCCGA
MmulWTPMH253         TTCATCCAAA AAA-CCCACT CTTGCCAAAC CCCAAAAACA AAAGTCTTAA TAT-ATCCGA
MmulWTPMH254         TTCATCCAAA AAA-CCCACT CTTGCCAAAC CCCAAAAACA AAAGTCTTAA TAT-ATCCGA
MmulWTPMH255         TTCATCCAAA AAA-CCCACT CTTGCCAAAC CCCAAAAACA AAAGTCTTAA TAT-ATCCGA
MmulWTPMH256         TTCATCCAAA AAA-CCCACT CTTGCCAAAC CCCAAAAACA AAAGTCTTAA TAT-ATCCGA
MmulWTPMH257         TTCATCCAAA AAA-CCCACT CTTGCCAAAC CCCAAAAACA AAAGTCTTAA TAT-ATCCGA
MmulWTPMH258         TTCATCCAAA AAA-CCCACT CTTGCCAAAC CCCAAAAACA AAAGTCTTAA TAT-ATCCGA
MmulWTPMH259         TTCATCCAAA AAA-CCCACT CTTGCCAAAC CCCAAAAACA AAAGTCTTAA TAT-ATCCGA
MmulWTPMH260         TTCATCCAAA AAA-CCCACT CTTGCCAAAC CCCAAAAACA AAAGTCTTAA TAT-ATCCGA
MmulWTPMH261         TTCATCCAAA AAA-CCCACT CTTGCCAAAC CCCAAAAACA AAAGTCTTAA TAT-ATCCGA
MmulWTPMH262         TTCATCCAAA AAA-CCCACT CTTGCCAAAC CCCAAAAACA AAAGTCTTAA TAT-ATCCGA
MmulWTPMH263         TTCATCCAAA AAA-CCCACT CTTGCCAAAC CCCAAAAACA AAAGTCTTAA TAT-ATCCGA
MmulWTPMH264         TTCATCCAAA AAA-CCCACT CTTGCCAAAC CCCAAAAACA AAAGTCTTAA TAT-ATCCGA
MmulWTPMH265         TTCATCCAAA AAA-CCCACT CTTGCCAAAC CCCAAAAACA AAAGTCTTAA TAT-ATCCGA
MmulWTPMH266         TTCATCCAAA AAA-CCCACT CTTGCCAAAC CCCAAAAACA AAAGTCTTAA TAT-ATCCGA
MmulWTPMH267         TTCATCCAAA AAA-CCCACT CTTGCCAAAC CCCAAAAACA AAAGTCTTAA TAT-ATCCGA
MmulWTPMH268         TTCATCCAAA AAA-CCCACT CTTGCCAAAC CCCAAAAACA AAAGTCTTAA TAT-ATCCGA
MmulWTPMH269         TTCATCCAAA AAA-CCCACT CTTGCCAAAC CCCAAAAACA AAAGTCTTAA TAT-ATCCGA
MmulWTPMH270         TTCATCCAAA AAA-CCCACT CTTGCCAAAC CCCAAAAACA AAAGTCTTAA TAT-ATCCGA
MmulWTPMH271         TTCATCCAAA AAA-CCCACT CTTGCCAAAC CCCAAAAACA AAAGTCTTAA TAT-ATCCGA
MmulWTPMH272         TTCATCCAAA AAA-CCCACT CTTGCCAAAC CCCAAAAACA AAAGTCTTAA TAT-ATCCGA
MmulWTPMH273         TTCATCCAAA AAA-CCCACT CTTGCCAAAC CCCAAAAACA AAAGTCTTAA TAT-ATCCGA
MfasKN76             TTCATCCAAA AAA-CCCACT CTTGCCAAAC CCCAAAAACA AAAGTCTTAA TAT-ATCCGA
MfasKN78             TTCATCCAAA AAA-CCCACT CTTGCCAAAC CCCAAAAACA AAAGTCTTAA TAT-ATCCGA
MfasKN79             TTCATCCAAA AAA-CCCACT CTTGCCAAAC CCCAAAAACA AAAGTCTTAA TAT-ATCCGA
MfasKN80             TTCATCCAAA AAA-CCCACT CTTGCCAAAC CCCAAAAACA AAAGTCTTAA TAT-ATCCGA
MfasKN85             TTCATCCAAA AAA-CCCACT CTTGCCAAAC CCCAAAAACA AAAGTCTTAA TAT-ATCCGA
MfasKN-KTK615all     TTCATCCAAA A---CCCACT CTTGCCAAAC CCCAAAAACA AAAGTCTTAA TAT-ATCCGA
MfasKN-KTK616all     TTCATCCAAA A---CCCACT CTTGCCAAAC CCCAAAAACA AAAGTCTTAA TAT-ATCCGA
MfasKN-KTK617all     TTCATCCAAA A---CCCACT CTTGCCAAAC CCCAAAAACA AAAGTCTTAA TAT-ATCCGA
MfasKN-KTK618all     TTCATCCAAA A---CCCACT CTTGCCAAAC CCCAAAAACA AAAGTCTTAA TAT-ATCCGA
```

```
                     ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                           370        380        390        400        410        420
Msyl                 TCAGAGCTTG TATTTTCATC TTTT-AGGTG TGCACAACCC C-AACTGCCA TTCTCTCAAC
MmulID460            TCAGAGCCCA TATTTTTATC TTTTTGGGTG TGCACAACTC C-AACTGCCA TTCCCTCAAC
MmulID464            TCAGAGCTCG CATTTTTATC TTTTGGGGTG TACATAACTC CCAACTGCCA TTCTCTCAAC
MmulID466            TCAGAGCCCA TATTTTTATC TTTT-GGGTG TACACAACTC C-AACTGCCA TTCCCTCAAC
MmulCN562            TCAGAGCCCA TATTTTTATC TTTTAGGGTG TACACAACTC C-AACTGCCA TTCTCTCAAC
MmulCN564            ?????????? ?????????? ?????????? ?????????? ?????????? ??????????
MmulCN566            TCAGAGCCCA TATTTTTATC TTT-AGGGTG TACACAACTC C-AACTGCCA TTCCCTCAAC
MmulCN567            TCAGAGCCCA TATTTTTATC TTT-AGGGTG TACACAACTC C-AACTGCCA TTCCCTCAAC
MmulCN568            TCAGAGCCCA TATTTTTATC TTT-AGGGTG TACACAACTC C-AACTGCCA TTCTCTCAAC
MmulCN560            TCAGAGCCCA TATTTTTATC TTTTAGGGTG TACACAACTC C-AACTGCCA TTCTCTCAAC
MmulCN561            TCAGAGCCCA TATTTTTATC TTTTAGGGTG TACACAACTC C-AACTGCCA TTCTCTCAAC
MmulPRI1990          TCAGAGCCCA TATTTTTATC TTTT-AGGTG TACACAACTC C-AACTGC-A TTCCCTCAA?
MmulPRI1993          TCAGAGCCCA TATTTTTATC TTTT-AGGTG TACACAACTC C-AACTGC-A TTCCCTCAAC
MmulPRI1994          TCAGAGCCCA TATTTTTATC TTTT-AGGTG TACACAACTC C-AACTGC-A TTCCCTCAAC
MmulPRI1995          TCAGAGCCTA TATTTTTATC TTTT-GGGTG TGCACAACTC C-AACTGC-A TTCCCTCAAC
MMulPRI1996          TCAGAGCCTA TATTTTTATC TTTT-GGGTG TACACAACTC C-AACTGC-A TTCCCTCAAC
MmulPRI1997          TCAGAGCCCA TATTTTTATC TTTT-AGGTG TACACAACTC C-AACTGC-A TTCCCTCAAC
MmulPRU              TCAGAGCTCG CATTTTTATC TTTT-GGGTG TACATAACTC C-AACTGCCA TTCTCTCAAC
MmulWTPMH241         TCAGAGCTCG CGTTTTTATC TTTT-GGGTG TACATAACTC C-AACTGCCA TTCTCTCAAC
MmulWTPMH242         TCAGAGCTCG CATTTTTATC TTTT-GGGTG TACATAACTC C-AACTGCCA TTCTCTCAAC
MmulWTPMH243         TCAGAGCTCG CATTTTTATC TTTT-GGGTG TACATAACTC C-AACTGCCA TTCTCTCAAC
MmulWTPMH244         TCAGAGCTCG CGTTTTTATC TTTT-GGGTG TACATAACTC C-AACTGCCA TTCTCTCAAC
MmulWTPMH245         TCAGAGCTCG CGTTTTTATC TTTT-GGGTG TACATAACTC C-AACTGCCA TTCTCTCAAC
MmulWTPMH247         TCAGAGCTCG CATTTTTATC TTTT-GGGTG TACATAACTC C-AACTGCCA TTCTCTCAAC
MmulWTPMH248         TCAGAGCTCG CGTTTTTATC TTTT-GGGTG TACATAACTC C-AACTGCCA TTCTCTCAAC
MmulWTPMH249         TCAGAGCTCG CATTTTTATC TTTT-GGGTG TACATAACTC C-AACTGCCA TTCTCTCAAC
MmulWTPMH250         TCAGAGCTCG CGTTTTTATC TTTT-GGGTG TACATAACTC C-AACTGCCA TTCTCTCAAC
MmulWTPMH251         TCAGAGCTCG CATTTTTATC TTTT-GGGTG TACATAACTC C-AACTGCCA TTCTCTCAAC
MmulWTPMH252         TCAGAGCTCG CGTTTTTATC TTTT-GGGTG TACATAACTC C-AACTGCCA TTCTCTCAAC
MmulWTPMH253         TCAGAGCTCG CATTTTTATC TTTT-GGGTG TACATAACTC C-AACTGCCA TTCTCTCAAC
MmulWTPMH254         TCAGAGCTCG CATTTTTATC TTTT-GGGTG TACATAACTC C-AACTGCCA TTCTCTCAAC
MmulWTPMH255         TCAGAGCTCG CATTTTTATC TTTT-GGGTG TACATAACTC C-AACTGCCA TTCTCTCAAC
MmulWTPMH256         TCAGAGCTCG CGTTTTTATC TTTT-GGGTG TACATAACTC C-AACTGCCA TTCTCTCAAC
MmulWTPMH257         TCAGAGCTCG CGTTTTTATC TTTT-GGGTG TACATAACTC C-AACTGCCA TTCTCTCAAC
MmulWTPMH258         TCAGAGCTCG CATTTTTATC TTTT-GGGTG TACATAACTC C-AACTGCCA TTCTCTCAAC
MmulWTPMH259         TCAGAGCTCG CATTTTTATC TTTT-GGGTG TACATAACTC C-AACTGCCA TTCTCTCAAC
MmulWTPMH260         TCAGAGCTCG CATTTTTATC TTTT-GGGTG TACATAACTC C-AACTGCCA TTCTCTCAAC
MmulWTPMH261         TCAGAGCTCG CGTTTTTATC TTTT-GGGTG TACATAACTC C-AACTGCCA TTCTCTCAAC
MmulWTPMH262         TCAGAGCTCG CGTTTTTATC TTTT-GGGTG TACATAACTC C-AACTGCCA TTCTCTCAAC
MmulWTPMH263         TCAGAGCTCG CGTTTTTATC TTTT-GGGTG TACATAACTC C-AACTGCCA TTCTCTCAAC
MmulWTPMH264         TCAGAGCTCG CGTTTTTATC TTTT-GGGTG TACATAACTC C-AACTGCCA TTCTCTCAAC
MmulWTPMH265         TCAGAGCTCG CGTTTTTATC TTTT-GGGTG TACATAACTC C-AACTGCCA TTCTCTCAAC
MmulWTPMH266         TCAGAGCTCG CATTTTTATC TTTT-GGGTG TACATAACTC C-AACTGCCA TTCTCTCAAC
MmulWTPMH267         TCAGAGCTCG CGTTTTTATC TTTT-GGGTG TACATAACTC C-AACTGCCA TTCTCTCAAC
MmulWTPMH268         TCAGAGCTCG CGTTTTTATC TTTT-GGGTG TACATAACTC C-AACTGCCA TTCTCTCAAC
MmulWTPMH269         TCAGAGCTCG CGTTTTTATC TTTT-GGGTG TACATAACTC C-AACTGCCA TTCTCTCAAC
MmulWTPMH270         TCAGAGCTCG CATTTTTATC TTTT-GGGTG TACATAACTC C-AACTGCCA TTCTCTCAAC
MmulWTPMH271         TCAGAGCTCG CGTTTTTATC TTTT-GGGTG TACATAACTC C-AACTGCCA TTCTCTCAAC
MmulWTPMH272         TCAGAGCTCG CATTTTTATC TTTT-GGGTG TACATAACTC C-AACTGCCA TTCTCTCAAC
MmulWTPMH273         TCAGAGCTCG CGTTTTTATC TTTT-GGGTG TACATAACTC C-AACTGCCA TTCTCTCAAC
MfasKN76             TCAGAGCTCG CGTTTTTATC TTTT-GGGTG TACATAACTC C-AACTGCCA TTCTCTCAAC
MfasKN78             TCAGAGCTCG CGTTTTTATC TTTT-GGGTG TACATAACTC C-AACTGCCA TTCTCTCAAC
MfasKN79             TCAGAGCTCG CGTTTTTATC TTTT-GGGTG TACATAACTC C-AACTGCCA TTCTCTCAAC
MfasKN80             TCAGAGCTCG CGTTTTTATC TTTT-GGGTG TACATAACTC C-AACTGCCA TTCTCTCAAC
MfasKN85             TCAGAGCTCG CGTTTTTATC TTTT-GGGTG TACATAACTC C-AACTGCCA TTCTCTCAAC
MfasKN-KTK615all     TCAGAGCTTA CATTTTTATC TTTT-AGGTG TACACAACTC C-AACTGCCA TTCTCTCAAC
MfasKN-KTK616all     TCAGAGCTTA CATTTTTATC TTTT-AGGTG TACACAACTC C-AACTGCCA TTCTCTCAAC
MfasKN-KTK617all     TCAGAGCTTA CATTTTTATC TTTT-AGGTG TACACAACTC C-AACTGCCA TTCTCTCAAC
MfasKN-KTK618all     TCAGAGCTTA CATTTTTATC TTTT-AGGTG TACACAACTC C-AACTGCCA TTCTCTCAAC
```

```
                    ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|..
                           430        440        450        460        470
Msyl                TAAT-AAATA TTTACTT-CA CCAAA-CACT -CTTAACATC AACCCACAAC AAACCCC
MmulID460           TAAC-TTACA TTTACTTACA CCATA-CACC ATTTTACACC AACC-GCGCC ???????
MmulID464           TAACTAAATA TTTACTT-CA CTAAA-CACC -CCTTACACC AACC-GACAT ???????
MmulID466           TAAC-AAACA TTTACTT-CA CCAAA-CACC -CACTGCACC AACCCGCGAC AGATCCT
MmulCN562           TAAC-AAACA TTTACTT-CA CCAAA-CACC -CTCTACACC AACCCGCGAC AAATCCT
MmulCN564           ?????????? ?????????? ?????????? ?????????? ?????????? ???????
MmulCN566           TAAC-AAACA TTTACTT-CA CCAAA-CACC -CTCTACACC AACCCGCGAC AGACCCT
MmulCN567           TAAC-AAACA TTTACTT-CA CCAAAACACC -CTCTACACC AACCCGCGAC AGATCCT
MmulCN568           TAAC-AAACA TTTACTT-CA CCAAA-CACC -CTCTACACC AACCCGCGAC AAATCCT
MmulCN560           TAAC-AAACA TTTACTT-CA CCAAA-CACC -CTCTACACC AACCCGCGAC AAATCCT
MmulCN561           TAAC-AAACA TTTACTT-CA CCAAA-CACC -CTCTACACC AACCCGCGAC AAATCCT
MmulPRI1990         ?????????? ?????????? ?????????? ?????????? ?????????? ???????
MmulPRI1993         TAAC-AAACA TTTACTT-CA CCAAA-CACC -CTCTGCACC AACCCGCGAC AGATCC?
MmulPRI1994         TAAC-AAACA TTTACTT-CA CCAAA-CACC -CTCTGCACC AACCCGCGAC AGATCC?
MmulPRI1995         TAAC-AAACA TTTACTT-CA CCAAA-CACC -CTCTACACC AACCCGCGAC AAATCC?
MMulPRI1996         TAAC-AAACA TTTACTT-CA CCAAA-CACC -CTCTACACC AACCCGCGAC ???????
MmulPRI1997         TAAC-AAACA TTTACTT-CA CCAAA-CACC -CTCTGCACC AACCCGCGAC AGATCC?
MmulPRU             TAAC-AAATA TTTACTT-CA CTAAA-CACC -CCTTACACC AACCCACAAT AGACCCC
MmulWTPMH241        TAAC-AAGCA TTTACTT-CA CTAAA-CACC -CCTTACACC AACCCACAAC AGACCCC
MmulWTPMH242        TAAC-AAATA TTTACTT-CA CTAAA-CACC -CCTTACACC AACCCACAAT AGACCCC
MmulWTPMH243        TAAC-AAATA TTTACTT-CA CTAAA-CACC -CCTTACACC AACCCACAAT AGACCCC
MmulWTPMH244        TAAC-AAGCA TTTACTT-CA CTAAA-CACC -CCTTACACC AACCCACAAC AGACCCC
MmulWTPMH245        TAAC-AAGCA TTTACTT-CA CTAAA-CACC -CCTTACACC AACCCACAAC AGACCCC
MmulWTPMH247        TAAC-AAATA TTTACTT-CA CTAAA-CACC -CCTTACACC AACCCACAAT AGACCCC
MmulWTPMH248        TAAC-AAGCA TTTACTT-CA CTAAA-CACC -CCTTACACC AACCCACAAC AGACCCC
MmulWTPMH249        TAAC-AAATA TTTACTT-CA CTAAA-CACC -CCTTACACC AACCCACAAT AGACCCC
MmulWTPMH250        TAAC-AAGCA TTTACTT-CA CTAAA-CACC -CCTTACACC AACCCACAAC AGACCCC
MmulWTPMH251        TAAC-AAATA TTTACTT-CA CTAAA-CACC -CCTTACACC AACCCACAAT AGACCCC
MmulWTPMH252        TAAC-AAGCA TTTACTT-CA CTAAA-CACC -CCTTACACC AACCCACAAC AGACCCC
MmulWTPMH253        TAAC-AAATA TTTACTT-CA CTAAA-CACC -CCTTACACC AACCCACAAT AGACCCC
MmulWTPMH254        TAAC-AAATA TTTACTT-CA CTAAA-CACC -CCTTACACC AACCCACAAT AGACCCC
MmulWTPMH255        TAAC-AAATA TTTACTT-CA CTAAA-CACC -CCTTACACC AACCCACAAT AGACCCC
MmulWTPMH256        TAAC-AAGCA TTTACTT-CA CTAAA-CACC -CCTTACACC AACCCACAAC AGACCCC
MmulWTPMH257        TAAC-AAGCA TTTACTT-CA CTAAA-CACC -CCTTACACC AACCCACAAC AGACCCC
MmulWTPMH258        TAAC-AAATA TTTACTT-CA CTAAA-CACC -CCTTACACC AACCCACAAT AGACCCC
MmulWTPMH259        TAAC-AAATA TTTACTT-CA CTAAA-CACC -CCTTACACC AACCCACAAT AGACCCC
PMH260              TAAC-AAGCA TTTACTT-CA CTAAA-CACC -CCTTACACC AACCCACAAT AGACCCC
MmulWTPMH261        TAAC-AAGCA TTTACTT-CA CTAAA-CACC -CCTTACACC AACCCACAAC AGACCCC
MmulWTPMH262        TAAC-AAGCA TTTACTT-CA CTAAA-CACC -CCTTACACC AACCCACAAC AGACCCC
MmulWTPMH263        TAAC-AAGCA TTTACTT-CA CTAAA-CACC -CCTTACACC AACCCACAAC AGACCCC
MmulWTPMH264        TAAC-AAGCA TTTACTT-CA CTAAA-CACC -CCTTACACC AACCCACAAC AGACCCC
MmulWTPMH265        TAAC-AAGCA TTTACTT-CA CTAAA-CACC -CCTTACACC AACCCACAAC AGACCCC
MmulWTPMH266        TAAC-AAATA TTTACTT-CA CTAAA-CACC -CCTTACACC AACCCACAAT AGACCCC
MmulWTPMH267        TAAC-AAGCA TTTACTT-CA CTAAA-CACC -CCTTACACC AACCCACAAC AGACCCC
MmulWTPMH268        TAAC-AAGCA TTTACTT-CA CTAAA-CACC -CCTTACACC AACCCACAAC AGACCCC
MmulWTPMH269        TAAC-AAGCA TTTACTT-CA CTAAA-CACC -CCTTACACC AACCCACAAC AGACCCC
MmulWTPMH270        TAAC-AAATA TTTACTT-CA CTAAA-CACC -CCTTACACC AACCCACAAT AGACCCC
MmulWTPMH271        TAAC-AAGCA TTTACTT-CA CTAAA-CACC -CCTTACACC AACCCACAAC AGACCCC
MmulWTPMH272        TAAC-AAATA TTTACTT-CA CTAAA-CACC -CCTTACACC AACCCACAAT AGACCCC
MmulWTPMH273        TAAC-AAGCA TTTACTT-CA CTAAA-CACC -CCTTACACC AACCCACAAC AGACCCC
MfasKN76            TAACCAAACA TTTACTT-CA CTAAA-CACC ?????????? ?????????? ???????
MfasKN78            TAAC-AAACA TTTACTT-CA CTAAA-CACC ?????????? ?????????? ???????
MfasKN79            TAAC-AAACA TTTACTT-CA CTAAA-CACC ?????????? ?????????? ???????
MfasKN80            TAAC-AAACA TTTACTT-CA CTAAA-CAC? ?????????? ?????????? ???????
MfasKN85            TAAC-AAACA TTT??????? ?????????? ?????????? ?????????? ???????
MfasKN-KTK615all    TAAC-AAGCA TTTACTT-CA CTAAA-CACC -CTTTACACC AACCCACAAT AGACCCC
MfasKN-KTK616all    TAAC-AAGCA TTTACTT-CA CTAAA-CACC -CTTTACACC AACCCACAAT AGACCCC
MfasKN-KTK617all    TAAC-AAGCA TTTACTT-CA CTAAA-CACC -CTTTACACC AACCCACAAT AGACCCC
MfasKN-KTK618all    TAAC-AAGCA TTTACTT-CA CTAAA-CACC -CTTTACACC AACCCACAAT AGACCCC
```

2. ตารางแม็ตทริกซ์ข้อมูลลำดับลำดับนิวคลิโอไทด์ของ TSPY gene จำนวน 711 คู่เบส จากดีเอ็นเอจำนวน 10 ตัวอย่างของลิงวอกจากวัดถ้ำผาหมากฮ่อ (MmulWTPMH) และลิงลูกผสมหมายเลข 254 และ 259 และจำนวน 713 คู่เบส จากลิงกังวัดถ้ำผาหมากฮ่อจำนวน 1 ตัวอย่าง (Mnem246) ลิงวอกพม่า (MmulBurma), อินเดีย (MmulIndia) และจีน (MmulChina) อย่างละ 1 ตัวอย่าง และลิงหางยาว (MfasThai), ลิงกัง (MnemThai) และลิงเสน (MarcThai) จากประเทศไทย พบว่ามีความแตกต่างของลำดับนิวคลิโอไทด์ของลิงวอกและลิงกังทั้งหมด 7 คู่เบส (the 78th, 153rd, 320th, 428th, 483rd, 626th, and 778th) และเกิด insertion ในลิงกัง 2 คู่เบส (the 324th and 325th) ตามลำดับ

```
                    ... .|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                              10         20         30         40         50         60
Marc-Thai-700bp     ?????????? ?????????? ?????????? ?????????? ??GCCATCAT CCAGAGCATG
Mnem-Thai-700bp     ?????????? ?????????? ?????????? ?????????? ??GCCATCAT CCAGAGCATG
Mfas-Thai-700bp     AAGATGGAGC GGAGGCGCAA GCCCCACCTG GACCGCAGAG GCGCCATCAT CCAGAGCATG
Mmul-Burma-700bp    ?????????? ?????????? ?????????? ?????????? ??GCCATCAT CCAGAGCATG
Mmul-India-700bp    ?????????? ?????????? ?????????? ?????????? ??GCCATCAT CCAGAGCATG
Mmul-China-700bp    ?????????? ?????????? ?????????? ?????????? ??GCCATCAT CCAGAGCATG
Mmul242             ?????????? ?????????? ?????????? ?????????? ??GCCATCAT CCAGAGCATG
Mmul244             ?????????? ?????????? ?????????? ?????????? ??GCCATCAT CCAGAGCATG
Mnem246             ?????????? ?????????? ?????????? ?????????? ??GCCATCAT CCAGAGCATG
Mmul247             ?????????? ?????????? ?????????? ?????????? ??GCCATCAT CCAGAGCATG
Mmul248             ?????????? ?????????? ?????????? ?????????? ??GCCATCAT CCAGAGCATG
Mmul250             ?????????? ?????????? ?????????? ?????????? ??GCCATCAT CCAGAGCATG
Mmul253             ?????????? ?????????? ?????????? ?????????? ??GCCATCAT CCAGAGCATG
Hybrid254           ?????????? ?????????? ?????????? ?????????? ??GCCATCAT CCAGAGCATG
Hybrid259           ?????????? ?????????? ?????????? ?????????? ??GCCATCAT CCAGAGCATG
Mmul266             ?????????? ?????????? ?????????? ?????????? ??GCCATCAT CCAGAGCATG
Mmul267             ?????????? ?????????? ?????????? ?????????? ??GCCATCAT CCAGAGCATG

                    .. ..|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                              70         80         90        100        110        120
Marc-Thai-700bp     CCTGGCTTCT GGGCCAATGT TGTATCCTTT GCAGTGTTTC TTCTGCTTTT CCAGTTGAGA
Mnem-Thai-700bp     CCTGGCTTCT GGGCCAATGT TGTATCCTTT GCAGTGTTTC TTCTGCTTTT CCAGTTGAGC
Mfas-Thai-700bp     CCTGGCTTCT GGGCCAACGT TGTATCCTTT GCAGTGTTTC TTCTGCTTTT CCAGTTGAGA
Mmul-Burma-700bp    CCTGGCTTCT GGGCCAATGT TGTATCCTTT GCAGTGTTTC TTCTGCTTTT CCAGTTGAGA
Mmul-India-700bp    CCTGGCTTCT GGGCCAATGT TGTATCCTTT GCAGTGTTTC TTCTGCTTTT CCAGTTGAGA
Mmul-China-700bp    CCTGGCTTCT GGGCCAATGT TGTATCCTTT GCAGTGTTTC TTCTGCTTTT CCAGTTGAGA
Mmul242             CCTGGCTTCT GGGCCAATGT TGTATCCTTT GCAGTGTTTC TTCTGCTTTT CCAGTTGAGA
Mmul244             CCTGGCTTCT GGGCCAATGT TGTATCCTTT GCAGTGTTTC TTCTGCTTTT CCAGTTGAGA
Mnem246             CCTGGCTTCT GGGCCAATGT TGTATCCTTT GCAGTGTTTC TTCTGCTTTT CCAGTTGAGC
Mmul247             CCTGGCTTCT GGGCCAATGT TGTATCCTTT GCAGTGTTTC TTCTGCTTTT CCAGTTGAGA
Mmul248             CCTGGCTTCT GGGCCAATGT TGTATCCTTT GCAGTGTTTC TTCTGCTTTT CCAGTTGAGA
Mmul250             CCTGGCTTCT GGGCCAATGT TGTATCCTTT GCAGTGTTTC TTCTGCTTTT CCAGTTGAGA
Mmul253             CCTGGCTTCT GGGCCAATGT TGTATCCTTT GCAGTGTTTC TTCTGCTTTT CCAGTTGAGA
Hybrid254           CCTGGCTTCT GGGCCAATGT TGTATCCTTT GCAGTGTTTC TTCTGCTTTT CCAGTTGAGA
Hybrid259           CCTGGCTTCT GGGCCAATGT TGTATCCTTT GCAGTGTTTC TTCTGCTTTT CCAGTTGAGC
Mmul266             CCTGGCTTCT GGGCCAATGT TGTATCCTTT GCAGTGTTTC TTCTGCTTTT CCAGTTGAGA
Mmul267             CCTGGCTTCT GGGCCAATGT TGTATCCTTT GCAGTGTTTC TTCTGCTTTT CCAGTTGAGA

                    ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                             130        140        150        160        170        180
Marc-Thai-700bp     GGTGCTCTTG GGAAGTGTAA GGAACTTACG GGCGGCTCGG CGTCGATGTG ACCATTTGGG
Mnem-Thai-700bp     GGTGCTCTTG GGAAGTGTAA GGAACTTACG GGCGGCTCGG CGTCGATGTG ACCATTTGGG
Mfas-Thai-700bp     GGTGCTCTTG GGAAGTGTAA GGAACTTACG GGCGGCTCGG CGTCGATGTG ACCATTTGGG
Mmul-Burma-700bp    GGTGCTCTTG GGAAGTGTAA GGAACTTACG GGCGGCTCGG CGTCGATGTG ACCATTTGGG
Mmul-India-700bp    GGTGCTCTTG GGAAGTGTAA GGAACTTACG GGCGGCTCGG CGTCGATGTG ACCATTTGGG
Mmul-China-700bp    GGTGCTCTTG GGAAGTGTAA GGAACTTACG GGCGGCTCGG CGTCGATGTG ACCATTTGGG
Mmul242             GGTGCTCTTG GGAAGTGTAA GGAACTTACG GGCGGCTCGG CGTCGATGTG ACCATTTGGG
```

```
Mmul244              GGTGCTCTTG GGAAGTGTAA GGAACTTACG GGCGGCTCGG CGTCGATGTG ACCATTTGGG
Mnem246              GGTGCTCTTG GGAAGTGTAA GGAACTTACG GGCGGCTCGG CGTCGATGTG ACCATTTGGG
Mmul247              GGTGCTCTTG GGAAGTGTAA GGAACTTACG GGCGGCTCGG CGTCGATGTG ACCATTTGGG
Mmul248              GGTGCTCTTG GGAAGTGTAA GGAACTTACG GGCGGCTCGG CGTCGATGTG ACCATTTGGG
Mmul250              GGTGCTCTTG GGAAGTGTAA GGAACTTACG GGCGGCTCGG CGTCGATGTG ACCATTTGGG
Mmul253              GGTGCTCTTG GGAAGTGTAA GGAACTTACG GGCGGCTCGG CGTCGATGTG ACCATTTGGG
Hybrid254            GGTGCTCTTG GGAAGTGTAA GGAACTTACG GGCGGCTCGG CGTCGATGTG ACCATTTGGG
Hybrid259            GGTGCTCTTG GGAAGTGTAA GGAACTTACG GGCGGCTCGG CGTCGATGTG ACCATTTGGG
Mmul266              GGTGCTCTTG GGAAGTGTAA GGAACTTACG GGCGGCTCGG CGTCGATGTG ACCATTTGGG
Mmul267              GGTGCTCTTG GGAAGTGTAA GGAACTTACG GGCGGCTCGG CGTCGATGTG ACCATTTGGG

                     ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                           190        200        210        220        230        240
Marc-Thai-700bp      GAACACGGGT GAGTTTCCAC AGACAAATGT GGCTGAAGAA AGCCAGAGCA GACACGGGTA
Mnem-Thai-700bp      GAACACGGGT GAGTTTCCAC AGACAAATGT GGCTGAAGAA AGCCAGAGCA GACACGGGTA
Mfas-Thai-700bp      GAACACGGGT GAGTGTCCAC AGACAAATGT GGCTGAAGAA AGCCAGAGCA GACACGGGTA
Mmul-Burma-700bp     GAACACGGGT GAGTGTCCAC AGACAAATGT GGCTGAAGAA AGCCAGAGCA GACACGGGTA
Mmul-India-700bp     GAACACGGGT GAGTGTCCAC AGACAAATGT GGCTGAAGAA AGCCAGAGCA GACACGGGTA
Mmul-China-700bp     GAACACGGGT GAGTGTCCAC AGACAAATGT GGCTGAAGAA AGCCAGAGCA GACACGGGTA
Mmul242              GAACACGGGT GAGTGTCCAC AGACAAATGT GGCTGAAGAA AGCCAGAGCA GACACGGGTA
Mmul244              GAACACGGGT GAGTGTCCAC AGACAAATGT GGCTGAAGAA AGCCAGAGCA GACACGGGTA
Mnem246              GAACACGGGT GAGTTTCCAC AGACAAATGT GGCTGAAGAA AGCCAGAGCA GACACGGGTA
Mmul247              GAACACGGGT GAGTGTCCAC AGACAAATGT GGCTGAAGAA AGCCAGAGCA GACACGGGTA
Mmul248              GAACACGGGT GAGTGTCCAC AGACAAATGT GGCTGAAGAA AGCCAGAGCA GACACGGGTA
Mmul250              GAACACGGGT GAGTGTCCAC AGACAAATGT GGCTGAAGAA AGCCAGAGCA GACACGGGTA
Mmul253              GAACACGGGT GAGTGTCCAC AGACAAATGT GGCTGAAGAA AGCCAGAGCA GACACGGGTA
Hybrid254            GAACACGGGT GAGTGTCCAC AGACAAATGT GGCTGAAGAA AGCCAGAGCA GACACGGGTA
Hybrid259            GAACACGGGT GAGTTTCCAC AGACAAATGT GGCTGAAGAA AGCCAGAGCA GACACGGGTA
Mmul266              GAACACGGGT GAGTGTCCAC AGACAAATGT GGCTGAAGAA AGCCAGAGCA GACACGGGTA
Mmul267              GAACACGGGT GAGTGTCCAC AGACAAATGT GGCTGAAGAA AGCCAGAGCA GACACGGGTA

                     ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                           250        260        270        280        290        300
Marc-Thai-700bp      CTATTTTCCT GCGTGCGTGA GAGAAACGCT TCATGGTGCC AAGCAGCAGA CGTTTGGGGC
Mnem-Thai-700bp      CTATTTTCCT GCGTGCGTGA GAGAAACGCT TCATGGTGCC AAGCAGCAGA CGTTTGGGGC
Mfas-Thai-700bp      CTATTTTCCT GCGTGCGCGA GAGGAACGCT TCATGGTGCC AAGCAGCAGA CGTTTGGGGC
Mmul-Burma-700bp     CTATTTTCCT GCGTGCGTGA GAGAAACGCT TCATGGTGCC AAGCAGCAGA CGTTTGGGGC
Mmul-India-700bp     CTATTTTCCT GCGTGCGTGA GAGAAACGCT TCATGGTGCC AAGCAGCAGA CGTTTGGGGC
Mmul-China-700bp     CTATTTTCCT GCGTGCGTGA GAGAAACGCT TCATGGTGCC AAGCAGCAGA CGTTTGGGGC
Mmul242              CTATTTTCCT GCGTGCGTGA GAGAAACGCT TCATGGTGCC AAGCAGCAGA CGTTTGGGGC
Mmul244              CTATTTTCCT GCGTGCGTGA GAGAAACGCT TCATGGTGCC AAGCAGCAGA CGTTTGGGGC
Mnem246              CTATTTTCCT GCGTGCGTGA GAGAAACGCT TCATGGTGCC AAGCAGCAGA CGTTTGGGGC
Mmul247              CTATTTTCCT GCGTGCGTGA GAGAAACGCT TCATGGTGCC AAGCAGCAGA CGTTTGGGGC
Mmul248              CTATTTTCCT GCGTGCGTGA GAGAAACGCT TCATGGTGCC AAGCAGCAGA CGTTTGGGGC
Mmul250              CTATTTTCCT GCGTGCGTGA GAGAAACGCT TCATGGTGCC AAGCAGCAGA CGTTTGGGGC
Mmul253              CTATTTTCCT GCGTGCGTGA GAGAAACGCT TCATGGTGCC AAGCAGCAGA CGTTTGGGGC
Hybrid254            CTATTTTCCT GCGTGCGTGA GAGAAACGCT TCATGGTGCC AAGCAGCAGA CGTTTGGGGC
Hybrid259            CTATTTTCCT GCGTGCGTGA GAGAAACGCT TCATGGTGCC AAGCAGCAGA CGTTTGGGGC
Mmul266              CTATTTTCCT GCGTGCGTGA GAGAAACGCT TCATGGTGCC AAGCAGCAGA CGTTTGGGGC
Mmul267              CTATTTTCCT GCGTGCGTGA GAGAAACGCT TCATGGTGCC AAGCAGCAGA CGTTTGGGGC

                     ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                           310        320        330        340        350        360
Marc-Thai-700bp      ATCTTTCTGA AGAGCAGAAG CGAGTTCTCA GCAGAACACG TGTTGCTGTG AATCAAGCTG
Mnem-Thai-700bp      ATCTTTCTGA AGAGCAGAAG CGAGTTCTCA GCAGAACACG TGTTGCTGTG AATCAAGCTA
Mfas-Thai-700bp      ATCTTTCTGA AGAGCAGAAG CGAGTTCTCA GCAGAACACG TGTTGCTGTG AATCAAGCTA
Mmul-Burma-700bp     ATCTTTCTGA AGAGCAGAAG CGAGTTCTCA GCAGAACACG TGTTGCTGTG AATCAAGCTA
Mmul-India-700bp     ATCTTTCTGA AGAGCAGAAG CGAGTTCTCA GCAGAACACG TGTTGCTGTG AATCAAGCTA
Mmul-China-700bp     ATCTTTCTGA AGAGCAGAAG CGAGTTCTCA GCAGAACACG TGTTGCTGTG AATCAAGCTA
Mmul242              ATCTTTCTGA AGAGCAGAAG CGAGTTCTCA GCAGAACACG TGTTGCTGTG AATCAAGCTA
Mmul244              ATCTTTCTGA AGAGCAGAAG CGAGTTCTCA GCAGAACACG TGTTGCTGTG AATCAAGCTA
```

```
Mnem246             ATCTTTCTGA AGAGCAGAAG CGAGTTCTCA GCAGAACACG TGTTGCTGTG AATCAAGCTA
Mmul247             ATCTTTCTGA AGAGCAGAAG CGAGTTCTCA GCAGAACACG TGTTGCTGTG AATCAAGCTA
Mmul248             ATCTTTCTGA AGAGCAGAAG CGAGTTCTCA GCAGAACACG TGTTGCTGTG AATCAAGCTA
Mmul250             ATCTTTCTGA AGAGCAGAAG CGAGTTCTCA GCAGAACACG TGTTGCTGTG AATCAAGCTA
Mmul253             ATCTTTCTGA AGAGCAGAAG CGAGTTCTCA GCAGAACACG TGTTGCTGTG AATCAAGCTA
Hybrid254           ATCTTTCTGA AGAGCAGAAG CGAGTTCTCA GCAGAACACG TGTTGCTGTG AATCAAGCTA
Hybrid259           ATCTTTCTGA AGAGCAGAAG CGAGTTCTCA GCAGAACACG TGTTGCTGTG AATCAAGCTA
Mmul266             ATCTTTCTGA AGAGCAGAAG CGAGTTCTCA GCAGAACACG TGTTGCTGTG AATCAAGCTA
Mmul267             ATCTTTCTGA AGAGCAGAAG CGAGTTCTCA GCAGAACACG TGTTGCTGTG AATCAAGCTA

                    ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                           370        380        390        400        410        420
Marc-Thai-700bp     TTGTT--AAG GGACTGTGAC TGCTCCGCCT TGCCAGTCCG ATCTGGGACT GGGCTTCTTC
Mnem-Thai-700bp     TCGTTTTAAG GGACTGTGAC TGCTCCGCCT TGCCAGTCCG ATCTGGGACT GGGCTTCTTC
Mfas-Thai-700bp     TTGTT--AAG GGACTGTGAC TGCTCCGCCT TGCCAGTCCG ATCTGGGACT GGGCTTCTTC
Mmul-Burma-700bp    TTGTT--AAG GGACTGTGAC TGCTCCGCCT TGCCAGTCCG ATCTGGGACT GGGCTTCTTC
Mmul-India-700bp    TTGTT--AAG GGACTGTGAC TGCTCCGCCT TGCCAGTCCG ATCTGGGACT GGGCTTCTTC
Mmul-China-700bp    TTGTT--AAG GGACTGTGAC TGCTCCGCCT TGCCAGTCCG ATCTGGGACT GGGCTTCTTC
Mmul242             TTGTT--AAG GGACTGTGAC TGCTCCGCCT TGCCAGTCCG ATCTGGGACT GGGCTTCTTC
Mmul244             TTGTT--AAG GGACTGTGAC TGCTCCGCCT TGCCAGTCCG ATCTGGGACT GGGCTTCTTC
Mnem246             TCGTTTTAAG GGACTGTGAC TGCTCCGCCT TGCCAGTCCG ATCTGGGACT GGGCTTCTTC
Mmul247             TTGTT--AAG GGACTGTGAC TGCTCCGCCT TGCCAGTCCG ATCTGGGACT GGGCTTCTTC
Mmul248             TTGTT--AAG GGACTGTGAC TGCTCCGCCT TGCCAGTCCG ATCTGGGACT GGGCTTCTTC
Mmul250             TTGTT--AAG GGACTGTGAC TGCTCCGCCT TGCCAGTCCG ATCTGGGACT GGGCTTCTTC
Mmul253             TTGTT--AAG GGACTGTGAC TGCTCCGCCT TGCCAGTCCG ATCTGGGACT GGGCTTCTTC
Hybrid254           TTGTT--AAG GGACTGTGAC TGCTCCGCCT TGCCAGTCCG ATCTGGGACT GGGCTTCTTC
Hybrid259           TCGTTTTAAG GGACTGTGAC TGCTCCGCCT TGCCAGTCCG ATCTGGGACT GGGCTTCTTC
Mmul266             TTGTT--AAG GGACTGTGAC TGCTCCGCCT TGCCAGTCCG ATCTGGGACT GGGCTTCTTC
Mmul267             TTGTT--AAG GGACTGTGAC TGCTCCGCCT TGCCAGTCCG ATCTGGGACT GGGCTTCTTC

                    ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                           430        440        450        460        470        480
Marc-Thai-700bp     GGGTATGAGC AGATTCTGCC AGGCCTCAGA CACCGGCAGT TCTCTGCATA TCGCCCCTCC
Mnem-Thai-700bp     GGGTATGAGC AGATTCTGCC AGGCCTCAGA CACCGGCAGT TCTCTGCATG TCGCCCCTCC
Mfas-Thai-700bp     GGGTATGAGC AGATTCTGCC AGGCCTCAGA CACCGGCAGT TCTCTGCATA TCGCCCCTCC
Mmul-Burma-700bp    GGGTATGAGC AGATTCTGCC AGGCCTCAGA CACCGGCAGT TCTCTGCATA TCGCCCCTCC
Mmul-India-700bp    GGGTATGAGC AGATTCTGCC AGGCCTCAGA CACCGGCAGT TCTCTGCATA TCGCCCCTCC
Mmul-China-700bp    GGGTATGAGC AGATTCTGCC AGGCCTCAGA CACCGGCAGT TCTCTGCATA TCGCCCCTCC
Mmul242             GGGTATGAGC AGATTCTGCC AGGCCTCAGA CACCGGCAGT TCTCTGCATA TCGCCCCTCC
Mmul244             GGGTATGAGC AGATTCTGCC AGGCCTCAGA CACCGGCAGT TCTCTGCATA TCGCCCCTCC
Mnem246             GGGTATGAGC AGATTCTGCC AGGCCTCAGA CACCGGCAGT TCTCTGCATG TCGCCCCTCC
Mmul247             GGGTATGAGC AGATTCTGCC AGGCCTCAGA CACCGGCAGT TCTCTGCATA TCGCCCCTCC
Mmul248             GGGTATGAGC AGATTCTGCC AGGCCTCAGA CACCGGCAGT TCTCTGCATA TCGCCCCTCC
Mmul250             GGGTATGAGC AGATTCTGCC AGGCCTCAGA CACCGGCAGT TCTCTGCATA TCGCCCCTCC
Mmul253             GGGTATGAGC AGATTCTGCC AGGCCTCAGA CACCGGCAGT TCTCTGCATA TCGCCCCTCC
Hybrid254           GGGTATGAGC AGATTCTGCC AGGCCTCAGA CACCGGCAGT TCTCTGCATA TCGCCCCTCC
Hybrid259           GGGTATGAGC AGATTCTGCC AGGCCTCAGA CACCGGCAGT TCTCTGCATG TCGCCCCTCC
Mmul266             GGGTATGAGC AGATTCTGCC AGGCCTCAGA CACCGGCAGT TCTCTGCATA TCGCCCCTCC
Mmul267             GGGTATGAGC AGATTCTGCC AGGCCTCAGA CACCGGCAGT TCTCTGCATA TCGCCCCTCC

                    ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                           490        500        510        520        530        540
Marc-Thai-700bp     CCGTGTCAGT GCGGTCAGCC TCACAATGAT ACACCCTCGG TGAAACCCGA GAGGTCTGAA
Mnem-Thai-700bp     CCGTGTCAGT GCGGTCAGCC TCACAATGAT ACACCCTCGG TGAAACCCGA GAGGTCTGAA
Mfas-Thai-700bp     CCGTGTCAGT GCGGTCAGCC TCACAATGAT ACACCCTCGG TGAAACCCGA GAGGTCTGAA
Mmul-Burma-700bp    CCGTGTCAGT GCGGTCAGCC TCACAATGAT ACACCCTCGG TGAACCCCGA GAGGTCTGAA
Mmul-India-700bp    CCGTGTCAGT GCGGTCAGCC TCACAATGAT ACACCCTCGG TGAACCCCGA GAGGTCTGAA
Mmul-China-700bp    CCGTGTCAGT GCGGTCAGCC TCACAATGAT ACACCCTCGG TGAACCCCGA GAGGTCTGAA
Mmul242             CCGTGTCAGT GCGGTCAGCC TCACAATGAT ACACCCTCGG TGAACCCCGA GAGGTCTGAA
Mmul244             CCGTGTCAGT GCGGTCAGCC TCACAATGAT ACACCCTCGG TGAACCCCGA GAGGTCTGAA
Mnem246             CCGTGTCAGT GCGGTCAGCC TCACAATGAT ACACCCTCGG TGAAACCCGA GAGGTCTGAA
```

```
Mmul247              CCGTGTCAGT GCGGTCAGCC TCACAATGAT ACACCCTCGG TGAACCCCGA GAGGTCTGAA
Mmul248              CCGTGTCAGT GCGGTCAGCC TCACAATGAT ACACCCTCGG TGAACCCCGA GAGGTCTGAA
Mmul250              CCGTGTCAGT GCGGTCAGCC TCACAATGAT ACACCCTCGG TGAACCCCGA GAGGTCTGAA
Mmul253              CCGTGTCAGT GCGGTCAGCC TCACAATGAT ACACCCTCGG TGAACCCCGA GAGGTCTGAA
Hybrid254            CCGTGTCAGT GCGGTCAGCC TCACAATGAT ACACCCTCGG TGAACCCCGA GAGGTCTGAA
Hybrid259            CCGTGTCAGT GCGGTCAGCC TCACAATGAT ACACCCTCGG TGAAACCCGA GAGGTCTGAA
Mmul266              CCGTGTCAGT GCGGTCAGCC TCACAATGAT ACACCCTCGG TGAACCCCGA GAGGTCTGAA
Mmul267              CCGTGTCAGT GCGGTCAGCC TCACAATGAT ACACCCTCGG TGAACCCCGA GAGGTCTGAA

                     ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                           550        560        570        580        590        600
Marc-Thai-700bp      TTCAGGGGGA GGGAGAGGAG AAAGGGAGGT CATTCATGGA TGCGGATCGG AAAAAATCCC
Mnem-Thai-700bp      TTCAGGGGGA GGGAGAGGAG AAAGGGAGGT CATTCATGGA TGCAGATCTG AAAAAATCCC
Mfas-Thai-700bp      TTCAGGGGGA GGGAGAGGAG AAAGGGAGGT CATTCATGGA TGCAGATCTG AAAAAATCCC
Mmul-Burma-700bp     TTCAGGGGGA GGGAGAGGAG AAAGGGAGGT CATTCATGGA TGCAGATCTG AAAAAATCCC
Mmul-India-700bp     TTCAGGGGGA GGGAGAGGAG AAAGGGAGGT CATTCATGGA TGCAGATCTG AAAAAATCCC
Mmul-China-700bp     TTCAGGGGGA GGGAGAGGAG AAAGGGAGGT CATTCATGGA TGCAGATCTG AAAAAATCCC
Mmul242              TTCAGGGGGA GGGAGAGGAG AAAGGGAGGT CATTCATGGA TGCAGATCTG AAAAAATCCC
Mmul244              TTCAGGGGGA GGGAGAGGAG AAAGGGAGGT CATTCATGGA TGCAGATCTG AAAAAATCCC
Mnem246              TTCAGGGGGA GGGAGAGGAG AAAGGGAGGT CATTCATGGA TGCAGATCTG AAAAAATCCC
Mmul247              TTCAGGGGGA GGGAGAGGAG AAAGGGAGGT CATTCATGGA TGCAGATCTG AAAAAATCCC
Mmul248              TTCAGGGGGA GGGAGAGGAG AAAGGGAGGT CATTCATGGA TGCAGATCTG AAAAAATCCC
Mmul250              TTCAGGGGGA GGGAGAGGAG AAAGGGAGGT CATTCATGGA TGCAGATCTG AAAAAATCCC
Mmul253              TTCAGGGGGA GGGAGAGGAG AAAGGGAGGT CATTCATGGA TGCAGATCTG AAAAAATCCC
Hybrid254            TTCAGGGGGA GGGAGAGGAG AAAGGGAGGT CATTCATGGA TGCAGATCTG AAAAAATCCC
Hybrid259            TTCAGGGGGA GGGAGAGGAG AAAGGGAGGT CATTCATGGA TGCAGATCTG AAAAAATCCC
Mmul266              TTCAGGGGGA GGGAGAGGAG AAAGGGAGGT CATTCATGGA TGCAGATCTG AAAAAATCCC
Mmul267              TTCAGGGGGA GGGAGAGGAG AAAGGGAGGT CATTCATGGA TGCAGATCTG AAAAAATCCC

                     ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                           610        620        630        640        650        660
Marc-Thai-700bp      CTAGCCGCCC CTCTGGGTGC TCTTAGGCCT TCCCCGTTGC TTCTAGCTTT TCTTTCCGTT
Mnem-Thai-700bp      CTAGCCGCCC CTCTGGGTGC TCTTAGGCCT TCCCCGTTGC TTCTAGCTTT TCTTTCCGTT
Mfas-Thai-700bp      CTAGCCGCCC CTCTGGGTGC TCTTAGGCCT TCCCCGTTGC TTCTAGCTTT TCTTTCCGTT
Mmul-Burma-700bp     CTAGCCGCCC CTCTGGGTGC TCTTAGGCCT TCCCCGTTGC TTCTAGCTTT TCTTTCCGTT
Mmul-India-700bp     CTAGCCGCCC CTCTGGGTGC TCTTAGGCCT TCCCCGTTGC TTCTAGCTTT TCTTTCCGTT
Mmul-China-700bp     CTAGCCGCCC CTCTGGGTGC TCTTAGGCCT TCCCCGTTGC TTCTAGCTTT TCTTTCCGTT
Mmul242              CTAGCCGCCC CTCTGGGTGC TCTTAGGCCT TCCCCGTTGC TTCTAGCTTT TCTTTCCGTT
Mmul244              CTAGCCGCCC CTCTGGGTGC TCTTAGGCCT TCCCCGTTGC TTCTAGCTTT TCTTTCCGTT
Mnem246              CTAGCCGCCC CTCTGGGTGC TCTTAGGCCT TCCCCGTTGC TTCTAGCTTT TCTTTCCGTT
Mmul247              CTAGCCGCCC CTCTGGGTGC TCTTAGGCCT TCCCCGTTGC TTCTAGCTTT TCTTTCCGTT
Mmul248              CTAGCCGCCC CTCTGGGTGC TCTTAGGCCT TCCCCGTTGC TTCTAGCTTT TCTTTCCGTT
Mmul250              CTAGCCGCCC CTCTGGGTGC TCTTAGGCCT TCCCCGTTGC TTCTAGCTTT TCTTTCCGTT
Mmul253              CTAGCCGCCC CTCTGGGTGC TCTTAGGCCT TCCCCGTTGC TTCTAGCTTT TCTTTCCGTT
Hybrid254            CTAGCCGCCC CTCTGGGTGC TCTTAGGCCT TCCCCGTTGC TTCTAGCTTT TCTTTCCGTT
Hybrid259            CTAGCCGCCC CTCTGGGTGC TCTTAGGCCT TCCCCGTTGC TTCTAGCTTT TCTTTCCGTT
Mmul266              CTAGCCGCCC CTCTGGGTGC TCTTAGGCCT TCCCCGTTGC TTCTAGCTTT TCTTTCCGTT
Mmul267              CTAGCCGCCC CTCTGGGTGC TCTTAGGCCT TCCCCGTTGC TTCTAGCTTT TCTTTCCGTT

                     ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                           670        680        690        700        710        720
Marc-Thai-700bp      GCATCTCAAG GCTCTTTGAC CTCAATCAGA TTGCAAACCA CCCTCAGATG TCGGCCCTGA
Mnem-Thai-700bp      GCATCTCGAG GCTCTTTGAC CTCAATCAGA TTGCAAACCA CCCTCAGATG TCGGCCCTGA
Mfas-Thai-700bp      GCATCTCAAG GCTCTTTGAC CTCAATCAGA TTGCAAACCA CCCTCAGATG TCGGCCCTGA
Mmul-Burma-700bp     GCATCTCAAG GCTCTTTGAC CTCAATCAGA TTGCAAACCA CCCTCAGATG TCGGCCCTGC
Mmul-India-700bp     GCATCTCAAG GCTCTTTGAC CTCAATCAGA TTGCAAACCA CCCTCAGATG TCGGCCCTGC
Mmul-China-700bp     GCATCTCAAG GCTCTTTGAC CTCAATCAGA TTGCAAACCA CCCTCAGATG TCGGCCCTGC
Mmul242              GCATCTCAAG GCTCTTTGAC CTCAATCAGA TTGCAAACCA CCCTCAGATG TCGGCCCTGC
Mmul244              GCATCTCAAG GCTCTTTGAC CTCAATCAGA TTGCAAACCA CCCTCAGATG TCGGCCCTGC
Mnem246              GCATCTCGAG GCTCTTTGAC CTCAATCAGA TTGCAAACCA CCCTCAGATG TCGGCCCTGA
Mmul247              GCATCTCAAG GCTCTTTGAC CTCAATCAGA TTGCAAACCA CCCTCAGATG TCGGCCCTGC
```

Mmul248	GCATCTCAAG	GCTCTTTGAC	CTCAATCAGA	TTGCAAACCA	CCCTCAGATG	TCGGCCCTGC
Mmul250	GCATCTCAAG	GCTCTTTGAC	CTCAATCAGA	TTGCAAACCA	CCCTCAGATG	TCGGCCCTGC
Mmul253	GCATCTCAAG	GCTCTTTGAC	CTCAATCAGA	TTGCAAACCA	CCCTCAGATG	TCGGCCCTGC
Hybrid254	GCATCTCAAG	GCTCTTTGAC	CTCAATCAGA	TTGCAAACCA	CCCTCAGATG	TCGGCCCTGC
Hybrid259	GCATCTCGAG	GCTCTTTGAC	CTCAATCAGA	TTGCAAACCA	CCCTCAGATG	TCGGCCCTGA
Mmul266	GCATCTCAAG	GCTCTTTGAC	CTCAATCAGA	TTGCAAACCA	CCCTCAGATG	TCGGCCCTGC
Mmul267	GCATCTCAAG	GCTCTTTGAC	CTCAATCAGA	TTGCAAACCA	CCCTCAGATG	TCGGCCCTGC

	....|....|	....|....|	....|....|	....|
	730	740	750	
Marc-Thai-700bp	TCACTGACCA	AGATGAAGAC	ATGCTGAGCT	ACATG
Mnem-Thai-700bp	TCACTGACCA	AGATGAAGAC	ATGCTGAGCT	ACATG
Mfas-Thai-700bp	TCACTGACCA	AGATGAAGAC	ATGCTGAGCT	ACATG
Mmul-Burma-700bp	TCACTGACCA	AGATGAAGAC	ATGCTGAGCT	ACATG
Mmul-India-700bp	TCACTGACCA	AGATGAAGAC	ATGCTGAGCT	ACATG
Mmul-China-700bp	TCACTGACCA	AGATGAAGAC	ATGCTGAGCT	ACATG
Mmul242	TCACTGACCA	AGATGAAGAC	ATGCTGAGCT	ACATG
Mmul244	TCACTGACCA	AGATGAAGAC	ATGCTGAGCT	ACATG
Mnem246	TCACTGACCA	AGATGAAGAC	ATGCTGAGCT	ACATG
Mmul247	TCACTGACCA	AGATGAAGAC	ATGCTGAGCT	ACATG
Mmul248	TCACTGACCA	AGATGAAGAC	ATGCTGAGCT	ACATG
Mmul250	TCACTGACCA	AGATGAAGAC	ATGCTGAGCT	ACATG
Mmul253	TCACTGACCA	AGATGAAGAC	ATGCTGAGCT	ACATG
Hybrid254	TCACTGACCA	AGATGAAGAC	ATGCTGAGCT	ACATG
Hybrid259	TCACTGACCA	AGATGAAGAC	ATGCTGAGCT	ACATG
Mmul266	TCACTGACCA	AGATGAAGAC	ATGCTGAGCT	ACATG
Mmul267	TCACTGACCA	AGATGAAGAC	ATGCTGAGCT	ACATG

Title: Hybridization between a released pigtail male and semi-wild rhesus females in northeastern Thailand resolved by TSPY gene analysis

Authors: Suchinda Malaivijitnond[1], Osamu Takenaka[2], Nontakorn Urasopon[1], Yuzuru Hamada[3]

Affiliation:

1)Primate Research Unit, Department of Biology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330, Thailand

2)Department of Cellular and Molecular Biology, Primate Research Institute, Kyoto University, Aichi, Japan

3)Section of Morphology, Primate Research Institute, Kyoto University, Aichi, Japan

Correspondence and request for reprints

Dr.Suchinda Malaivijitnond

Primate Research Unit, Department of Biology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330, THAILAND

Tel: 66-2-2185275, Fax: 66-2-2185256, E-mail: suchinda.m@chula.ac.th

Key words: hybridization; *Macaca nemestrina*; *M. mulatta*; Thailand; TSPY gene; mitochondrial DNA

A running title: Hybridization between pigtail male and rhesus female

Word count for main text: 3,485 words

Abstract

We report an artificial "genetic pollution" observed in the semi-wild troop of rhesus macaques (*Macaca mulatta*) inhabiting the Wat Tham Pa Mak Ho (WTPMH), northeastern Thailand. The gene pool of this rhesus troop was influenced by a pet pigtail male (*M. nemestrina leonina*) that has been released into the troop and subsequently become the alpha male. Three juvenile males with mixed morphological characters were suspected to be hybrids. Thirty-three troop members were temporarily trapped and inspected, including two of the suspected hybrids and the pigtail. Genetic and morphometric analyses were conducted to clarify whether those juveniles had been sired by the pigtail male. A one-hundred per cent homology of TSPY nucleotide sequences was observed between the eight male WTPMH rhesuses investigated and between the WTPMH pigtail and Thai pigtail (Tosi *et al.*, 2000). When the TSPY gene sequences were compared between WTPMH rhesus and the pigtail, 7 different nucleotide positions and 2 successive nucleotide insertions in the pigtail were revealed. Only one of the two suspected hybrids was sired by the pigtail, while the other was sired by a rhesus male, as indicated by TSPY gene analysis. Both suspected hybrids were born from rhesus females as determined by analysis of mt DNA. Morphometric results, pelage color and relative-tail length, are relevant to the result obtained from the mt DNA and TSPY gene analyses. The TSPY gene, a conserved and species-specific gene, is, therefore, a reliable choice of genetic marker to identify hybrids between macaque species.

Introduction

Rhesus macaques have been reported to inhabit a variety of habitats from the upper northeastern (Nongkhai and Loei provinces) and northern (Nan and Chiangmai provinces) parts to the western part (Uthai Thani province) of Thailand (Fooden, 2000). They are, however, rarely found at present, which perhaps reflects habitat deterioration due to logging, deforestation and agricultural development. They are also considered to have suffered from so-called "genetic pollution" (via the release of pet monkeys). We recently reported on a troop of rhesus inhabiting the Wat Tham Pa Mak Ho (WTPMH), a Buddhist temple, in northeastern Thailand (Malaivijitnond and Varavudhi, 2002). A few years after our first census in 1998, one pigtail male, formerly a pet, was released into this troop. Because the home-range of the WTPMH troop is located on a limestone hill and isolated from other macaque troops by the surrounding agricultural area, the released pigtail male was forced to join the WTPMH's rhesus troop. As he is twice the size of any adult rhesus male, he rapidly became the alpha male (Malaivijitnond and Varavudhi, 2002). During our March 2003 census, the pigtail was observed to mate with rhesus females, and three immature males with morphological characters between those of pigtail and rhesus macaques were also found. To determine whether those immature males were truly hybrid, DNA analysis had to be performed. Since all were males, they were considered to have inherited the Y-chromosome from the pigtail. Although it is unlikely that their mothers were not rhesus, since we observed no other species during our survey, analysis of mitochondrial DNA (mtDNA) was also necessary.

So far, only seven functional genes have been isolated and/or mapped on the Y chromosome. Of these only the TSPY and SRY genes are strictly Y-specific as the other Y-chromosome genes have a corresponding homolog on the X chromosome (Zhang et al., 1992). The TSPY (testis-specific protein, Y chromosome) gene, a conserved testis-specific gene that contains six exons and five introns, was selected for this study, because it is evolutionarily conserved in old world monkeys, including at least *M. mulatta, M. assamensis* and *M. fascicularis*, which showed the same single band (10.6 kb) in male DNA (Kim and Takenaka, 1996). It is also a gene family found on the nonrecombining portion of the Y chromosome (Schempp *et al.*, 1995; Affara *et al.*, 1996); in macaques and baboons this cluster is located on the long arm, proximal to the centromere (Kim *et al.*, 1996; Glaser *et al.*, 1998).

Thus, the present study aims to investigate whether the supposed hybrid offspring were truly sired by the pigtail male via TSPY gene analysis. Mitochondrial DNA was also analyzed to confirm the maternal lineage of the supposed hybrids (Hayasaka et al., 1991; Evans et al., 2001),

Materials and methods

Study area and subject population

The subject macaques belonged to the troop of rhesus inhabiting the Wat Tham Pa Mak Ho, a Buddhist temple, Wang Sapung District, Loei Province, northeastern Thailand (GPS 17° 14' 56"N 108° 39' 50"E). The temple is located on a limestone hill (340 m msl) that is covered mainly with spiny shrubs, bamboo and fig trees and surrounded by agricultural fields of rice, soybean, cassava, banana and tamarind. One-hundred and nine rhesuses were counted in March, 2003, including 42 adults, (6 males and 36 females), 12 sub-adults, 38 juveniles and 18 infants. A released pigtail was the alpha male of the troop.

Capture-and-release field work

In total 33 macaques (11 males and 22 females) were temporarily caught in a trap (6 m x 6 m) in March 2003, including the pigtail and two of the three suspected hybrids (monkey nos. 254 and 259). Monkeys were anesthetized by intramuscular injection with 10 mg/kg BW of ketamine hydrochloride. While the monkeys were immobilized, somatometrics and pelage color were recorded, blood was collected, and overall health was determined before they were released back to the troop after their complete recovery. The ages of monkeys were estimated from the dental formula according to Iwamoto *et al.* (1984; 1987) and Smith et al. (1994). The estimated ages of no.254 and no. 259 were 1 and 3 years, respectively.

Somatometric determination

The immobilized monkeys were measured using somatometric instruments and methods for anthropometry (Martin and Saller, 1957) with slight modification (c.f., Iwamoto, 1971). Relative tail length (%) was obtained by dividing tail length by crown-rump length.

Determination of pelage color

Pelage color was quantitatively determined using a color reflectometer (Color Analyzer™ Model CR-200, Minolta Co., Ltd) (Hamada *et al.*, 1988; 1992), that emits a standardized light (D65) and measures the light reflected through a hole of 8 mm in diameter. Color is expressed by three parameters: L* for lightness, ranging from 0 (darkest) to 100 (lightest); a* for the hue of green (-60) to red (+60); and b* for the hue of blue (-60) to yellow (+60). We measured color at the vertex of the head, the back (interscapular), lateral upper arm and forearm, dorsum of the hand, waist (suprailiac), lateral thigh and leg, and dorsum of the foot.

Blood collection

Blood samples (3 ml/kg BW, maximum 10 ml) were collected from the monkeys by femoral venipuncture and immediately mixed with 0.1 ml of heparin. The buffy-coat containing white blood cells was separated by centrifugation at 2,000 rpm for 10 minutes and used for DNA extraction. DNA was extracted following the method described by Sambrook *et al.* (1989). The mtDNA (Hayasaka *et al.*, 1991) and TSPY gene (Zhang *et al.*, 1992; Kim and Takenaka, 1996) were analyzed.

PCR primers for amplification and sequence determination

mitochondrial DNA

To examine the maternal lineage of the suspected hybrids, a 454-bp portion of the mitochondrial genome spanning the major noncoding region (MNR) in both suspected hybrids and 14 randomly selected rhesuses was amplified and sequenced. Primers used for PCR amplification followed Hayasaka *et al.* (1991); saru-4 : 5'-ATC AGG GTC TAT CAC CC TAT-3' and saru-5: 5'-GGC CAG GAC CAA GCC TAT TTG-3' and primers used for sequencing were designed from the mtDNA sequence of Japanese macaque as follows; 554F: 5'-ATC ACC CTA TTT AAC CAG TCA C-3' and 567F: 5'-AAA CCC ATC TAG GCA TTT TCA G-3'. The 5' of primer 554F and the 3' of primer 567F correspond to nucleotide number 18 and 831, respectively, of the Japanese sequence (Hayasaka *et al.*, 1991). The primer saru-4 was biotinylated, whereas primers 554F and 567F were FITC labeled (Japan Bioservice, Japan). Amplification was achieved using the AmpliTaq Gold^{TM} Kit (Applied Biosystems, Japan). Amplification of the mtDNA gene was carried out in a Perkin-Elmer Cetus Thermal Cycler (model 9600) for 30 cycles consisting of denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 52°C for 1 min, and extension at 72°C for 2 min. The main PCR amplification cycle was preceded by an initial denaturation step of 94°C for 10 min and followed by an additional extension period of 72°C for 10 min. The PCR product was purified by Microcon YM-100 Centrifugal Filter Devices (Millipore Corporation, USA). Sequencing of the PCR product was performed in a single strand of DNA (ssDNA) using a Thermo Sequenase Cycle Sequencing Kit (USB Corporation, USA). A ssDNA was prepared using streptavidin magnetic beads in combination with a biotinylated primer (Malaivijitnond *et al.*, 2002). The nucleotide sequence was determined for both directions using a fluorescent automatic sequencer (DSQ-1, Shimadzu, Japan). Mitochondrial DNA sequences of rhesus originating from India (ID) and China (CN) and reared at the Primate Research Institute, Kyoto University, Japan were also analyzed and used as references for phylogenetic analysis.

TSPY gene

One pigtail and ten rhesus males (including suspected hybrid nos. 254 and 259) were studied for the TSPY gene which was amplified using the following primers: TSPY-A: 5'-AGC CAG GAA GGC CTT TTC TCG-3' and TSPY-B: 5'-CCA TGT AGC TCA GCA TGT CTT CAT-3' (Kim and Takenaka, 1996). The 5' of primer TSPY-A and the 3' of primer TSPY-B correspond to nucleotide number 324 and 1093, respectively, of the human sequence (Zhang *et al.*, 1992). Amplification was achieved using the AmpliTaq Gold™ Kit (Applied Biosystems, Japan). Amplification of the TSPY gene was carried out in a Perkin-Elmer Cetus Thermal Cycler (model 9600) for 30 cycles consisting of denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 60°C for 1 min, and extension at 72°C for 2 min. The main PCR amplification cycle was preceded by an initial denaturation step of 94°C for 10 min and followed by an additional extension period of 72°C for 10 min. The PCR product was electrophoresed through 2% Nusieve® GTG® Agarose gel electrophoresis (Rockland, USA) and the expected fragment was recovered from the gel utilizing glass powder (Easytrap™ Ver.2, Takara Bio Inc, Japan). Direct sequencing of the TSPY gene PCR product was performed using a Thermo Sequenase Cycle Sequencing Kit (USB Corporation, USA). The primer for sequencing was designed in our laboratory from the macaque TSPY gene sequences (Tosi *et al.*, 2000) as follows: TSPY-SEQ: 5'-GGA GGG AGA GGA GAA AGG GA-3' and TSPY-SEQR: 5'-TCC CTT TCT CCT CTC CCT CC-3'. The 5' of primer TSPY-SEQ and the 3' of primer TSPY-SEQR correspond to nucleotide number 546 of the rhesus sequence or number 548 of the pigtail sequence, respectively. The primers TSPY-SEQ and

TSPY-SEQR were FITC labeled (Japan Bioservice, Japan). A nucleotide sequence of TSPY gene was determined using a Shimadzu fluorescent automatic sequencer DSQ-1.

Analyses of sequence data

The nucleotide sequences were edited with the GENETYX program (version 5.0, SDC Tokyo, Japan) and aligned using Clustal X. Phylogenetic trees were constructed from the genetic distance data (Kimura's two parameters) based on the neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987) using the MEGA program (version 3). The mitochondrial DNA sequence of the Barbary macaque (*M. sylvanus*) (Arnason *et al.*, 2000) was used as an out-group reference for mtDNA analysis. TSPY gene sequences of rhesuses from India, China and Burma, and pigtail, longtail and stumptail (*M. arctoides*) from Thailand (Tosi *et al.*, 2000) were used as in-group and out-group references, respectively, for TSPY gene analysis.

Results

Pelage character and relative tail-length

The pigtail male at WTPMH had golden brown-agouti hair around the mid-dorsal region of the trunk with lighter color on the underparts (Figure 1) and a dark brown crown patch. Its slender and thinly-furred tail arched forward over its back and relative tail-length (tail-length/crown-rump length) was 36.6 per cent (Figure 2). From these characteristics, this individual was considered to be *M. nemestrina leonia* (Fooden, 1975). In rhesuses, the fur of the lower back was conspicuously more reddish and yellowish than that of the upper back. This pattern of pelage color is termed a "bipartite" pattern (Fooden, 1964), a key character for species identification of rhesus (Figure 1). However, the pelage color of rhesuses was lighter (L*) than that of pigtail (Figure 1). Crown hairs are directed smooothly posteriorly. Hairs on the side of the face usually form a small crest or whorl near the angle of the jaw. The facial skin is thinly haired and reddish. The tail is significantly longer ($57.0 \pm 4.2\%$, S.D.) than that of the pigtail and buffy. Relative tail-length, however, becomes gradually less with advancing age (Figure 2).

Both suspected hybrid (nos. 254 and 259) had a dark brown and anteriorly narrow crown patch and a thinly haired tail as for pigtails, but the relative tail-lengths were more similar (65.5 and 54.2 per cent, respectively) to rhesuses. Although the relative tail length of no. 259 is large, it was the smallest among individuals of the same age (Figure 2). Animal no. 259 showed no hair whorl at the cheek, whereas no. 254 did. On the other hand, no.254 showed a bipartite pattern of pelage color, but no.259 did not (Figure 1).

Maternal lineage of suspected hybrids resolved by mtDNA gene

From the phylogenetic tree of 454-bp of mt DNA sequences, rhesus macaques originating from WTPMH, Thailand, India and China are monophyletically separated from the Barbary macaque. However, the WTPMH rhesuses, including the two suspected hybrids, were separated from Indian and Chinese rhesuses and solidly clustered into 1 haplotype.

Paternal lineage of suspected hybrids resolved by TSPY gene

The TSPY gene of 711 bp in rhesuses and 713 bp in pigtail were sequenced. The sequences included parts of exon 1, exon 2 and the first intron. One-hundred per cent homology of 711-bp of TSPY nucleotide sequences was observed between the eight WTPMH rhesuses and Indian, Chinese and Burmese rhesuses (Tosi *et al.*, 2000). Furthermore, one-hundred per cent homology of 713-bp of TSPY gene between the WTPMH pigtail and Thai pigtail (Tosi *et al.*, 2000) was also observed. When the TSPY gene sequences were compared between WTPMH's rhesus and pigtail, 7 different nucleotide positions (the 78th, 153rd, 320th, 428th, 483rd, 626th, and 778th) and 2 successive nucleotide insertions (the 324th and 325th) were found in the pigtail (Figure 4). The TSPY gene sequence of no. 254 showed a one-hundred per cent homology with those of rhesuses, whereas no. 259 showed a one-hundred per cent homology with the pigtail. Monkey no. 254 was therefore phylogenetically placed into the rhesus group, and no. 259 was clustered with the pigtail group (Figure 5).

Discussion

Although there are many reports on rhesuses in Thailand (Fooden, 1971; Fooden, 2000), it is rather difficult to find the publications on their recent situation. We first found a natural troop of rhesus at Wat Tham Pa Mak Ho, northern Thailand (Malaivijitnond and Varavudhi, 2002) in 1998. A few years after our first census, a pet pigtail male was released into that troop. Based on morphological characters (Fooden, 1975), the pigtail was classified as *M. nemestrina leonina*. Rhesus and pigtail are classified into different species groups in the genus *Macaca* (Fooden, 1980) and from an ecological viewpoint, rhesuses are segregated from pigtail by habitat preference and climate (Fooden, 1982) such that they would not normally interbreed with each other in the wild. There are numerous reports on macaques, however, where single individual, usually male, temporarily associates with a troop of a different species (Bernstein and Gordon, 1980). As the home range of WTPMH troop is isolated from other macaque troops, of both the same and different species, by vast agricultural fields, the released pigtail had to stay in that troop. Being twice as heavy as rhesus adult males, he rapidly became the alpha male and acquired reproductive access to females.

WTPMH rhesuses exhibit the reproductive seasonality as found in rhesuses in general (Fooden, 2000), that is, a mating peak in fall and winter (November to March in WTPMH troop). During our census in March 2003, mating behaviors between the pigtail male and rhesus females were observed. In addition, three male juveniles exhibiting mixed morphological characters of rhesus and pigtail were found. To determine whether they were truly hybrid, two of them, nos. 254 and 259, were successfully trapped and inspected.

Although both had dark-brown fur at the vertex, a character of pigtails, monkey no.254 had rhesus characters such as a bipartite pattern (see Figure. 1) and whorl hair on the cheek. Analysis of the TSPY gene showed that the nucleotide sequence in monkey no.254 was one-hundred per cent homologous with that of rhesuses, whereas no.259 was one-hundred per cent homologous with that of the pigtail. It is worth noting that the relative tail-length of WTPMH rhesus is much longer (*ca.* 55 per cent) than the Indian (*ca.* 45 per cent) and Chinese (*ca.* 30 per cent) rhesuses, respectively (Fooden, 2000). The relative tail-length lessens with advancing age, and although no. 259 had a slightly longer tail than the adult average, juveniles of the same age as no. 259 had even longer tails. Thus, it can be concluded that the non-bipartite pattern of pelage color and the thinly-furred tail in the pigtail are dominant to that in rhesus, but the relative tail-length of more than 50 per cent in rhesus is dominant to that in pigtail, as observed in hybrid no.259. Although the shape of glans penis is used for classification of species-groups in the genus *Macaca* (Fooden, 1975), those in pigtail and rhesus are similar to each other and of moderate size (Fooden, 1975). This is no doubt facilitates the high incidence of hybridization between pigtail and rhesus that has been reported. In general, the body mass of male macaques is higher than females and, because of the bigger size of pigtail compared to rhesus (Bernstein and Gordon, 1980), most of the reported hybrids are the product of rhesus male and pigtail female matings. Our study might be the first report on a hybrid produced by a pigtail male and rhesus female in nature.

Typically, hybridization occurs when humans introduce exotic species into the range of rare species, or alter the habitat so that previously isolated species come into secondary contact. In Thailand, the hybridization of macaques precipitated by human activities has become a serious problem for the biodiversity of wild populations. Thai people, who sometimes rear macaques as pets, they usually release their pet monkeys to a troop of wild- or semi-wild macaques when they do not want to continue rearing them. In many localities of Thailand, released pet macaques have been found in natural troops of the same or different species, for example, a released female stumptail and pigtail were found in a longtail troop at Lopburi province, central Thailand, and a released female longtail was found in a stumptail troop at Petchaburi province, upper southern Thailand (*personal observation*). The release not only results in the hybridization, as in the WTPMH's rhesus troop, but also threatens the genetic integrity of the native troop via, so-called, "genetic pollution". Thus, tracing the evolutionary history of those populations will be complicated and difficult.

It is not always possible to detect hybridization by morphological characters, especially in the case of immature individuals. As shown in the present study, however, it is necessary to develop an appropriate way to detect and evaluate the influence of hybridization. Thus, MNR of mtDNA is clearly suitable material with which to investigate the maternal lineage of hybrids in WTPMH's monkeys. According to the phylogenetic analysis of mtDNA sequences, both suspected hybrids, nos.254 and 259, clustered with other WTPMH rhesus and were separated from Indian and Chinese rhesuses and Barbary macaques, hence, they were shown to be born from local rhesus females.

A Y-specific gene should be useful for tracing the paternal inheritance of hybrids because of non-recombining along most of its length (Dorit et al., 1995). So far, only seven functional genes have been isolated and/or mapped on the Y chromosome, and only the TSPY gene is strictly Y-specific and conserved in macaque species. Based on analysis of the TSPY gene, one-hundred per cent homology of the nucleotide sequences were revealed within the same species and fixed genetic differences, 7 different nucleotide positions and 2 successive nucleotide insertions, were found between rhesus and pigtail in the present study. These results demonstrate that the TSPY gene in the region of exon 1, exon 2 and the first intron is highly conserved in macaque species. A TSPY gene, hence, is evidently the choice of genetic marker to identify a male hybrid between macaque species. Although the uniparentally inherited non-recombining markers such as mtDNA and TSPY gene allow for direct examination of the maternal/paternal component of hybridization, the screening of other character sets, such as allozymes or other diploid DNA markers may provide better information.

Acknowledgement

This work was supported by the TRF/BIOTEC Special Program for Biodiversity Research and Training (grant R_245001), the Thailand Research Fund (grant RSA/02/2545) and Chulalongkorn University.

References

Affara N, Bishop C, Brown W, Cooke H, Davey P, Ellis N, et al (1996). Report of the second international workshop on Y chromosome mapping 1995. *Cytogenet Cell Genet* **73**: 33-76.

Arnason U, Gullberg A, Burguete AS, Janke A (2000). Molecular estimates of primates divergences and new hypotheses for primate dispersal and the origin of modern humans. *Hereditas* **133**: 217-228.

Bernstein IS, Gordon TP (1980). Mixed taxa introductions, hybrids and macaque systematics. In: Lindburg DG (ed.) *The Macaques: Studies in Ecology, Behavior and Evolution*. Van Nostrand Reinhold: New York. pp 125-147.

Dorit RL, Akashi H, Gilbert W (1995). Absence of polymorphism at the ZFY locus on the human Y chromosome. *Science* **268**: 1183-1185.

Evans BJ, Supriatna J, Melnick DJ (2001). Hybridization and population genetics of two macaque species in Sulawesi, Indonesia. *Evolution Int J Org Evolution.* **55**: 1686-1702.

Fooden J (1971). Report on primates collected in western Thailand January-April, 1967. *Fieldiana Zoology* **59**, pp. 62.

Fooden J (1975). Taxonomy and evolution of liontail and pigtail macaques (Primates: Cercopithecidae). *Fieldiana Zoology* **67**, pp. 169.

Fooden J (1976). Provisional classification and key to living species of macaques (Primates: *Macaca*), *Folia Primatol* **25**: 225 – 236.

Fooden J (1980). Classification and distribution of living macaques (*Macaca Lacepede*, 1799). In: Lindburg DG (ed.) *The Macaques: Studies in Ecology, Behavior and Evolution*. Van Nostrand Reinhold: New York. pp 1-9.

Fooden J (1982). Ecogeographic segregation of macaque species. *Primates* **23**: 574 – 579.

Fooden J (1997). Tail length variation in *Macaca fascicularis* and *M. mulatta*. *Primates* **38**: 221 – 231.

Fooden J (2000). Systematic review of rhesus macaque, *Macaca mulatta* (Zimmermann, 1780). *Fieldiana Zoology*. New series, **96**, pp.180.

Glaser B, Grutzner F, Willman U, Stanyon R, Arnold N, Taylor K, et al (1998). Simian Y chromosomes: Species-specific rearrangements of DAZ, RBM, and TSPY versus contiguity of PAR and SRY. *Mamm Genome* **9**: 226-231.

Hamada Y, Watanabe T, Iwamoto M (1992). Body color variation in macaques, especially in Japanese macaques (*Macaca fuscata*). *Primate Res* **8**: 1-23. (in Japanese with English abstract).

Hamada Y, Watanabe T, Takenaka O, Suryobroto B, Kawamoto Y (1988). Morphological studies of the Sulawesi macaques: I. Phyletic analysis of body color. *Primates* **29**: 65-80.

Hayasaka K, Horai S, Gojobori T, Shotake T, Nozawa K, Matsunaga E (1988). Phylogenetic relationship among Japanese, rhesus, Formosan, and crab-eating monkeys, inferred from restriction-enzyme analysis of mitochondrial DNAs. *Mol Biol Evol* **5**: 270-281.

Hayasaka K, Ishida T, Horai S (1991). Heteroplasmy and polymorphism in the major noncoding region of mitochondrial DNA in Japanese monkeys: association with tandemly repeatedn sequences. *Mol Biol Evol* **8**: 399-415.

Iwamoto M (1971). Morphological studies of *Macaca fuscata*: VI. Somatometry. *Primates* **12**: 151-174.

Iwamoto M, Hamada Y, Watanabe T (1984). Eruption of deciduous teeth in Japanese monkeys (*Macaca fuscata*). *J Anthrop Soc Nippon* **92**: 273-279.

Iwamoto M, Watanabe T, Hamada Y (1987). Eruption of permanent teeth in Japanese monkeys (*Macaca fuscata*). *Primate Res* **3**: 18-28.

Iwamoto M, Suryobroto B (1990). Palmar and plantar dermatoglyphics in macaques: a revised method for their description. *Primates* **31**: 431-438.

Kim HS, Takenaka O (1996). A comparison of TSPY genes from Y-chromosomal DNA of the great apes and humans: sequence, evolution, and phylogeny. *Am J Phys Anthropol* **100**: 301-309.

Kim HS, Hirai H, Takenaka O (1996). Molecular features of the TSPY gene of gibbons and Old World monkeys. *Chromosome Res* **4**: 500-506.

Kim HS, Kageyama T, Nakamura S, Takenaka O (1997). Nucleotide sequence of cDNA and the gene expression of testis-specific protein Y in the Japanese monkey. *Zoolog Sci* **14**: 609-614.

Lekagul B, McNeely JA (1988). *Mammals of Thailand*, 2nd edn. Darnsutha Press: Bangkok.

Malaivijitnond S, Varavudhi P (2002). The last possible troop of semi-wild rhesus macaque (*Macaca mulatta*) in Thailand. *Nat Hist J Chulalongkorn Univ* **2**: 59-61.

Malaivijitnond S, Takenaka O, Anukulthanakorn K, Cherdshewasart W (2002). The nucleotide sequences of the parathyroid gene in primates (suborder Anthropoidea). *Gen Comp Endocrinol* **125**: 67-78.

Martin R, Saller K (1957). *Lehrbuch der Anthropologie*. 3. Aufl., Bd. I. Stuttgart.

Morales JC, Melnick DJ (1998). Phylogenetic relationships of the macaques (Cercopithecidae: Macaca), as revealed by high resolution restriction site mapping of mitochondrial ribosomal genes. *J Hum Evol* **34**: 1–23.

Nei M (1973). Analysis of gene diversity in sub-divided populations. *Proc Natl Acad Sci USA* **20**: 3321-3323.

Saitou N, Nei M (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**: 406-425.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edn,. Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York.

Schempp W, Binkele A, Arnemann J, Glaser B, Ma K, Taylor K, et al (1995). Comparative mapping of YRRM- and TSPY-related cosmids in man and hominid apes. *Chromosome Res* **3**: 227-234.

Smith BH, Crummett TL, Brandt KL (1994). Ages of eruption of primate teeth: A compendium for aging individuals and comparing life histories. *Yearbook Phys Anthropol* **37**: 177-231.

Tosi AJ, Morales JC, Melnick DJ (2003). Paternal, maternal, and biparental molecular markers provide unique windows onto the evolutionary history of macaque monkeys. *Evolution Int J Org Evolution* **57**: 1419–1435.

Tosi AJ, Morales JC, Melnick DJ (2000). Comparison of Y chromosome and mtDNA phylogenies leads to unique inferences of macaque evolutionary history. *Mol Phylogenet Evol* **17**: 133–144.

Zhang JS, Yang-Feng TL, Muller U, Mohandas TK, de Jong PJ, Lau Y-FC (1992). Molecular isolation and characterization of an expressed gene from the human Y chromosome. *Hum Mol Genet* **1**: 717-726.

Zhang Y-P, Shi L-M (1993). Phylogenetic relationships of macaques as inferred from restriction endonuclease analysis of mitochondrial DNA. *Folia Primatol* **60**: 7–17.

Zhang Y-P, Shi L-M (1993). Phylogeny of rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) as revealed by mitochondrial DNA restriction enzyme analysis. *Int J Primatol* **14**: 587–605.

Figure legends

Figure 1. Pelage color by L*, a* and b* in rhesuses, the pigtail male and suspected hybrids (nos.254 and 259).

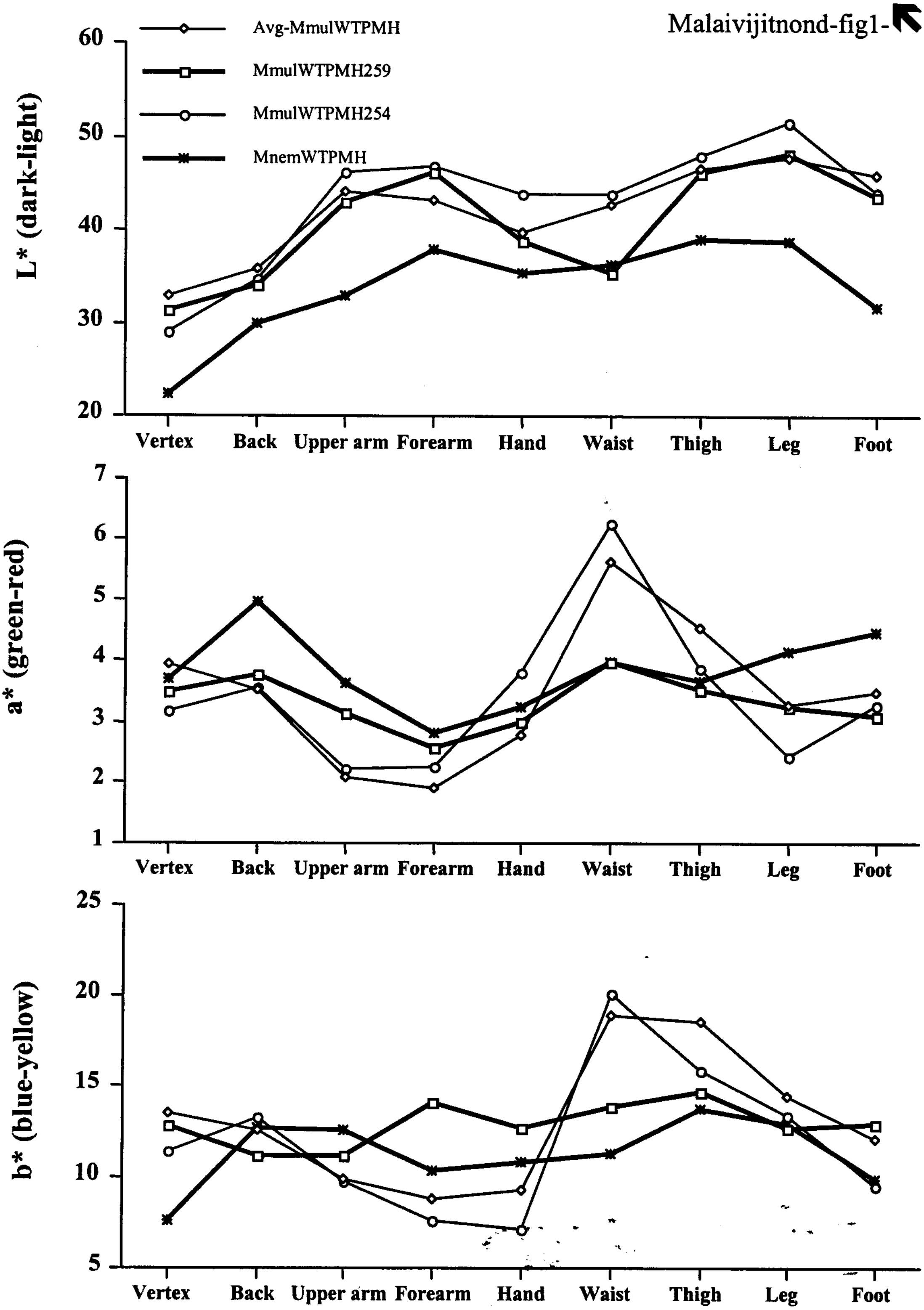
Figure 2. Relative tail-length (tail length/head and body length) in rhesuses, the pigtail male and suspected hybrids (nos.254 and 259).

Figure 3. The phylogenetic tree constructed from mitochondrial DNA (D-loop) sequences. Mmul and Msyl indicate rhesuses and Barbary macaques, respectively. WTPMH, ID and CN indicate the Wat Tham Pa Mak Ho, Indian and Chinese rhesuses, respectively.

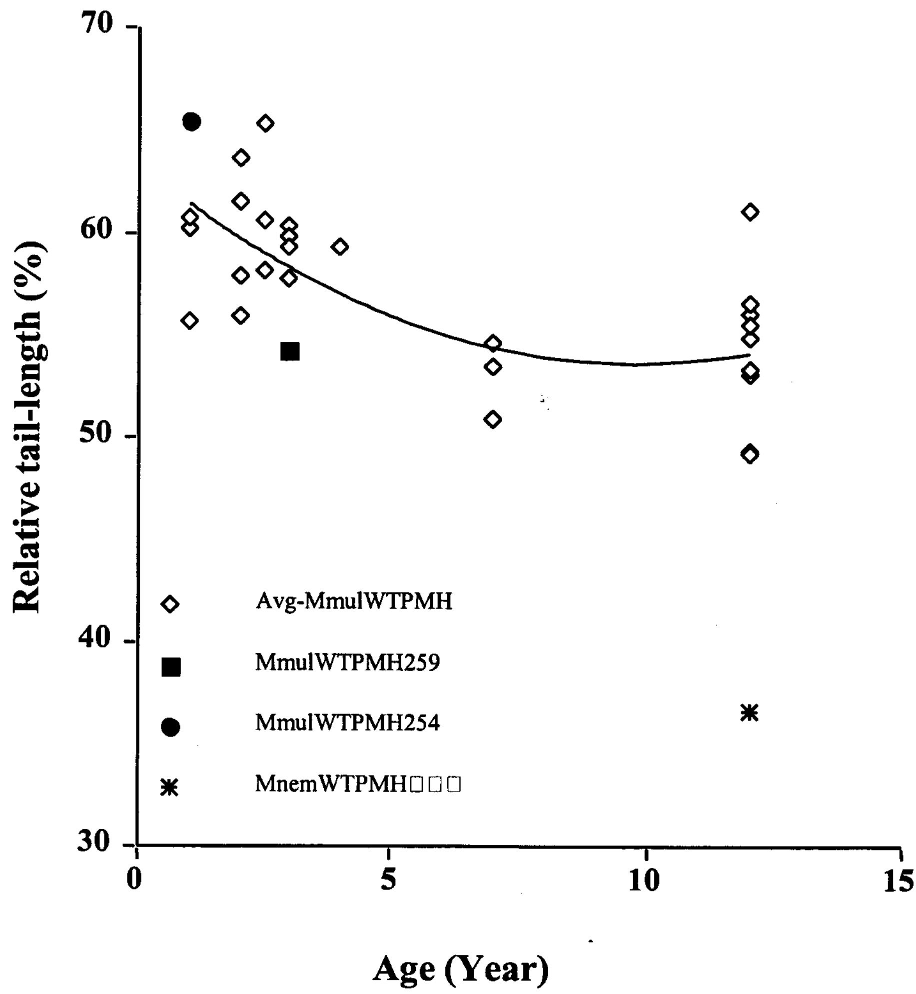
Figure 4. Nucleotide sequences of the TSPY gene in 8 male WTPMH rhesuses, 2 suspected hybrids and a male pigtail. Mmul and Mnem indicate the rhesus and pigtail macaques, respectively. Dashes (-) indicate gaps.

Figure 5. The phylogenetic tree constructed from TSPY gene sequences. Mmul, Mnem, Mfas and Marc indicate the rhesus, pigtail, longtail and stumptail macaques, respectively.

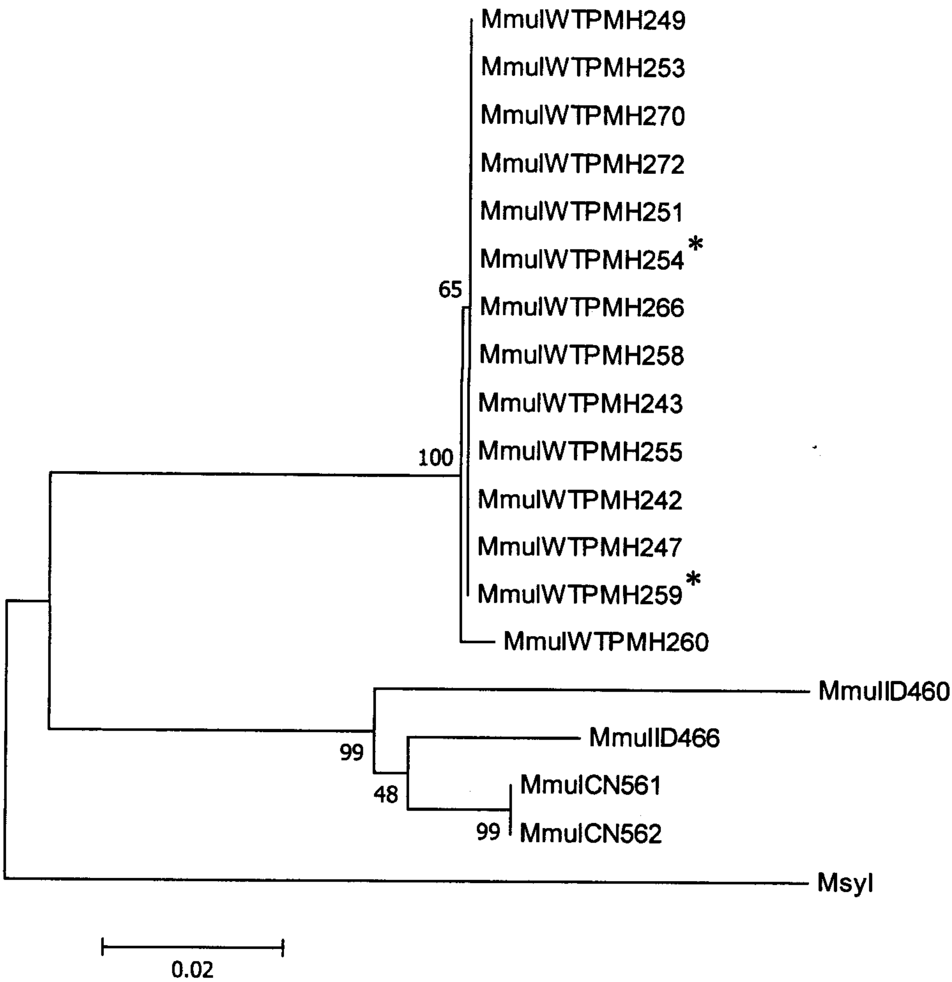
Malaivijitnond-fig1-



Malaivijitnond-fig2-



Malaivijitnond-fig3-



Malaivijitnond-fig4 -

```
           1                                                 50
Mmul242    GCCATCATCC AGAGCATGCC TGGCTTCTGG GCCAATGTTG TATCCTTTGC
Mmul244    .......... .......... .......... .......... ..........
Mmul247    .......... .......... .......... .......... ..........
Mmul267    .......... .......... .......... .......... ..........
Mmul266    .......... .......... .......... .......... ..........
Mmul253    .......... .......... .......... .......... ..........
Mmul250    .......... .......... .......... .......... ..........
Mmul248    .......... .......... .......... .......... ..........
Hybrid254  .......... .......... .......... .......... ..........
Hybrid259  .......... .......... .......... .......... ..........
Mnem       .......... .......... .......... .......... ..........

           51                                               100
Mmul242    AGTGTTTCTT CTGCTTTTCC AGTTGAGAGG TGCTCTTGGG AAGTGTAAGG
Mmul244    .......... .......... .......... .......... ..........
Mmul247    .......... .......... .......... .......... ..........
Mmul267    .......... .......... .......... .......... ..........
Mmul266    .......... .......... .......... .......... ..........
Mmul253    .......... .......... .......... .......... ..........
Mmul250    .......... .......... .......... .......... ..........
Mmul248    .......... .......... .......... .......... ..........
Hybrid254  .......... .......... .......... .......... ..........
Hybrid259  .......... .......... .......C.. .......... ..........
Mnem       .......... .......... .......C.. .......... .........

           101                                              150
Mmul242    AACTTACGGG CGGCTCGGCG TCGATGTGAC CATTTGGGGA ACACGGGTGA
Mmul244    .......... .......... .......... .......... ..........
Mmul247    .......... .......... .......... .......... ..........
Mmul267    .......... .......... .......... .......... ..........
Mmul266    .......... .......... .......... .......... ..........
Mmul253    .......... .......... .......... .......... ..........
Mmul250    .......... .......... .......... .......... ..........
Mmul248    .......... .......... .......... .......... ..........
Hybrid254  .......... .......... .......... .......... ..........
Hybrid259  .......... .......... .......... .......... ..........
Mnem       .......... .......... .......... .......... ..........

           151                                              200
Mmul242    GTGTCCACAG ACAAATGTGG CTGAAGAAAG CCAGAGCAGA CACGGGTACT
Mmul244    .......... .......... .......... .......... ..........
Mmul247    .......... .......... .......... .......... ..........
Mmul267    .......... .......... .......... .......... ..........
Mmul266    .......... .......... .......... .......... ..........
Mmul253    .......... .......... .......... .......... ..........
Mmul250    .......... .......... .......... .......... ..........
Mmul248    .......... .......... .......... .......... ..........
Hybrid254  .......... .......... .......... .......... ..........
Hybrid259  ..T....... .......... .......... .......... ..........
Mnem       ..T....... .......... .......... .......... ..........

           201                                              250
Mmul242    ATTTTCCTGC GTGCGTGAGA GAAACGCTTC ATGGTGCCAA GCAGCAGACG
Mmul244    .......... .......... .......... .......... ..........
Mmul247    .......... .......... .......... .......... ..........
Mmul267    .......... .......... .......... .......... ..........
Mmul266    .......... .......... .......... .......... ..........
Mmul253    .......... .......... .......... .......... ..........
Mmul250    .......... .......... .......... .......... ..........
Mmul248    .......... .......... .......... .......... ..........
Hybrid254  .......... .......... .......... .......... ..........
Hybrid259  .......... .......... .......... .......... ..........
Mnem       .......... .......... .......... .......... ..........

           251                                              300
Mmul242    TTTGGGGCAT CTTTCTGAAG AGCAGAAGCG AGTTCTCAGC AGAACACGTG
Mmul244    .......... .......... .......... .......... ..........
Mmul247    .......... .......... .......... .......... ..........
Mmul267    .......... .......... .......... .......... ..........
Mmul266    .......... .......... .......... .......... ..........
Mmul253    .......... .......... .......... .......... ..........
Mmul250    .......... .......... .......... .......... ..........
```

```
 Mmul248   .......... .......... .......... .......... ..........
Hybrid254  .......... .......... .......... .......... ..........
Hybrid259  .......... .......... .......... .......... ..........
     Mnem  .......... .......... .......... .......... ..........

           301                                              350
  Mmul242  TTGCTGTGAA TCAAGCTATT GTT--AAGGG ACTGTGACTG CTCCGCCTTG
  Mmul244  .......... .......... ...--..... .......... ..........
  Mmul247  .......... .......... ...--..... .......... ..........
  Mmul267  .......... .......... ...--..... .......... ..........
  Mmul266  .......... .......... ...--..... .......... ..........
  Mmul253  .......... .......... ...--..... .......... ..........
  Mmul250  .......... .......... ...--..... .......... ..........
  Mmul248  .......... .......... ...--..... .......... ..........
Hybrid254  .......... .......... ...--..... .......... ..........
Hybrid259  .......... .........C ...TT..... .......... ..........
     Mnem  .......... .........C ...TT..... .......... ..........

           351                                              400
  Mmul242  CCAGTCCGAT CTGGGACTGG GCTTCTTCGG GTATGAGCAG ATTCTGCCAG
  Mmul244  .......... .......... .......... .......... ..........
  Mmul247  .......... .......... .......... .......... ..........
  Mmul267  .......... .......... .......... .......... ..........
  Mmul266  .......... .......... .......... .......... ..........
  Mmul253  .......... .......... .......... .......... ..........
  Mmul250  .......... .......... .......... .......... ..........
  Mmul248  .......... .......... .......... .......... ..........
Hybrid254  .......... .......... .......... .......... ..........
Hybrid259  .......... .......... .......... .......... ..........
     Mnem  .......... .......... .......... .......... ..........

           401                                              450
  Mmul242  GCCTCAGACA CCGGCAGTTC TCTGCATATC GCCCCTCCCC GTGTCAGTGC
  Mmul244  .......... .......... .......... .......... ..........
  Mmul247  .......... .......... .......... .......... ..........
  Mmul267  .......... .......... .......... .......... ..........
  Mmul266  .......... .......... .......... .......... ..........
  Mmul253  .......... .......... .......... .......... ..........
  Mmul250  .......... .......... .......... .......... ..........
  Mmul248  .......... .......... .......... .......... ..........
Hybrid254  .......... .......... .......... .......... ..........
Hybrid259  .......... .......... .......G.. .......... ..........
     Mnem  .......... .......... .......G.. .......... ..........

           451                                              500
  Mmul242  GGTCAGCCTC ACAATGATAC ACCCTCGGTG AACCCCGAGA GGTCTGAATT
  Mmul244  .......... .......... .......... .......... ..........
  Mmul247  .......... .......... .......... .......... ..........
  Mmul267  .......... .......... .......... .......... ..........
  Mmul266  .......... .......... .......... .......... ..........
  Mmul253  .......... .......... .......... .......... ..........
  Mmul250  .......... .......... .......... .......... ..........
  Mmul248  .......... .......... .......... .......... ..........
Hybrid254  .......... .......... .......... .......... ..........
Hybrid259  .......... .......... .......... ..A....... ..........
     Mnem  .......... .......... .......... ..A....... ..........

           501                                              550
  Mmul242  CAGGGGGAGG GAGAGGAGAA AGGGAGGTCA TTCATGGATG CAGATCTGAA
  Mmul244  .......... .......... .......... .......... ..........
  Mmul247  .......... .......... .......... .......... ..........
  Mmul267  .......... .......... .......... .......... ..........
  Mmul266  .......... .......... .......... .......... ..........
  Mmul253  .......... .......... .......... .......... ..........
  Mmul250  .......... .......... .......... .......... ..........
  Mmul248  .......... .......... .......... .......... ..........
Hybrid254  .......... .......... .......... .......... ..........
Hybrid259  .......... .......... .......... .......... ..........
     Mnem  .......... .......... .......... .......... ..........

           551                                              600
  Mmul242  AAAATCCCCT AGCCGCCCCT CTGGGTGCTC TTAGGCCTTC CCCGTTGCTT
  Mmul244  .......... .......... .......... .......... ..........
  Mmul247  .......... .......... .......... .......... ..........
  Mmul267  .......... .......... .......... .......... ..........
  Mmul266  .......... .......... .......... .......... ..........
```

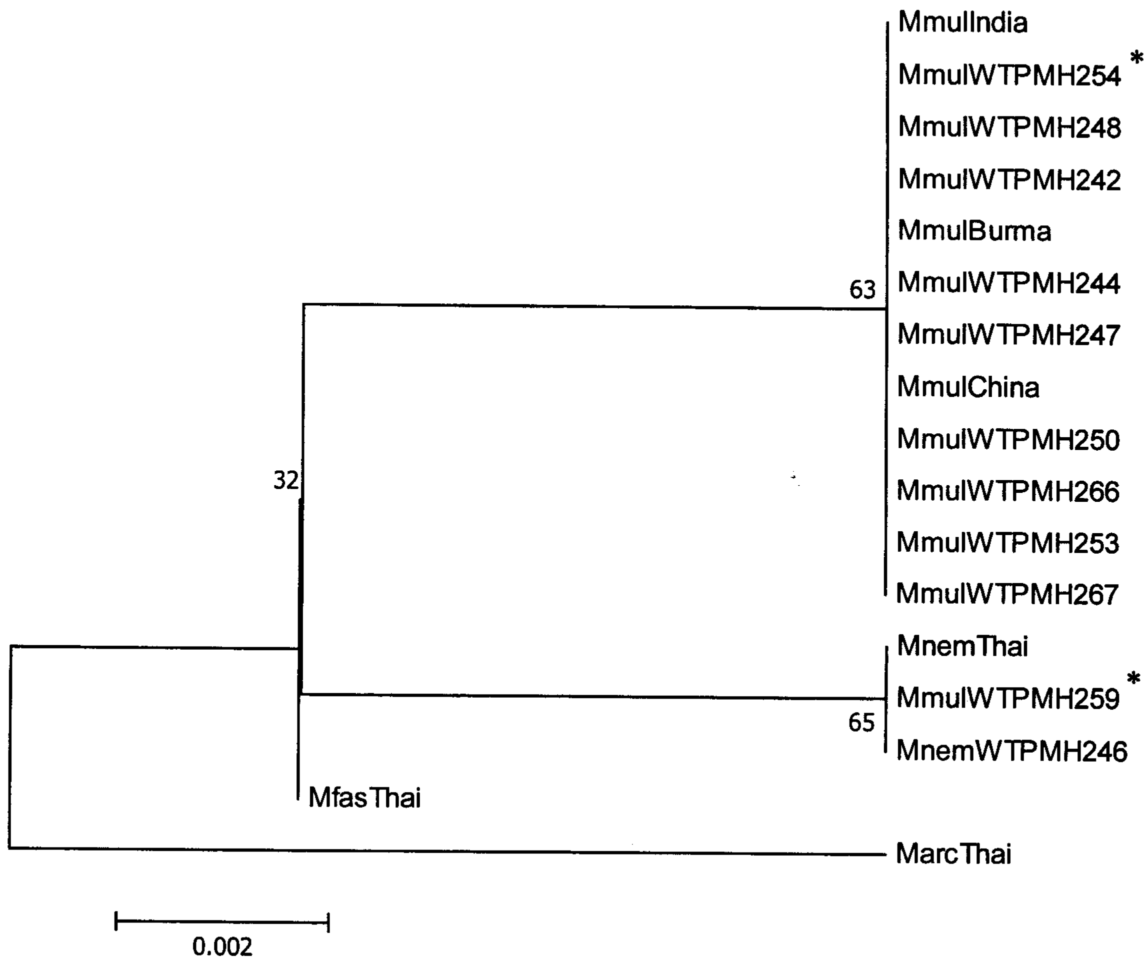
```
     Mmul253  .......... .......... .......... .......... ..........
     Mmul250  .......... .......... .......... .......... ..........
     Mmul248  .......... .......... .......... .......... ..........
   Hybrid254  .......... .......... .......... .......... ..........
   Hybrid259  .......... .......... .......... .......... ..........
        Mnem  .......... .......... .......... .......... ..........

              601                                                650
     Mmul242  CTAGCTTTTC TTTCCGTTGC ATCTCAAGGC TCTTTGACCT CAATCAGATT
     Mmul244  .......... .......... .......... .......... ..........
     Mmul247  .......... .......... .......... .......... ..........
     Mmul267  .......... .......... .......... .......... ..........
     Mmul266  .......... .......... .......... .......... ..........
     Mmul253  .......... .......... .......... .......... ..........
     Mmul250  .......... .......... .......... .......... ..........
     Mmul248  .......... .......... .......... .......... ..........
   Hybrid254  .......... .......... .......... .......... ..........
   Hybrid259  .......... .......... .....G.... .......... ..........
        Mnem  .......... .......... .....G.... .......... ..........

              651                                                700
     Mmul242  GCAAACCACC CTCAGATGTC GGCCCTGCTC ACTGACCAAG ATGAAGACAT
     Mmul244  .......... .......... .......... .......... ..........
     Mmul247  .......... .......... .......... .......... ..........
     Mmul267  .......... .......... .......... .......... ..........
     Mmul266  .......... .......... .......... .......... ..........
     Mmul253  .......... .......... .......... .......... ..........
     Mmul250  .......... .......... .......... .......... ..........
     Mmul248  .......... .......... .......... .......... ..........
   Hybrid254  .......... .......... .......... .......... ..........
   Hybrid259  .......... .......... .......A.. .......... ..........
        Mnem  .......... .......... .......A.. .......... ..........

              701        713
     Mmul242  GCTGAGCTAC ATG
     Mmul244  .......... ...
     Mmul247  .......... ...
     Mmul267  .......... ...
     Mmul266  .......... ...
     Mmul253  .......... ...
     Mmul250  .......... ...
     Mmul248  .......... ...
   Hybrid254  .......... ...
   Hybrid259  .......... ...
        Mnem  .......... ...
```

Malaivijitnond-fig5-



TITLE: Morphometric and pelage color characteristics of free ranging rhesus macaques in northeastern Thailand: Are they rhesuses or hybrids?

AUTHORS: Yuzuru HAMADA*[1], Nontakorn Urasopon*[2], Islamul Hadi*[3], and Suchinda Malaivijitnond*[2].

Affiliations:

*1: Morphology Section, Primate Research Institute, Kyoto University, Inuyama, Aichi, 484-8506 JAPAN. Phone: +81-568-63-0521 / Fax: +81-568-61-5775 / e-mail: hamada@pri.kyoto-u.ac.jp

2: Primate Research Unit, Dept. of Biology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330, Thailand

3: Dept. of Biology, Faculty of Science and Mathematics, Bogor Agricultural University, Jalan Pajajaran Bogor 16143, INDONESIA

Short Title:

Morphology of Thai rhesus-like macaques

Correspondence:

- Yuzuru HAMADA
- Morphology Section, Primate Research Institute, Kyoto University, Inuyama, Aichi, 484-8506 JAPAN
- hamada@pri.kyoto-u.ac.jp
- +81-568-63-0521

ABSTRACT The rhesus (*Macaca mulatta*) and long-tailed macaques (*M. fascicularis*) belong to the same species-group, and are parapatric at the boundary of 15 – 20°N on the Indochinese peninsula. Probable hybrids between the two hybrid species have been reported from this boundary zone in Thailand, Laos and Vietnam, but the exact state of intergradation has not been studied. At a locality close to the boundary, viz., Wat Tam Pa Mak Ho (WTPMH), Wang Saphun district, Loei province, northeastern Thailand (17°14' N, 101°47'E), we collected somatometrics analyzed from 12 adult females and pelage color readings from 30 males and females of older than 1 year. Morphology (body size and proportions) and pelage color were compared with those of captive Chinese- and Indian-derived rhesuses and with Thai long-tailed macaques. WTPMH macaques are smaller than Chinese- and Indian-derived rhesuses by 10 to 20 %, but have a greater relative tail length (ca. 53 %). They show the "bipartite" pelage color pattern typical of the rhesus species. They are larger than the long-tailed macaques, but have a much shorter relative tail length. Our results offer little evidence that the WTPMH macaque group is a hybrid one. A survey to determine the exact distribution and the range of variation of macaques at the boundary zone is urgently needed because their habitat is being rapidly destroyed by deforestation and they are under other artificial disturbances.

Keywords: Thailand, *Macaca mulatta*, *Macaca fascicularis*, pelage color, morphometrics, hybridization

INTRODUCTION

The rhesus macaque (*Macaca mulatta*, hereafter rhesus) has a very wide geographical range from Afghanistan in the west, to Vietnam in the east, to China in the north (Fooden, 2000). The number of subspecies is debatable, ranging from four (Napier and Napier, 1967) to six (Groves, 2001) to seven (Zhang and Shi, 1993) to 15 (Fooden, 2000). The Chinese rhesuses alone have been classified into six subspecies based on craniometric data (Jiang *et al.*, 1991). Traditionally, the rhesus has been assigned to the *fascicularis* species-group (Fooden, 1976), but based on molecular comparisons (Morales and Melnick, 1998), it has been placed, along with the Japanese (*M. fuscata*) and Taiwanese macaque (*M. cyclopis*) into its own species (*mulatta*) group (Groves, 2001). Most recently, however, again with molecular data, the traditional classification has been supported (Tosi *et al.*, 2003); the authors offered an explanation for their results, recent introgression between rhesus and long-tailed macaques.

In many localities rhesuses are sympatric with other macaque species that are not members of the *fascicularis* species-group (Lekagul and McNeely, 1988), such as pig-tailed (*M. nemestrina*), stump-tailed, (*M. arctoides*) or assamese macaques (*M. assamensis*; Fooden, 1980). Generally, rhesuses are not sympatric with the long-tailed macaque (*M. fascicularis*), except in cases of limited local sympatry (Eudey, 1980). Rhesus and long-tailed macaques are, however, parapatrically distributed within a boundary zone (15 – 20 °N) on the Indochinese peninsula. It is probable that here is, and has been, local hybridization (introgression) between the two species. Within the zone rhesuses lie and have adapted to a sub-tropical climate and the long-tailed macaques, south of the zone where they have adapted to a more tropical climate.

Fooden (1964, 1997) depicted specimens of probable "hybrids", that were found within the zone, in central-western and northeastern Thailand, central-western Vietnam, and southern Laos. The localities are in the mountainous areas close to, or included in, the Dawna Range and Annamitique Mountain Chain where "refugia" supposedly existed in the glacial period (Eudey, 1980). Obviously, different evolutionary scenarios can be reconstructed for rhesus populations (Delson, 1980; Hayasaka *et al.*, 1996; Morales and Melnick, 1998; Fooden, 2000; Tosi *et al.*, 2003).

The substantial morphological variation observed within the wide distribution of the rhesus species has not been studied in detail. In a review of the natural history of the species, Fooden (2000) described some of the variation, based on museum materials (skull and pelage) and collectors' measurements. Although some other morphometric studies have been made, e.g. craniometric study on Chinese rhesuses from various localities (Jiang *et al.*, 1991) and a somatometric study of artificially rearred Chinese- and Indian-derived rhesuses (DeRousseau and Reichs, 1987; Turnquist and Kessler, 1989; Clarke and O'Neil, 1999), study on free-ranging rhesuses has not been made in Indochinese peninsula. Especially lacking is information on the "rhesus-like" macaque populations that inhabit the Indochinese peninsula, and have been suspected to be hybrids between pure rhesuses (*Macaca mulatta*) and long-tailed macaques (*M. fascicularis*), since the report by Fooden (1964). Fooden (2000) classified rhesuses into eastern and western groups, mainly on the basis of tail length, but Indochinese rhesuses have tails longer than either, possibly attributable to hybridization of parapatric *M. mulatta* and *M. fascicularis* (Fooden, 1964, 1995, 1997, 2000). This conjecture is partly supported by the molecular phylogenetic data (Tosi *et al.*, 2003), that suggest recent introgression between the two species. To date, however, the hybridization hypothesis has not been explored in a free-ranging troop from the supposed hybrid zone. Just such a troop was recently reported from Wat Tam Pa Mak Ho, a Buddhist temple, in northeastern Thailand (Malaivijitnond and Varabudhi, 2002). We first surveyed and subsequently employed a temporary catch and release of the troop in March, 2003 and collected morphological, pelage and related data. Here we compare the results with data from captive Chinese- and Indian-derived rhesuses and free-ranging Thai long-tailed macaques.

Materials and Methods

Subjects

The study animals belonged to the free-ranging macaque troop of Wat Tam Pa Mak Ho temple (WTPMH), Wang Saphun district, Loei province, northeastern Thailand, 17°14'N and 101°47'E (Figure 1). There, the troop occupies a limestone rocky hill covered by spiky shrubs, bamboo, and several species of fig trees. The forested area of about 12.25 ha is surrounded by wide agricultural fields that isolate the WTPMH troop from others. The troop consisted of 110 individuals, including one pig-tailed macaque, the α-male which is a released pet. Three juveniles were suspected hybrid offspring of this male. Developmental age-classes were determined according to the method of Dittus (1980). Only sub-adult and adult individuals were sexed (Table 1).

We trapped 33 individuals from the troop, including the pig-tailed macaque and two of the suspected hybrids in March, 2003. Ages were estimated from dental eruption status (Smith *et al.*, 1994). The sex-age composition of the trapped sample was representative of that of the total troop.

<< Insert Figure 1 and Table 1 around here >>

We compared the somatometric and pelage color data from WTPMH macaques with those from captive Chinese- and India-derived rhesuses, born and reared at the Primate Research Institute of Kyoto University, Inuyama, Japan. We also compared the somatometric and pelage color data from WTPMH macaques with those from two free-ranging Thai long-tailed macaque troops: WTT-long-tailed (Wat Tam Taep Ban Dan, 15° 42'N and 101° 02'E) from Petchabun province which lies close to the supposed boundary zone of *M. mulatta* and *M. fascicularis*, and WKH-long-tailed (Wat Kuha Phimuk, 6° 31'N and 101° 21'E) from Yala province which lies in the southernmost of Thailand. Table 2 lists the number of subjects.

<< Insert Table 2 around here >>

Somatometry

As a few individuals of adult male in WTPMH troop and only a single individual was trapped, we confined the somatometric analysis to WTPMH females >= 7 years of age (n=12). Seventeen morphological characters (Table 3a) were measured using balance, anthropometer, spreading caliper, sliding caliper and tape, following the method of Martin and Saller (1957) with slight modification (c.f., Iwamoto, 1971). Measurements taken were body mass, nine post-cranial measurements of length (crown-rump, anterior trunk, tail, upper arm, forearm, ulnar aspect of hand, thigh, leg, and foot), three measurements of width (thoracic and thigh girths, and foot) and three craniofacial dimensions (head length, head and bizygomatic widths).

Body proportions were determined from relative tail, forelimb and lower-limb lengths and imtermembral index (Table 3b).

<< Insert Table 3 around here >>

The average and standard deviation were calculated for each somatometric measurement and proportion using Excel (Microsoft, Co. Ltd), and the significance of differences between averages were examined by t-test modified with Bonferroni method (Sokal and Rohlf, 1995). The size of WTPMH macaques, Indian-derived rhesus and WTT-long-tailed were then described as a percent of Chinese-derived rhesus, e.g., (WTPMH average) / (Chinese average) * 100. The Chinese-derived rhesuses were chosen as they comprised the largest sample with numbers ranging from n=14 to n=36, depending on the measurement, and the major length dimensions used to calculate body proportions was n >= 23. The WKH-long-tailed showed similar body size and proportion with those of WTT-long-tailed, excepting body mass and relative tail length. The comparison of morphological traits between rhesuses and long-tailed macaques will be separately made.

As the many somatometric variables are not independent, Principal Component Analysis (PCA, S-Plus 4.0, MathSoft Co. Ltd.) was applied to the major length data (crown-rump, upper arm, forearm, ulnar aspect of hand, thigh, leg, and foot lengths, foot breadth, head length and breadth, and bizygomatic breadth).

Pelage color

Pelage color was measured with a color reflectometer (Color Analyzer[TR], Minolta Co. ltd.) (Hamada et al., 1988, 1992), that emits a standardized light (D65) and measures the light reflected through a hole of 8 mm in diameter. Color is expressed by three parameters (L*, a*, and b*); parameter L* stands for lightness, ranging from 0 (darkest) to 100 (lightest); a* for the hue of red (+60) to green (-60); and b* for the hue of yellow (+60) to blue (-60). We measured at the vertex of the head, back (interscapular), lateral upper arm and forearm, dorsum of hand, waist (suprailiac), lateral thigh and leg, and dorsum of foot. Pelage color pattern is completed by 1 year of age (Hamada *et al.*, 1992) and there are no sex differences, and therefore, the sample for the analysis was > 1 year of age, and sex-combined (n=27). The pig-tailed and the two suspected hybrids were excluded from the analyses.

RESULTS

Somatometry

Female WTPMH macaques, with average body mass of 6.39 kg (Figure 2), were significantly smaller than female Chinese-derived rhesuses with respect to all somatometric variables (Table 3a). Plotted as a percent of Chinese rhesus size (Figure 3), average WTPMH values ranged from 85% (anterior trunk length) to 92.95% (thoracic girth). The patterns of sizes in WTPMH, Indian-derived rhesus and WTT-long-tailed were similar with each other. Average ratios (percents) which were obtained from all of somatometrics excepting body mass and tail length, were 89.1%, 95.6%, and 81.0% in WTPMH, Indian-derived rhesuses, and WTT-long-tailed macaques, respectively. Body proportions of the four macaque groups (Table 3b) were similar with each other. WTPMH macaques tended to have relatively longer limbs.

<< Insert Figures 2 and 3 around here >>

The WTPMH macaques have significantly longer tails than the two rhesus groups. Their relative tail lengths was as long as 53.9% ±3.35 (sd), significantly longer than those of Chinese- (36.5%±2.85) and Indian-derived rhesuses (44.2%±4.91), but much smaller than those of WTT-long-tailed (112.5% ±5.58, Figure 4).

<< Insert Figure 4 around here >>

The results of PCA with 11 somatometric variables are listed in Table 4. Figure 5 shows plottings of the first two principal component scores (PC scores). As the PC-1 had positive and large loadings with all variables, it expresses "body size". The PC-1 explains as much as 93.4% of all variance, meaning that the great majority of variation among four macaque groups is size and shape difference is rather minor. This is also inferred from the similarity in the body proportions (Table 3b). The plottings of WTPMH macaques locate between those of Chinese- and Indian-derived rhesuses and WTT-long-tailed in the axis of PC-1. WTPMH macaques have slightly larger PC-2 scores (average = 4.73) than other three groups, WTT-fascicularis (-3.67), Chinese-derived rhesuses (1.26), and Indian-derived rhesuses (-5.65). As limb segment lengths other than cheiridia have positive and large loadings on PC-2, WTPMH macaques are considered to have proportionally longer limbs.

<< Insert Table 4 and Figure 5 around here >>

Pelage Color

Profiles of pelage color of the WTPMH macaques, Chinese-derived rhesus, WTT- and WKH-long-tailed groups are shown in Figure 6. In the profile of L* (lightness), the four macaque groups show similar pattern, that is, the vertex of the head and back are the darkest and the upper arm and leg are the lightest areas. It is worthwhile noting that the lightness profiles of WTPMH macaques and WTT-long-tailed were almost identical. WKH-long-tailed was the darkest, and Chinese-derived rhesus was darker than WTPMH macaques.

<< Insert Figure 6 around here >>

Considerable differences were found in profiles of hue (a*; red-green and b*; yellow-blue) between the four macaque groups. As the patterns of a* and b* are similar with each other, variation in that of b* is described here. Although b* values of Chinese-derived rhesuses were significantly smaller than those of WTPMH in the upper half of body (from vertex to hand), their values in the lower half of body were comparable to those of WTPMH. On the other hand, although the b* values of WTT-long-tailed are comparable with those of WTPMH in the upper half of body, their values in the lower-half of body is much smaller than those of WTPMH. Similar pattern was found between WTT- and WKH-long-tailed in both of a* and b*.

PCA was applied on the five groups with the L* and b* at the vertex of head, back, waist, and thigh. As shown in the loadings (Table 5), the PC-1 which explained 58.5% of all variances showed higher correlation with the lightness, and PC-2 (14.2% of all variances) shows high correlation with the b*'s at waist and thigh. Plottings of PC-1 and -2 (Figure 7) clearly show that the rhesus and long-tailed macaques are separated by PC-2, that is, the former has positive scores and the latter has negative ones. WTPMH macaques have positive PC-1 and -2 scores. WTT-long-tailed is much greater (lighter) than WKH-long-tailed.

<< Insert Table 5 and Figure 7 around here >>

DISCUSSION

The Indochinese peninsula is a particular important locality for the elucidation of macaque evolution, because it is the intermediate area between mainland Asia and the insular part of Southeast Asia. The distribution and biological characters of the resident macaque species of the peninsula have been determined not only by environmental conditions as they exist today, but also by past glacial and interglacial alternations with their accompanying refugia (Eudey, 1980). According to one evolutionary scenario (Fooden, 2000), the rhesus ancestor had once dispersed north to China, where it speciated into Japanese (*M. fuscata*) and Taiwanese (*M. cyclopis*) macaques. When the glacial period began, the rhesus migrated south, where they remained confined to the Indochinese peninsula and its vicinity until the subsequent interglacial period, when some rhesus populations again dispersed to the north and west. Thus, throughout their history, ancestral rhesus populations could have exchanged genes with those of other macaque populations (intergradation and introgression), and the biological characters of the modern rhesus would have been produced by this complicated history. If we follow this scenario, the eastern (Chinese) and western (Indian) rhesus groups are rather new forms (Fooden, 2000), whereas the populations inhabiting the Indochinese peninsula are a mixture of old and new rhesus forms and within the boundary zone may have mixed with other macaque species, e.g., *M. fascicularis*. If in fact they mixed, traditional concepts of species, e.g., "Biological Species Concept" (Mayr, 1942) and "Recognition Concept" (Paterson, 1985), are not readily applied. The taxonomic difficulty is especially apparent for macaque "species", which can produce viable hybrid offspring in captivity (e.g., Bernstein & Gordon, 1980) or in the wild, possibly in a disturbed boundary area as was observed for *M. tonkeana* and *M. hecki* in the central part of Sulawesi island (Groves, 1980; Watanabe et al., 1991;

Bynum and Bynum, 1992). However, there are not enough knowledge about the biological characteristics of *M. mulatta* and *M. fascicularis* in the boundary zone in Indochinese peninsula.

Of help in the identification of a species are biological characters, especially morphological features and pelage color (Fooden, 1980). For example, the rostrum is less protruded and the median sagittal crest less developed in *M. mulatta* than are these same features in *M. fascicularis* (Fooden, 2000). Tail length, including relative tail length (against head-and-body length or crown-rump length) is one of the most important morphological characters to distinguish between *M. mulatta* and *M. fascicularis*, viz., relative tail length >= 90% in *M. fascicularis* and <= 60% in *M. mulatta* (Fooden and Albrecht, 1997). Pelage is also a valuable feature, in that rhesus possesses a distinct "bipartite" pattern (Fooden, 1964) as contrasted to the more homogeneous pattern of the long-tailed macaques.

The present study showed that the morphological characteristics of WTPMH macaques, which inhabit within the supposed boundary zone between *M. mulatta* and *M. fascicularis* in Indochinese peninsula, can be summarized as follows:

- Body size: smaller than captive Chinese- and Indian-derived rhesus by 10%-20%, but larger than Thai long-tailed macaques.
- Body proportion: quite similar not only to Chinese- and Indian-derived rhesuses but also to long-tailed macaques, with slightly relative longer extremities.
- Tail length: significantly longer than those of Chinese- and Indian-derived rhesuses.
- Relative tail length: highly significantly longer (53.9%) than those of Chinese-

(36.5%) and Indian- derived rhesuses (44.2%), but far shorter than that of WTT-long-tailed (112.5%).

- Pelage color: "bipartite" color pattern as in Chinese- and Indian-derived rhesuses, but WTPMH macaques are lighter and more vivid than Chinese- and Indian-derived rhesus, especially at the waist and lateral aspects of thigh and leg.

The relative tail length (53.9%) of WTPMH is similar to the reported average value for Thai and Laotian rhesuses (ca. 100 °E, 53.0%±4.9, n=8, Fooden, 2000). Although their lighter pelage color cannot be explained by Gloger's rule, their body size and proportion may be explained by such zoogeographical rules as Bergman's and Allen's rules. Thus, there are no morphological characters that clearly identify the WTPMH macaques as a hybrid population and we conclude that hybridization if, in fact, it has occurred, has not been extensive. Thus, we need to gain some more knowledge on other macaque populations inhabiting the boundary area of *M. mulatta* and *M. fascicularis* in Indochinese peninsula.

In addition to the paucity of studies on biological characters of macaques, the current distribution of macaque species in Indochinese peninsula is also not known well (Aggimarangsee, 1992). Deforestation has been intensively carried out in Thailand since the 1960's with the result that macaque troops are now confined to patchy forests or temples, considerably isolated from one another. As exemplified by the presence of the pig-tailed macaque male in WTPMH troop and the supposed hybrid infants sired by this male, unique artificial disturbances can also impact the troops. These ecological crises also pervade other Indochinese countries, which confirm not only the urgent necessity of census of macaques but also the assessment of the extant biological diversity in Indochinese countries.

Acknowledgments We thank to Dilok Yanklin, Chalis Mungsuwa, and Anu Kulaboot for their help during field study. We would like to express sincere thanks to monks at the Wat Tam Pa Mak Ho who permitted our research and offered much of help to us. This study was financially supported by the TRF/BIOTEC Special Program for Biodiversity Research and Training (grand R-245001) and the Thailand Research Fund (grand RSA/02/2545) from Thailand (given to SM), and partly by 21st Century COE Program, "Formation of a Strategic base for the multidisciplinary study of biodiversity" (given to YH) from the ministry of Education, Culture, and Scientific Techniques, Japan.

References

Aggimarangsee N. 1992. Survey for semi-tame colonies of Macaques in Thailand. Nat Hist Bull Siam Soc 40:103-166.

Bernstein IS, Gordon TP. 1980. Mixed Taxa Introductions, Hybrids and Macaque Systematics. In: Lindburg DG editor. The Macaques: Studies in Ecology, Behavior and Evolution. New York: Van Nostrand Reinhold. p 125 – 147.

Bynum EL, Bynum DZ. 1992. Morphological intergradation between *Macaca tonkeana* and *Macaca hecki* in central Sulawesi, Indonesia. Amer J Primatol 27: 20-21.

Clarke MR, O'Neil JAS. 1999. Morphometric Comparison of Chinese-Orign and Indian-Derived Rhesus Monkeys (*Macaca mulatta*). Amer J Primatol 47: 335-346.

Delson E. 1980. Fossil Macaques, Phyletic Relationships and s Scenario of Deployment. In: Lindburg DG, editor. The Macaques: Studies in Ecology, Behavior and Evolution. New York: Van Nostrand Reinhold. p 10-29.

DeRousseau CJ, Reichs KJ. 1987. Ontogenetic Plasticity in Nonhuman Primates: I. Secular Trends in the Cayo Santiago Macaques. Amer J Phys Anthropol 73:279-287.

Dittus WPJ. 1980. The Social Regulation of Primate Populations: A Synthesis. In: Lindburg DG, editor. The Macaques: Studies in Ecology, Behavior and Evolution. New York: Van Nostrand Reinhold. p 263-286.

Eudey AA. 1980. Pleistocene Glacial Phenomena and the Evolution of Asian Macaques. In: Lindburg DG, editor. The Macaques: Studies in Ecology, Behavior and Evolution. New York: Van Nostrand Reinhold. p 52-83.

Fooden J. 1964. Rhesus and Crab-Eating Macaques: Intergradation in Thailand. Science 143: 363-365.

Fooden J. 1976. Provisional Classification and Key to Living Species of Macaques (Primates: *Macaca*). Folia Primatol 25:225-236.

Fooden J. 1980. Classification and Distribution of Living Macaques (*Macaca* Lacepede, 1799). In: Lindburg DG, editor. The Macaques: Studies in Ecology, Behavior and Evolution. New York: Van Nostrand Reinhold. p 1-9.

Fooden J. 1982. Ecogeographic Segregation of Macaque Species. Primates 23:574-579.

Fooden J. 1995. "Systematic Review of Southeast Asian Longtail Macaques, *Macaca fascicularis* (Raffles, [1821])". Fieldiana Zoology 81:1-206.

Fooden J. 1997. Tail Length Variation in *Macaca fascicularis* and *M. mulatta*. Primates 38:221-231.

Fooden J. 2000. Systematic Review of the Rhesus Macaque, *Macaca mulatta* (Zimmermann, 1780). Fieldiana Zoology 96:1-180.

Groves CP. 1980. Speciation in *Macaca*: The View from Sulawesi. In: Lindburg DG, editor. The Macaques: Studies in Ecology, Behavior and Evolution. New York: Van Nostrand Reinhold. p 84-124.

Groves CP. 2001. Primate Taxonomy. Washington: Smithsonian Institution Press. 350 p.

Hamada Y, Watanabe T, Iwamoto M. 1992. Body Color variation in macaques, especially in Japanese macaques (*Macaca fuscata*). Primate Research 8:1-23 (in Japanese with English abstract).

Hamada Y, Watanabe T, Iwamoto M. 1996. Morphological variation among local populations of the Japanese macaque (*Macaca fuscata*). In: Shotake T, Wada K, editors. Variations in the Asian macaques. Tokyo: Tokai University Press. p 97-115.

Hamada Y, Watanabe T, Takenaka O, Suryobroto B, Kawamoto Y. 1988. Morphological Studies of the Sulawesi Macaques: I. Phyletic Analysis of Body Color. Primates 29:65 - 80.

Hayasaka K, Fujii K and Horai S. 1996. Molecular Phylogeny of Macaques: Implications of Nucleotide Sequences from an 896-Base pair region of mitochondrial DNA. Mol Biol Evol 13:1044-1053.

Iwamoto M, 1971. Morphological Studies of *Macaca fuscata*: VI. Somatometry, Primates 12:151-174.

Jiang X, Wan Y, Ma S. 1991. Taxonomic revision and distribution of subspecies of rhesus monkey (*Macaca mulatta*) in China. Zool Res 12:241-247.

Lekagul B and McNeely JA. 1988. Mammals of Thailand (2nd edition). Bangkok: Darunshtha Press. 758 p.

Malaivijitnond S, Varavudhi P. 2002. The Last Possible Troop of Semi-wild Rhesus Macaque (*Macaca mulatta*) in Thailand. Nat Hist J Chulalongkorn Univ 2:59- 61.

Martin R, Saller K. 1957. Lehrbuch der Anthropologie, 3. Aufl., Bd. I. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag. 6611 p.

Mayr E, 1942. Systematics and the Origin of Species. New York: Columbia Univ Press. 334 p.

Melnick DJ, Kidd KK. 1985. Genetic and Evolutionary Relationships among Asian Macaques. Int J Primatol 6:123-160.

Morales JC, Melnick DJ. 1998. Phylogenetic relationships of the macaques (Cercopithecidae: *Macaca*), as revealed by high resolution restriction site mapping of mitochondrial ribosomal genes. J Hum Evol 34:1-23.

Napier JR and Napier PH, 1967. A Handbook of Living Primates. London: Academic Press. 453 p.

Paterson HEH. 1985. The recognition concept of species, In: Vrba ES, editor. Species and Speciation. Pretoria: Transvaal Museum Monograph, No. 4. p 21-29.

Smith BH, Crummett TL, Brandt KL. 1994. Ages of eruption of primate teeth: A compendium for aging individuals and comparing life histories. Yearbk Phys Anthropol 37:177-231.

Sokal RR, Rohlf FJ. 1995. Biometry: the principles and practice of statistics in biological Research, 3rd edition. New York: Freeman & Co. 887 p.

Tosi AJ, Morales JC, Melnick DJ. 2003. Paternal, Maternal, and Biparental Molecular Markers Provide Unique Windows onto the Evolutionary History of Macaque Monkeys. Evolution 57:1419-1435.

Turnquist JE, Kessler MJ. 1989. Free-Ranging Cayo Santiago Rhesus Monkeys (*Macaca mulatta*): I. Body Size, Proportion, and Allometry. Amer J Primatol 19:1-13.

Watanabe K, Lapasere H, Tantu R. 1991. External characteristics and associated developmental changes in two species of Sulawesi macaques, *Macaca tonkeana* and *M. hecki*, with special reference to hybrids and the borderland between the species. Primates 32:61-76.

Zhang Y-P, Shi L-M. 1993. Phylogeny of Rhesus Monkeys (*Macaca mulatta*) as Revealed by Mitochondrial DNA Restriction Enzyme Analysis. Int J Primatol 14:587-605.

Legends of figures

Figure 1. Indochinese countries and the location of WTPMH (Wat Tam Pa Mak Ho, Loei province), WTT (Wat Tam Taep Ban Dan, Petchabun province), and WKH (Wat Kuha Phimuk, Yala province) in Thailand. Boundary zone between distribution of rhesus (*Macaca mulatta*) and long-tailed macaques (*M. fascicularis*) is indicated by hatched band, which is produced based on Fooden (1995, 2000).

Figure 2. Box-plot comparison of body mass between WTPMH macaques, Chinese- and Indian-derived rhesuses, and WTT-long-tailed.

Figure 3. Body sizes of WTPMH macaques, Indian-derived rhesus, and WTT-long-tailed relative to Chinese rhesuses, in percent.

Figure 4. Box-plot comparison of relative tail length (standardized by crown-rump length, in %). All of the differences between averages of four macaque groups are $p<1\%$ (t-test modified with Bonferroni method).

Figure 5. Plottings of PC-1 and PC-2 scores calculated for 11 somatometric characters of WTPMH macaques, Chinese- and Indian-derived rhesuses, and WTT-long-tailed.

Figure 6. Comparison of pelage color between WTPMH macaques, Chinese-derived rhesuses, WTT- and WKH-long-tailed. Panels from upper to lower are for L* (lightness), a* (red - green), and b* (yellow - blue), respectively.

Figure 7. Plottings of PC-1 and PC-2 scores calculated using L* and b* data at the vertex of head, back, waist, and lateral aspect of thigh, for WTPMH macaques, Chinese- and Indian-derived rhesus, and WTT- and WKH-long-tailed.

Table 1a. Developmental-class and sex composition, WTPMH troop.

class*1	female	male	un-sexed	Total
Infant			18	18
Juvenile			38	38
Sub-adult	3	9		12
Adult	35	7*2		42
TOTAL	38	16	57	110

* 1: determined according to method of Dittus (1970).
* 2: including one pig-tailed macaque reportedly a released pet.

Table 1b. Age and sex composition of WTPMH macaques trapped, excluding a male pig-tailed.

age*1	female	male	Total
1	3	1*2	3
2	4	4	8
3	3	2*2	3
4		1	1
5			
6			
7	4	1	5
Adult	8	1	9
TOTAL	22	7	29

*1: determined by the dental development based on Smith et al. (1994).
2: suspected hybrid in each age

Table 2. Study samples for somatometry (=> 7 yrs) and pelagae color (> 1yr).

	Somatometry female	Pelage color total(female,male)
M. mulatta *1		
China	36	49 (30,19)
India	17	36 (21,15)
WTPMH*2	12	27 (20, 7)
M. fascicularis		
WTT*3	12	73 (52,21)
WKH*4		17 (10, 7)

*1: Primate Research Institute, Kyoto University, Inuyama, Japan.

*2: Wat Tam Pa Mak Ho, Loei Province, Thailand.

*3: Wat Tam Taep Ban Dan, Petchabun Province, Thailand.

*4: Wat Kuha Phimuk, Yala Province, Thailand.

Body mass in Kg, and others in mm.

				t-test#	
	av	sd	n	derived rhesus	tailed
Body mass (Kg)	6.39	1.112	12	**	**
Tail L.*	245.77	19.537	12	**	**
Crown-rump L.	455.62	21.364	12	**	**
Anterior Trunk L.	304.15	18.293	12	**	**
Upper Arm L.	134.85	6.427	12	**	**
Forearm L.	138.85	6.375	12	**	**
Thigh L.	160.38	6.602	12	**	**
Leg L.	141.31	5.453	12	**	**
Thoracic G.	380.46	28.953	12	*	**
Thigh G.	236.31	16.059	12	**	*
Hand L., Ulnar	96.23	3.004	12	**	*
Foot L.	138.00	3.391	12	**	**
Foot W.	30.38	1.261	12	**	**
Head L.	85.54	3.711	12	**	*
Head W.	72.00	2.614	12	**	*
Bi-zygomatic W.	74.62	3.176	12	**	

*: abbreviations: L; Length, G; Girth, W; Width

#: Signficance of differences between averages, WTPMH macaques vs Chinese-derived rhesus, and WTPMH macaques vs WTT-long-tailed:

*: 1%<p<5%, **: p<1%

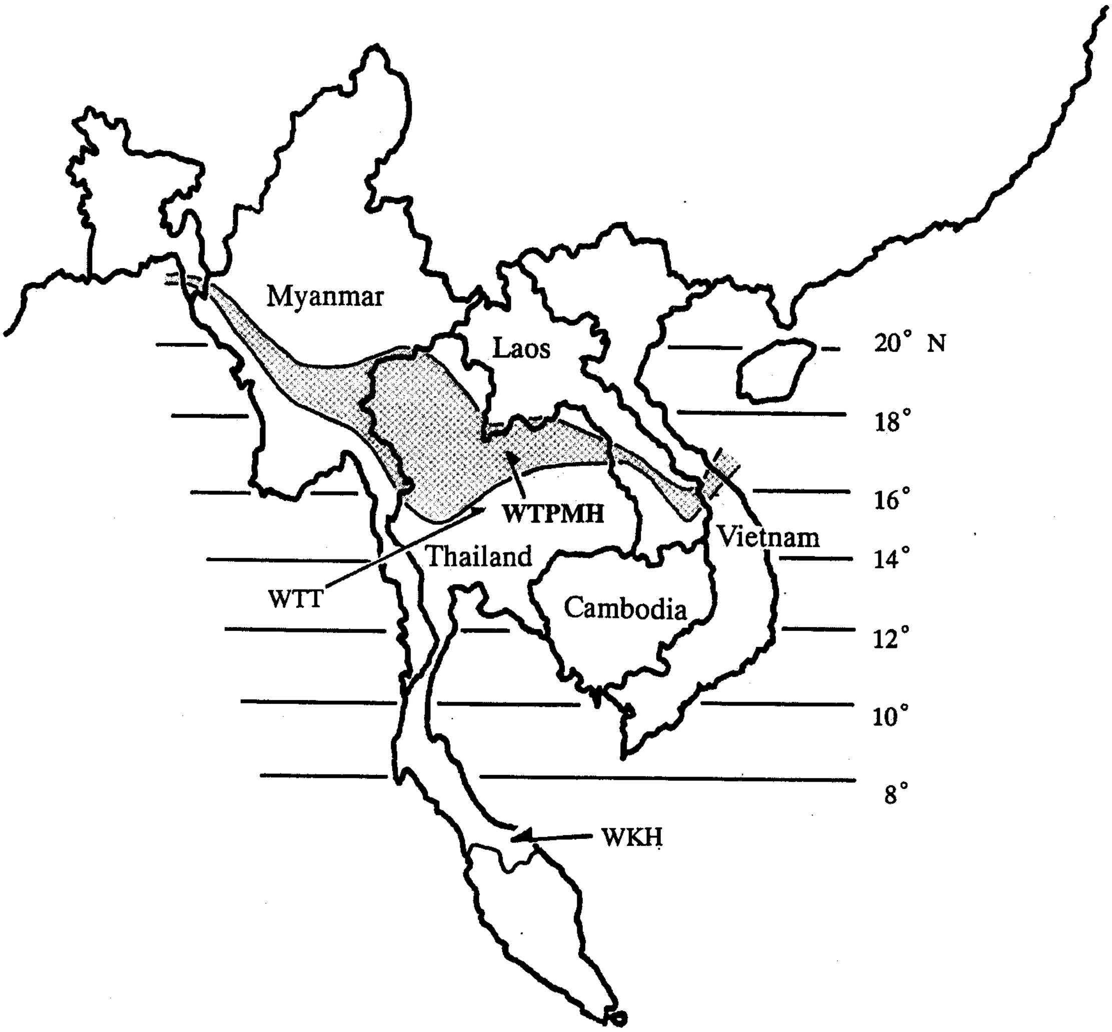
	China-derived rhesus			Inida-derived rhesus			WTPMH			WTT-long-tailed		
	av	sd	n	av	sd	n	av	sd	n	av	sd	n
Rel_Tail	36.52	2.848	14	44.19	4.907	16	53.94	3.352	12	112.52	5.581	12
Rel. Upper-limb L.	58.71	3.325	33	56.76	1.419	13	60.12	1.920	12	61.23	2.039	12
Brachial I.	102.58	3.240	33	103.30	2.884	13	103.08	4.863	12	101.77	4.665	12
Rel. Lower-limb L.	62.28	2.622	33	63.16	2.062	13	66.31	2.742	12	65.19	1.967	12
Crural I.	90.17	3.360	33	91.89	4.331	13	88.25	4.939	12	88.69	3.528	12
Intmembral I.	94.26	3.214	33	89.91	2.356	13	90.75	3.637	12	93.95	2.714	12
Head W/L I.	85.00	4.976	23	82.68	1.902	13	84.26	3.375	12	80.76	2.674	12
Rel. Hand L.	35.48	1.870	25	35.25	2.205	12	35.19	1.199	12	32.47	0.934	12
Foot W/L I.	22.56	0.950	24	22.54	1.301	13	22.03	1.003	12	22.20	1.186	12
Rel. Foot L.	48.96	2.025	24	46.56	2.111	13	45.77	1.518	12	45.09	1.274	12
Intercheiridial I.	68.25	2.352	24	68.56	2.533	12	69.74	1.778	12	67.67	2.434	12

Table 4. Result of PCA on 11 somatometrical characters.

	Comp-1	Comp-2	Comp-3
Standard deviation	57.441	9.746	6.551
Proportion of variance	0.934	0.027	0.012
Cumulative Proportion	0.934	0.960	0.973
Loadings			
CRL	0.994	-0.104	-0.018
Upper Arm L	0.897	0.306	-0.180
Forearm L	0.921	0.295	0.016
Thigh L	0.894	0.307	-0.159
Leg L	0.908	0.244	-0.059
Head L	0.847	0.066	0.132
Head W	0.857	0.168	0.095
Bi-zigomatic W	0.875	0.001	0.095
Hand L	0.925	0.141	0.247
Foot L	0.932	0.160	0.310
Foot W	0.894	0.069	0.228

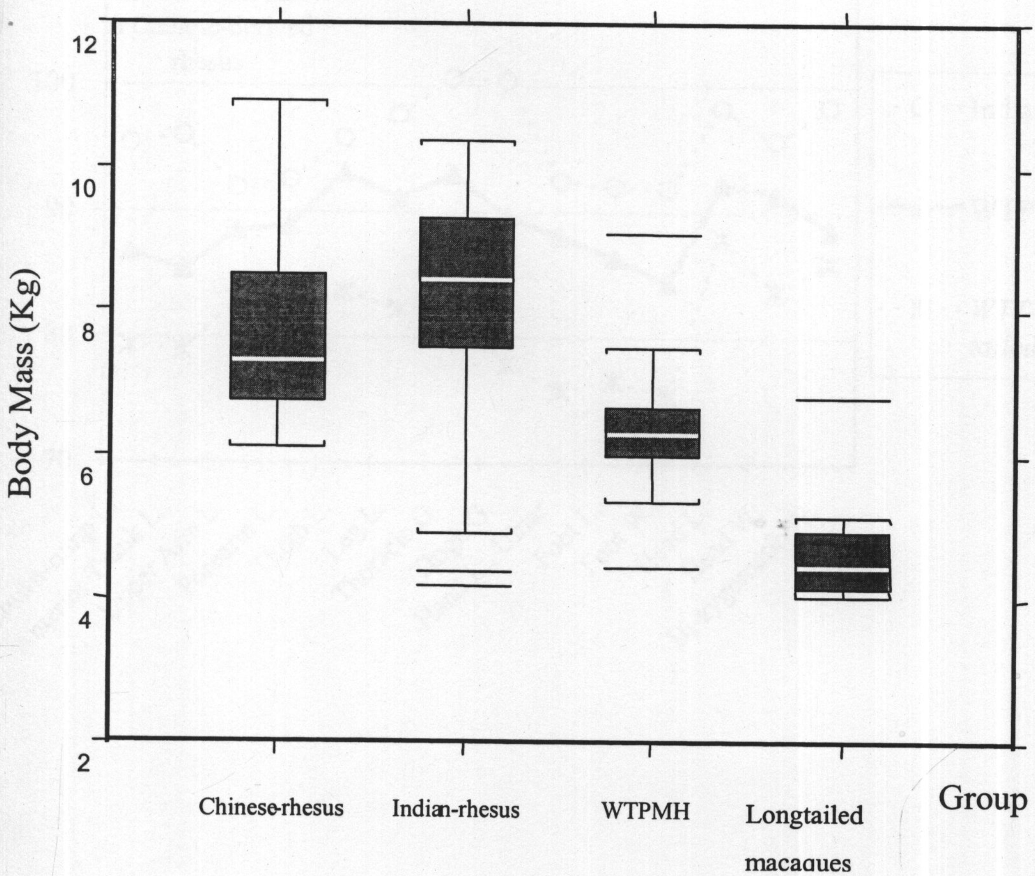
Table 5. Result of PCA on L* and b* at four body sites.

Importance		Comp-1	Comp-2	Comp-3
Standard Dev.		9.046	4.467	3.438
Proportion of Variance		0.585	0.143	0.085
Cumulative Proportion		0.585	0.728	0.812
Loadings				
L*	Vertex	0.729	-0.124	0.347
	Back	0.905	-0.058	0.096
	Waist	0.876	-0.097	-0.452
	Thigh	0.862	-0.225	0.202
b*	Vertex	0.476	0.108	0.470
	Back	0.486	-0.089	0.360
	Waist	0.555	0.610	0.045
	Thigh	0.417	0.862	0.009



Myanmar
Laos
20° N
18°
16°
WTPMH
Vietnam
14°
Thailand
WTT
Cambodia
12°
10°
8°
WKH

Figure 1.



Body Mass (Kg)
12
10
8
6
4
2
Chinese-rhesus
Indian-rhesus
WTPMH
Longtailed macaques
Group

Figure 2.

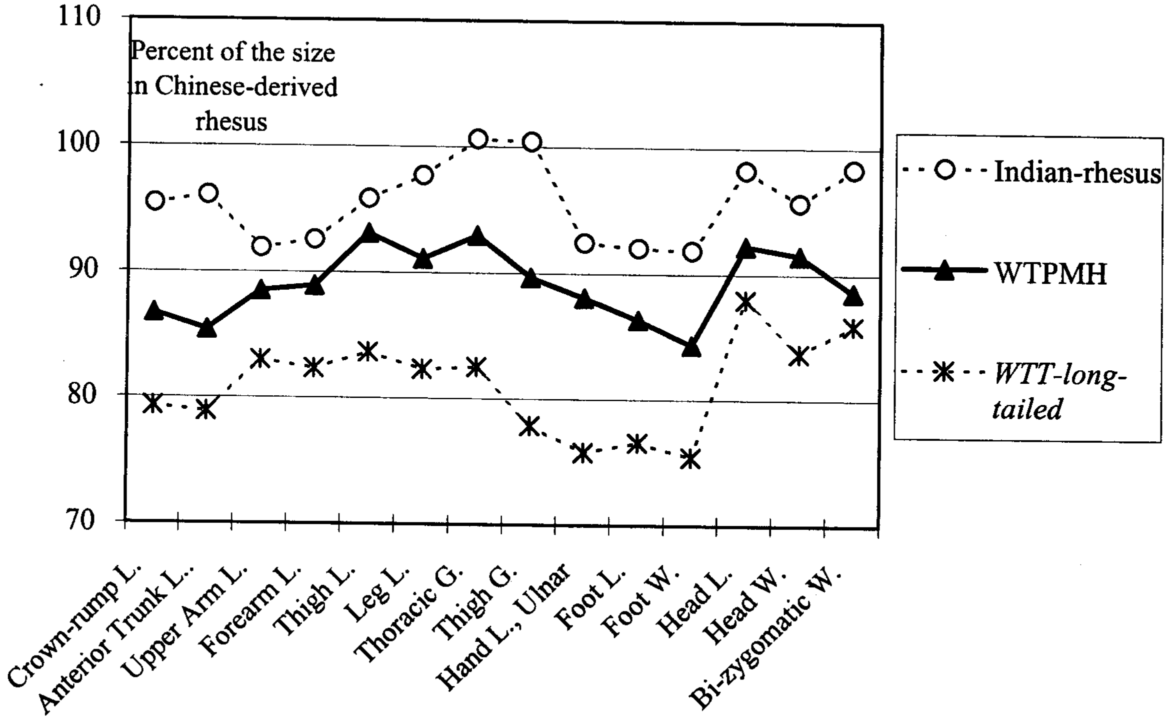

110
100
90
80
70
Percent of the size in Chinese-derived rhesus
Indian-rhesus
WTPMH
WTT-long-tailed
Crown-rump L.
Anterior Trunk L.
Upper Arm L.
Forearm L.
Thigh L.
Leg L.
Thoracic G.
Thigh G.
Hand L., Ulnar
Foot L.
Foot W.
Head L.
Head W.
Bi-zygomatic W.

Figure 3.

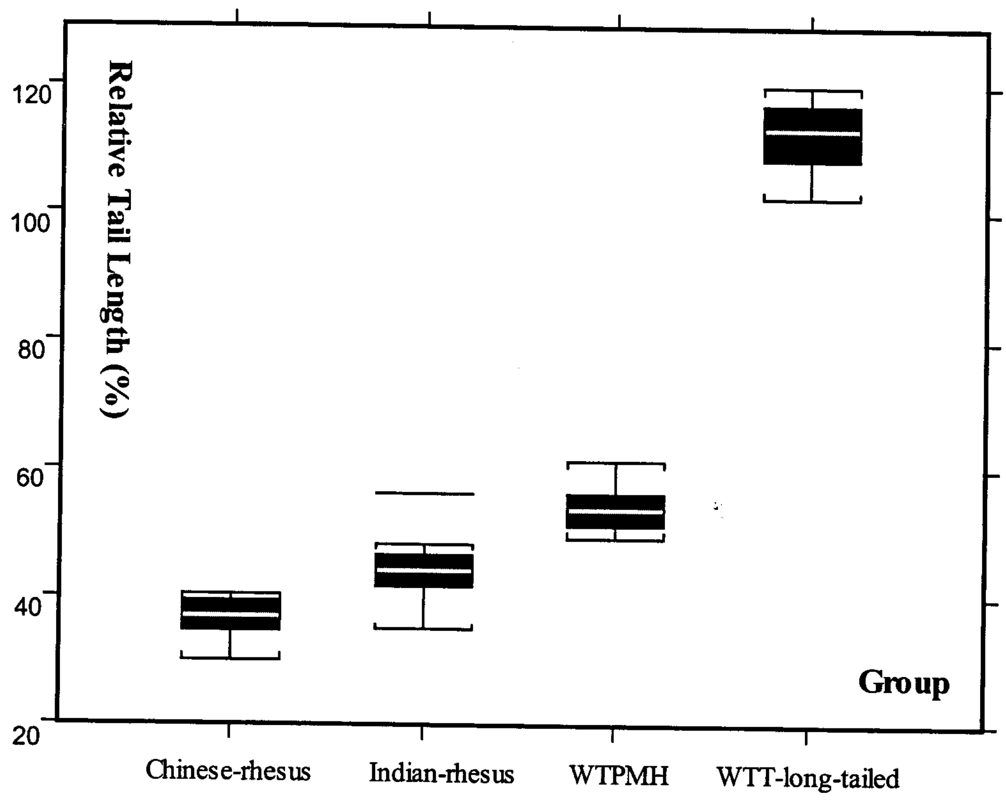
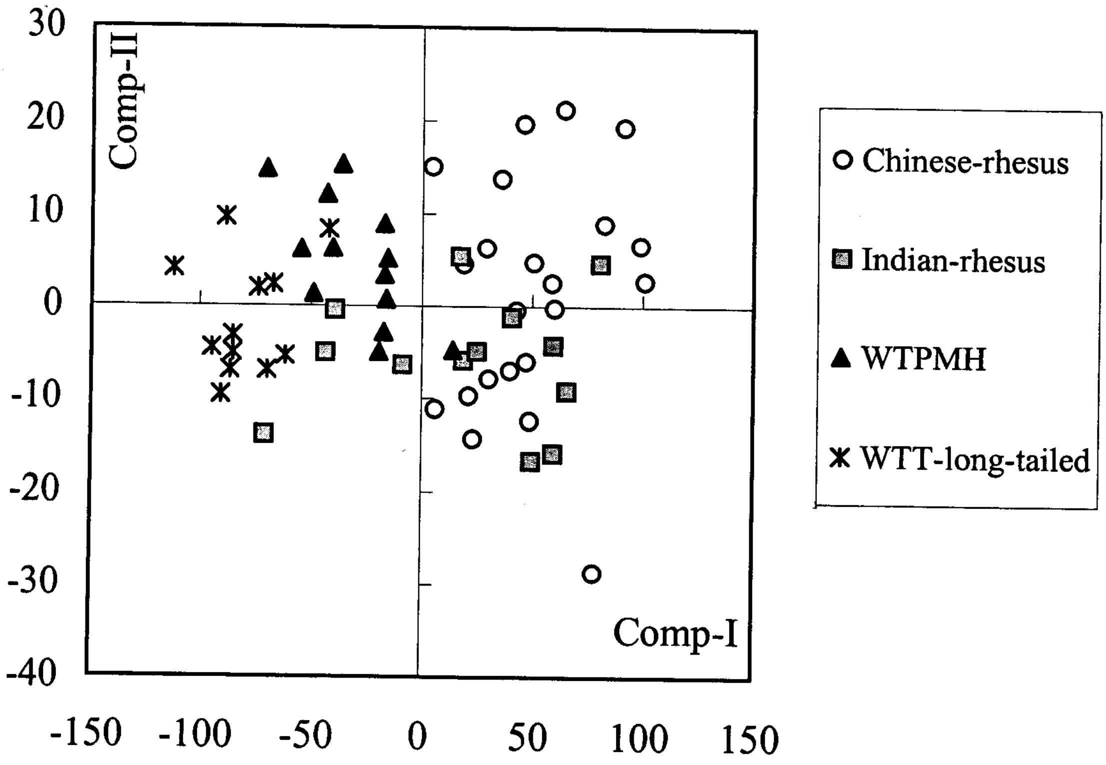

120
100
80
60
40
20
Relative Tail Length (%)
Group
Chinese-rhesus
Indian-rhesus
WTPMH
WTT-long-tailed

Figure 4.



Comp-II
Comp-I
30
20
10
0
-10
-20
-30
-40
-150
-100
-50
0
50
100
150
Chinese-rhesus
Indian-rhesus
WTPMH
WTT-long-tailed

Figure 5.

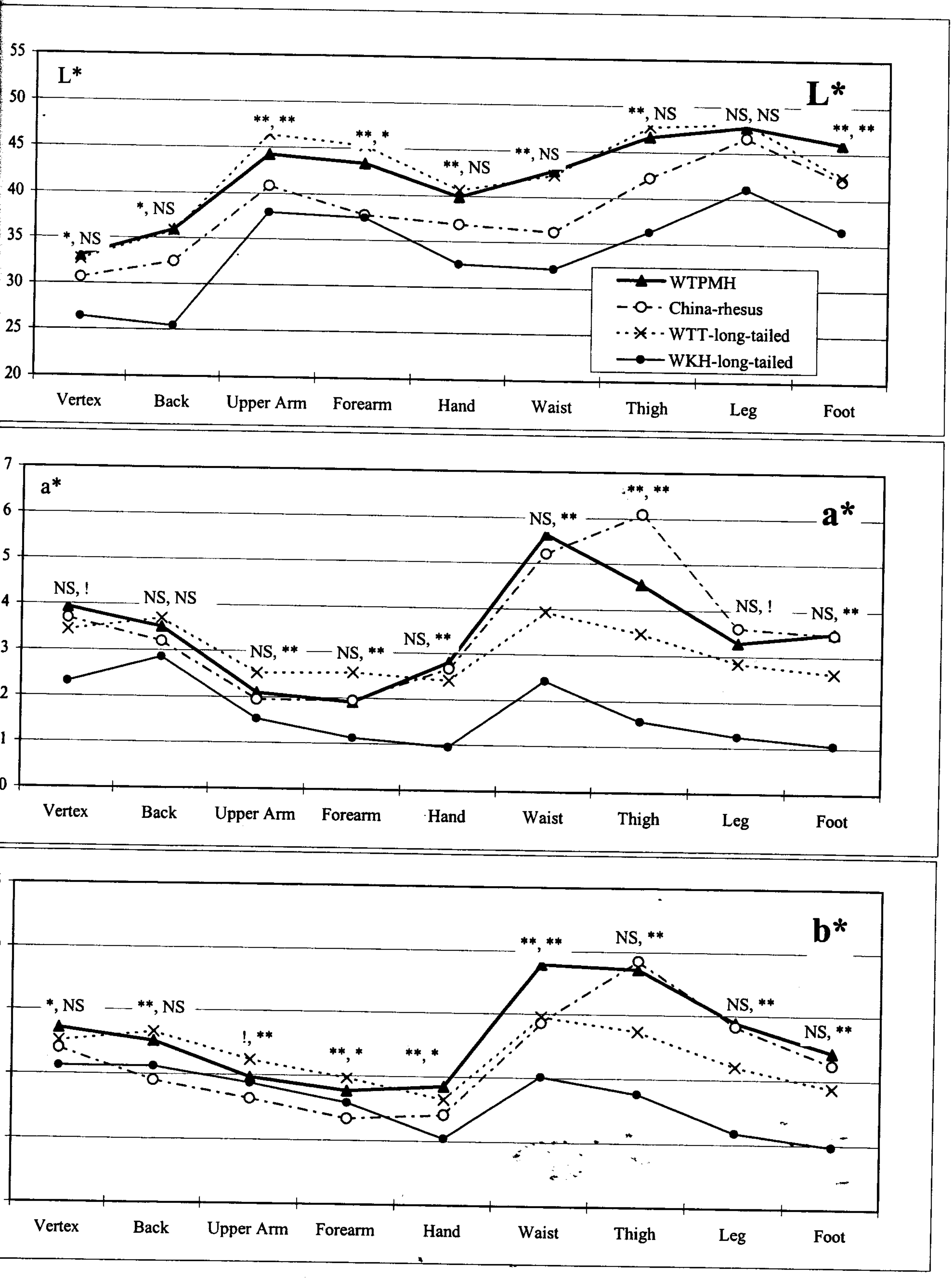
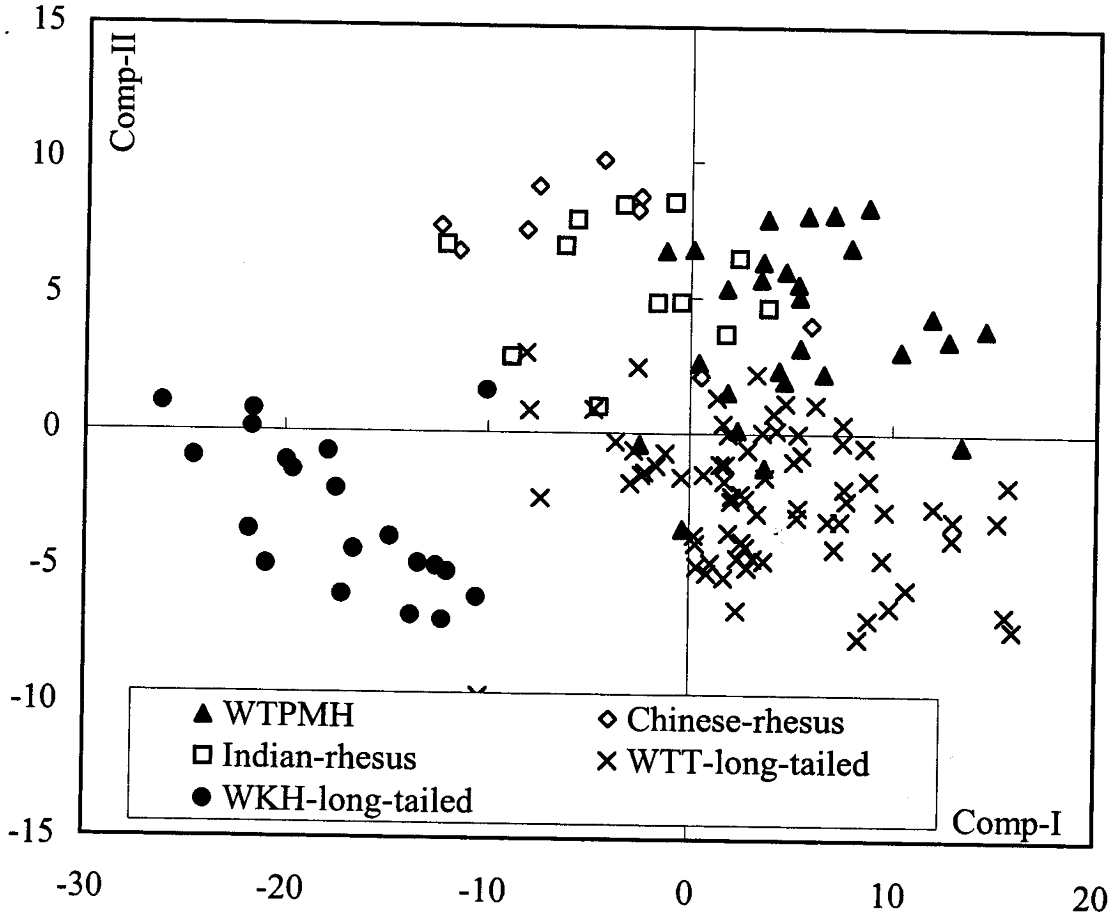

L*
*, NS
*, NS
**, **
**, *
**, NS
**, NS
**, NS
NS, NS
**, **
WTPMH
China-rhesus
WTT-long-tailed
WKH-long-tailed
Vertex
Back
Upper Arm
Forearm
Hand
Waist
Thigh
Leg
Foot
a*
NS, !
NS, NS
NS, **
NS, **
NS, **
NS, **
**, **
NS, !
NS, **
b*
*, NS
**, NS
!, **
**, *
**, *
**, **
NS, **
NS, **
NS, **

Figure 6.



Comp-II
Comp-I
15
10
5
0
-5
-10
-15
-30
-20
-10
0
10
20
WTPMH
Chinese-rhesus
Indian-rhesus
WTT-long-tailed
WKH-long-tailed

Fig. 7

เอกสารแนบหมายเลข 3

การประชุมวิชาการชมรมนักสัตววิทยา
โครงการ BRT ครั้งที่ 1
ประชุมกลุ่มย่อยการวิจัยทางด้านสัตว์ โครงการ BRT

เรื่อง

BIODIVERSITY AND BIOGEOGRAPHY

BRT

ระหว่างวันที่ 14-15 มิถุนายน 2546

ณ อาคารวิจัยและพัฒนาอัญมณี คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

BIODIVERSITY OF MACAQUE MONKEYS IN THAILAND

Suchinda Malaivijitnond[1], Nontakorn Urasopon[1], Kwanta Thansa[1], Yuzuru Hamada[2]

[1]Primate Research Unit, Department of Biology, Faculty of Science, Chulalongkorn University.
[2]Section of Morphology, Primate Research Institute, Kyoto University, Inuyama, Aichi, 484-8506, Japan

Correspondence: Suchinda Malaivijitnond, Primate Research Unit, Department of Biology, Faculty o Science, Chulalongkorn University, Fax: 02-2185386, E-mail: Suchinda.M@chula.ac.th

Macaque monkeys (the genus *Macaca*) are popular animals in Thailand. The genus contains up to 2 different species. According to Fooden (1980), based on the genital morphology, macaques are classified int clearly defined 4 species groups: silenus-sylvanus, sinica, fascicularis and arctoides. Geographical ranges of a four species groups overlap to some extent in the Indochinese Peninsula. Therefore, representatives of all fou species groups are particularly occurred in Thailand, that is, *M. nemestrina* (silenus-sylvanus group), *M assamensis* (sinica group), *M. fascicularis* and *M. mulatta* (fascicularis group), and *M. arctoides* (arctoide group). Three of these species are rated as vulnerable species on the 2000 IUCN Red List of Threatene Animals.

In the collaboration between the Primate Research Institute, Kyoto University and the Primate Researc Unit, Chulalongkorn University, all 5 species of macaques have been studied in Thailand since 1988. We hav determined their distribution and variation (morphology, physiology and genetic) within each of the species, an also found the occurrence of probable hybrids among those 5 macaque species. *M. fascicularis* is the mos successfully adapted to the habitats of wide ecological settings. Thus, it is to be found in a wide range o habitats, such as primary and secondary forests, mangroves, plantations, and the outskirts of towns and village It widely deploys Thailand from the lower northern part (Nakorn Sawan and Petchabun provinces) to th southern most part (Yala province). On the other hand, the populations of other 4 species are scattered i Thailand and rarely seen. Especially for *M. arctoides*, it has been currently found only three places in Thailand Kaeng Krachan National Park and Wat Kao Kra Puk-Kao Tao Mo, Petchaburi province and Wat Tam Ka Daeng, Nakorn Sri Thammarat province.

It is expected that *M. fascicularis* have wide variation in many biological characters. From our recen trapping work, long-tailed macaque shows a geographical cline in morphology, body size and shape (proportion e.g., relative tail-length). The body size decreases and relative-tail length increases from the Indochinese t Malayan regions. In concordant with this morphological variation, other biological characters also show th geographical variation, for example the higher number of females that have sexual skin swelling at the base o tail, or physiological variation, in the southern troops, and some genetic variations.

Thailand is a center of faunal migrating routes, as it situates in the center of Indo-Chinese peninsula. Th climate and vegetation in Thailand are considered to have greatly fluctuated by the glacial – interglacia exchange in the Plio-Pleistocene era in which macaques have evolved. From these reasons, the macaqu species in Thailand have experienced complicated history. The hybridization is one of such evolutionar processes, and it may have been and may be occurred. It is worth while noting that *M. mulatta* and *M fascicularis* that belonged to the same species group are found sympatric in some localities in Thailand, thoug the two species are allopatric in general. The hypothetical hybrid zone is the lower northern part of Thailand From our recent survey, the macaques at Kumpawapee, Udon Thani province showed mixed characters o these two species, suggesting the natural hybridization. Therefore, a more detailed study of the macaque in thi locality or other are necessary, that should provide us an insight into the evolutionary history of macaque i Thailand. In addition to the natural hybridization, Thailand is now terribly facing with the problem of artificia hybridization among those 5 species of macaques. The pet macaques are released into the troop of differen species of macaques, and producing hybrids. We are now making research on a troop of rhesus macaque a Loei province to which a male pig-tailed macaque immigrated three years ago. Three hybrid offspring hav already been produced.

Nowadays, the reduction in biodiversity caused by human disturbance becomes a serious problem. Fore destruction, which causes shrinkage of natural vegetation, food resources, and habitats for wild animal including macaques, poses diverse influences not only on wild animals but also on human beings. Th population fragmentation is one of them. Then, the isolated population will rapidly lose its genetica heterogeneity by inbreeding and becomes vulnerable to the environmental changes. The population woul finally become extinct. We therefore should be alert to conserve the macaque monkeys before their extinction Long-tailed macaques are good indicator to evaluate the environment in Thailand. To make a conservation o aques in Thailand, the update of the knowledge of their distribution, morphological and genetic variation n local populations is urgently needed. However, there are only a few researchers in Thailand who ularly intended to study the biology of these animals. Primatologists in Thailand are a few as well.

rences

oden, J. 1971. Report on primates collected in western Thailand January-April, 1967. Fieldiana: Zoology. (1). 1-62.
oden, J. 1980.Classification and distribution of living macaques (Macaca Lacepede, 1799). In: Lindburg, G. (Ed.), The Macaques: Studies in Ecology, Behavior and Evolution. New York, 1-9.
oden, J. 1995. Systematic review of southeast Asian longtail macaques, Macaca fascicularis affles, 1821). Fieldiana: Zoology. New series (81). 1-205.
oden, J. 2000. Systematic review of the rhesus macaque, Macaca mulatta (Zimmermann, 1780). Fieldiana: ology. New series (96). 1-180.
elson, E. 1980. Fossil macaques, phyletic relationships and a scenario of development. In: Lindburg, D.G. l.), The Macaques: Studies in Ecology, Behavior and Evolution. New York, 10-30.

The Anthropological Society of Nippon
57th Date
Annual Meeting in Date city

日本人類学会

第57回
伊達大会

抄録集

2003 10 3 fri・4 sat・5 sun

だて歴史の杜カルチャーセンター

北海道 伊達市

演 A2−4　　10月5日（日）9:45〜10:00　　会場 A会場

タイ東北部のアカゲザルに見られる形態学的特徴

○濱田穣（京大・霊長研・形態）、ﾉﾝﾀｺﾝ･ｳﾗｿﾎﾟﾝ、ｸﾜﾝﾀ･ﾀﾝｻ、ｽﾁﾝﾀﾞ・ﾏﾗｲﾋﾞｼﾞｯﾄﾉﾝ（ﾁｭﾗﾛﾝｺﾝ大・理・生物）、ﾊﾃﾞｨ･ｲｽﾗﾑﾙ（ﾎﾞｺﾞｰﾙ農大・理・生物）、ｶﾆｬ･ｶｳｨﾝ（ﾗｼﾞｬﾊﾞｯﾄ理工大ﾅｺﾝｻﾜﾝ・理・生物）

Morphological characteristics of free-ranging rhesus macaques in northeastern Thailand

Yuzuru HAMADA[1], Nontakorn Urasopon[2], Kwanta Thansa[2], Hadi Islamul[3], Kanya Kawin[4], and Suchinda Malaivijitnond[2]. (1:Primate Res. Inst., Kyoto Univ., 2: Primate Res. Unit. Chulalongkorn Univ., 3: Dept. Biol., Bogor Agricult. Univ., 4: Dept. Biol., Rajabhat Inst. Nakhonsawan)

macaques (*Macaca mulatta*) have a wide geographical range from Afghanistan, through Southeast Asia, to China, interesting pattern of geographical variation in biological characters. Research efforts should be directed to the s in the Indochinese peninsula, because they are considered to have curious characters, e.g., much longer tail than her localities, and onsite studies have not been made. The first field research on the free-ranging rhesus population 101° 47' E) in northeastern Thailand has been recently realized. The population is composed of 110 individuals and grant adult male pig-tailed macaque that is supposed to sire some infants. We temporarily caught 33 monkeys, the pig-tailed, collected biological samples and determined the dermatogryphics, somatometry and body color. The n of their somatometry and body color with rhesus of Indian and Chinese origin reared at the Primate Research Kyoto University, will be reported.

演 A2−5　　10月5日（日）10:00〜10:15　　会場 A会場

二足歩行発達種間比較の縦断的研究

木村　賛　（石川県立看護大学）

Longitudinal Study on the Development of Bipedal Walking in Two Species

Tasuku KIMURA (Ishikawa-Prefectural Nursing University)

)ヒトと３頭のチンパンジーの２種において、二足歩行の個体発達を縦断的にしらべ比較した。これに二足歩行の特徴と獲得過程を明らかにすることを目的とする。若年のチンパンジーのデータは自発的二よるものである。今回は時間要素と外部エネルギーとについて考察した。ヒトにおいてもチンパンジーも、若年の個体は多くのパラメータにおいてばらつきの大きい歩行を行う。幼年個体をおとなと比べた種ともに床反力の制動期が短いこととエネルギー節約の少ないことがみられる。ただし、おとなとなっパンジーではヒトのおとなと比べこれらの点で短く、少なく、またパラメータ数値のばらつきが大きい。の速度は２種で異なる。

演 A2−6　　10月5日（日）10:15〜10:30　　会場 A会場

各種霊長類における膝関節の可動域（１）解析方法の検討

○熊倉博雄，廣川容子，中野良彦，平崎鋭矢，大阪大学大学院人間科学研究科生物人類学教室

The range of the knee joint excursion in some primates. 1.Estimation of the methodlogy.

KUMAKURA Hiroo, HIROKAWA Yohko, NAKANO Yoshihiko, HIRASAKI Eishi, Department of Biological Anthropology, OSAKA University Graduate School of Human Sciences.

の運動様式の多様性は，運動器の形態によく反映されると考えられる．我々の研究室では従来霊長類の の３次元運動計測データに基づいて，霊長類運動器の形態学的適応の問題を検討してきた．このようなデータの信頼性を向上するためには，関節構造の形態による運動の許容度を評価する必要があると考えで，靭帯標本の３次元的関節可動域の検討を開始することにした．今回は大腿骨，脛骨，膝蓋骨によっれる膝関節について靭帯標本を作成し，その受動的可動域の評価・計測方法の開発を試みた．今後，こ用いて種差，年齢差などに関する考察を行う計画である．

Proceedings of the Fifth Congress of AOSCE
in Conjunction with the Annual Meeting of
JSCE, March 26-30,2004, Nara, Japan

BIODIVERSITY OF MACAQUE MONKEYS IN THAILAND

Suchinda Malaivijitnond[1], Jessada Denduangboripant[1], Osamu Takenaka[2], Yuzuru Hamada[2]
[1]Primate Research Unit, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand; [2]Primate Research Institute, Kyoto University, Inuyama, Aichi, Japan

Summary

The distributions, population sizes and compositions, variations, and presumably an occurring of natural and artificial hybridization of all 5 species of macaques inhabiting Thailand have been studied. *Macaca fascicularis* is the species that has successfully adapted the most to disturbed habitats. They show a geographical cline in morphology, physiology and genetic from the Indochinese to Malayan regions. The other 4 species, especially *M. arctoides*, scatteredly spread throughout Thailand and have been rarely seen. The natural and artificial hybridization of *M. mulatta* with other macaques were found. Although population sizes appear to increase or be maintained in some species, recent rapid deterioration of macaques' habitat will much affect diversity in the macaque population by geographical isolation and genetic pollution.

Introduction

Macaque monkeys belong to the genus *Macaca* in the order Primates. The genus contains up to 19 different species. According to Fooden (1980) based on modification of the genital morphology, macaques are clearly defined into 4 species groups: *silenus-sylvanus, sinica, fascicularis* and *arctoides* [1]. Geographical ranges of all four species groups overlap to some extent in the Indochinese Peninsula. Therefore, representatives of all four species groups are particularly occurred in Thailand, that is, *M. nemestrina* (*silenus-sylvanus* group), *M. assamensis* (*sinica* group), *M. fascicularis* and *M. mulatta* (*fascicularis* group), and *M. arctoides* (*arctoides* group). Thailand is a center of faunal migrating routes as it locates in the center of Indochinese Peninsula. The climate and vegetation of Thailand are considered to have had greatly fluctuated by the glacial-interglacial exchange in the Plio-Pleistocene epochs in which macaques had evolved. From these reasons, the macaque species in Thailand possibly varied in morphological, physiological and genetic characters, and the probable hybrids among the species could occur. Up to now, there are no intensive studies on these variations of Thai macaques and their present status. We therefore undertook the study on their biodiversity, that is, distributions, population sizes and compositions, and variations in morphology, physiology and genetics of the 5 macaque species in Thailand.

Materials and Methods

We determined the present distribution by 2 means, a questionnaire and a field census. The questionnaires asking for a distribution of all primates, including macaques, were sent to all of the head of sub-district throughout Thailand, in total 7,394 sub-districts. We selected the feasible sites from replied questionnaires and from the previous reports on primates in Thailand, then surveyed and elucidated the distributions, population sizes and compositions, and physiological and morphological characters of macaques in those selected sites. The morphological characters collected were colors and patterns of hair (crest, crown, and spiral hair at the cheek), ischial callosities, body sizes and tail lengths. Any swelling and reddening of sexual skin in the female monkeys were also observed and scored their stages as physiological characters. The monkeys were temporarily captured by trapping. We anesthetized them with an intramuscular injection of 10 mg/kg.BW of ketamine hydrochloride. We then collected their morphological and physiological data, feces and blood, checked their health, and released them back to the troop after they completely recovered. We have recently obtained their mtDNA (D-loop region) sequence *c.a.* 350 bp and analyzed the phylogenetical relationships of *M. fascicularis* using neighbor-joining and parsimony methods.

Results

The distributions, variations, and presumably occurring of hybridization of 5 macaque species in Thailand were determined. Details of the distributions will be presented elsewhere. *Macaca fascicularis* is the one that has successfully adapted the most to disturbed habitats. It disperses from the lower northern part (Nakorn Sawan and Petchabun provinces) to the southernmost part (Yala province). Its distribution found in this study is similar to the previous reports about 30 years ago [2]. The population sizes in 8 localities were increased by 25 – 775% compared to those recorded 12 years ago [3]. This species showed a morphological cline regarding to geography. For instance, their body sizes tended to decrease in the Indochinese southward to Malayan regions, while the relative-tail lengths showed an increasing tendency. In accordance with this morphological variation, other biological characters also show the geographically influent tendency, for example, the frequencies of females with sexual skin swelling at the base of tail (physiological variation) were higher in the southern troops. In term of genetic variation, *M. fascicularis* was found to be clearly separated into 2 groups: Indochinese and Malayan.

Macaca mulatta has parapatrically distributed in Thailand with *M. fascicularis*. The hypothetical hybrid-zone lies at the lower northern and northeastern parts of Thailand. From our recent survey, the macaques found in Kumpawapee (Udon Thani province), close to that zone, showed mixed characters of the two species, suggesting a natural hybridization. An artificial hybridization between *M. mulatta* and *M. nemestrina* was also found in the northeastern part (Wat Tam Pa Mak Ho, Loei province). One male pet macaque of *M. nemestrina* was once released into that troop and then produced hybrids. At least three offspring with mixed morphological characters were seen.

Macaca arctoides has been recently found only in three places in the southern part of Thailand: Kaeng Krachan National Park and Wat Khao Kra Puk-Khao Tao Mo (both in Petchaburi province) and Wat Tham Khao Daeng (Nakhonsithammarat province). One hundred and four individuals were counted in the later group in 2002. Their pelage and facial skin color were widely variable between individuals. This troop was found sympatrically living with another troop of *M. fascicularis*. Both troops use the same provisioning site at the foot of the mountain. This *M. arctoides* troop is therefore a good candidate for an intensive research in the future.

Discussion

The reduction in biodiversity caused by human disturbances, especially deforestation, becomes a serious problem in Thailand at present. They cause shrinkage of natural vegetation, food resources, and habitats for macaques, and pose multifold influences. Isolation and extinction of local populations, and newly emerging hybridization (genetic pollution) could have altered and will alter their genetic properties. We found high frequency (5.2%) of individuals with the golden pelage in the troop at the northeastern part of the country (Kosumpee Forest Park, Mahasarakham province). To make a better and on time conservation of Thai macaques, update knowledge on their present status, distributions and variations are urgently needed.

References

1. FOODEN J. Classification and distribution of living macaques (*Macaca Lacepede*, 1799): In: *The Macaques Studies in Ecology, Behavior and Evolution*, New York, Van Nostrand Reinhold Company, 1980

2. LEKAGUL B, McNEELY JA. *Mammals of Thailand* (2^{nd} ed.). Bangkok, Darnsutha Press, 1988.

3. AGGIMARANGSEE N. Survey for semi-tame colonies of macaques in Thailand. *Nat Hist Bull Siam Soc*, 40, 103-166, 1992.

เพราะสมบัติทางฟิสิกส์ของสถานะทั้งสองแตกต่างกันมากในการใช้งานต้องควบคุมอุณหภูมิไม่ให้มีค่ามากกว่าอุณหภูมิการเปลี่ยนสถานะ เพื่อป้องกันความเสียหายของอุปกรณ์และภาชนะที่ทำจากเซอร์โคเนียม

ในงานวิจัยนี้ใช้วิธีพลศาสตร์โมเลกุลเพื่อหาค่าเอนโทรปีการสั่น วิธีนี้ดีกว่าวิธีทางทฤษฎีอื่นๆ เนื่องจากเป็นวิธีเดียวที่สามารถรวมผลของการสั่นแบบแอนฮาร์มอนิกได้ ผลการคำนวณแตกต่างจากผลการทดลองเพียง 19% ในงานวิจัยทั่วไปซึ่งไม่สามารถรวมผลของการสั่นแบบแอนฮาร์มอนิกพบว่าอุณหภูมิการเปลี่ยนสถานะของโลหะเซอร์โคเนียมที่คำนวนได้มีค่าสูงกว่าค่าจากการทดลอง 2-3 เท่า งานวิจัยนี้เป็นงานชิ้นแรกที่มีการนำโครงสร้างจุลภาคแบบมาร์เทนซิติกมารวมในการคำนวณ การคำนวณแบบนี้ค่อนข้างยุ่งยากและซับซ้อนเนื่องจากการคำนวณที่เกี่ยวข้องกับโครงสร้างแบบนี้จะต้องพิจารณาที่จำนวนอะตอมในระดับหนึ่งหมื่น ถึง หนึ่งแสนอะตอม ซึ่งปัจจุบันไม่สามารถคำนวณได้ด้วยวิธีอื่น ผู้วิจัยจึงเลือกใช้วิ พลศาสตร์โมเลกุล เนื่องจากสามารถรวมผลควอนตัมผ่านทา ฟังก์ชันพลังงานศักย์ และสามารถทำการคำนวณโดยมีอนุภา เป็นจำนวนมากได้ โดยฟังก์ชันพลังงานศักย์สามารถอธิบา สมบัติของเซอร์โคเนียมในระดับจุลภาคและมหภาคได้ดี และไ รับการยอมรับอย่างกว้างขวาง

งานวิจัยนี้ยังแสดงถึงความก้าวหน้าทางทฤษฎีในการสร้า แบบจำลอง และการออกแบบการคำนวณ เพราะเมื่อเปรีย เทียบผลการคำนวณและผลการทดลอง และผลการคำนวณใ งานวิจัยนี้กับงานวิจัยอื่นๆ ที่มีลักษณะคล้ายๆ กัน พบว่าค่า ได้จากการคำนวณในงานวิจัยนี้ใกล้เคียงกับผลการทดลอ เป็นอย่างมาก ซึ่งแสดงให้เห็นความสำเร็จในระดับที่น่าพอใ ระเบียบวิธีวิจัยในงานวิจัยนี้สามารถประยุกต์ใช้ในการคำนว สมบัติเชิงกลของเซอร์โคเนียม โลหะชนิดอื่นๆ และโลหะผส ได้

นักวิชาการชาวต่างประเทศ

ร่วมทำวิจัยกับภาควิชาชีววิทยา

Associate Professor Dr.Yuzuru Hamada จาก Primate Research Institute มหาวิทยาลัยเกียวโต ประเทศญี่ปุ่นและ Mr. Islamul Hadi นิสิตปริญญาโท จาก Laboratory of Zoology, Department of Biology, Faculty of Mathematic and Natural Science, Borgor Agricultural University ประเทศอินโดนีเซีย ทำวิจัยร่วมในหัวข้อ Hybridization and genetic variation of rhesus macaques (*Macaca mulatta*) at Wat Tham Pa Mak Ho, Loei Province ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากโครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย (โครงการ BRT) ดำเนินการระหว่างวันที่ 24-30 มีนาคม 2546 ณ วัดถ้ำผาหมากฮ่อ อ.วังสะพุง จ.เลย โดยโครงการวิจัยดังกล่าวเป็นการศึกษาเกี่ยวกับลักษณะทางพันธุกรรมของลิงวอก (*Macaca mulatta*) ซึ่งคาดว่าเป็นลิงฝูงเดียวที่พบในประเทศไทยขณะนี้ เนื่องจากพื้นที่อาศัยของลิงได้ถูกแบ่งแยกออกจากพื้นที่อาศัยธรรมชาติอื่นๆ โดย ชาวบ้านได้เข้ามาใช้พื้นที่ในการ เกษตรกรรม ทำให้อาจเกิดปัญหา inbreeding ได้ นอกจากนี้ยังได้มีชาวบ้านที่ไม่ทราบชนิดของลิงได้นำลิงกัง (*Macaca nemestrina*) เพศผู้เข้ามาปล่อยในลิงวอกฝูงนี้ และลิงกังดังกล่าว ได้กลายมาเป็นจ่าฝูง (alpha-male) ของฝูงในที่สุด ทำให้ประสบปัญหากับลูกผสมที่เกิดขึ้น โดยในการวิจัยครั้งนี้ Dr.Yuzuru Hamada ได้เข้าร่วมศึกษาในแง่ของ morphology และได้ตรวจวัดขนาดต่างๆ (somatometric determination) ของลิง และ Mr.Islamul Hadi ได้เข้าร่วมศึกษาในแง่ของ Socioecology ของลิงฝูงดังกล่าว

เอกสารแนบหมายเลข 7

จุฬาสัมพันธ์

๘๖ ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีที่ ๔๖ ฉบับที่ ๓๓ วันจันทร์ที่ ๑ กันยายน ๒๕๔๖

จุฬาฯ วิจัยอนุรักษ์ "ลิงวอก" ฝูงสุดท้ายในไทย

จุฬาฯวิจัยอนุรักษ์ลิงวอกฝูงสุดท้ายในไทย

อาจารย์จุฬาฯศึกษาอนุรักษ์ "ลิงวอก" งสุดท้ายที่เหลืออยู่ในประเทศไทย พบลักษณะ างพันธุกรรมเปลี่ยนแปลงไปกลายเป็นลิง กผสมข้ามพันธุ์ ส่วนหนึ่งเกิดจากฝีมือของ นุษย์ที่รู้เท่าไม่ถึงการ

รศ.สุจินดา มาลัยวิจิตรนนท์ แห่งภาควิชาชีววิทยาคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาฯ ผู้ศึกษาวิจัยเรื่อง "การผสมข้ามพันธุ์และความแตกต่างแปรผัน างพันธุกรรมของลิงวอก ณ วัดถ้ำผาหมากฮ่อ .วังสะพุง จ.เลย" เปิดเผยว่า "**ลิงวอก**" Rhesus Macaques) เป็นหนึ่งในลิง ๕ ชนิด นสกุล Macaca ที่พบในประเทศไทย อกเหนือจาก**ลิงแสม**ซึ่งพบมากที่สุด **ลิงกัง งอ้ายเงี๊ยะ ลิงเสน** ในอดีตมีการพบลิงชนิดนี้ ริเวณตอนบนของประเทศไทยที่ จ.ตาก ยงใหม่ หนองคาย และเลย จากการศึกษา ารวจร่วมกันระหว่างหน่วยวิจัย Primate าควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาฯ และ imate Research Institute มหาวิทยาลัยเกียวโต ระเทศญี่ปุ่น **นับตั้งแต่ ๑๕ ปีที่ผ่านมา ไม่มี ารค้นพบลิงชนิดนี้ในธรรมชาติในประเทศไทย** นกระทั่งในปี ๒๕๔๑ ได้พบลิงวอกฝูงหนึ่งซึ่งมี วามแตกต่างจากลิงที่พบโดยทั่วไปที่วัดถ้ำผา มากฮ่อ อ.วังสะพุง จ.เลย และได้ทำการศึกษา นพบว่าลิงเหล่านี้เริ่มก่อตั้งฝูงตั้งแต่ ๒๐ ปีที่แล้ว กลิงเพียงแค่ ๘ ตัว และได้ผสมพันธุ์กันเอง นปัจจุบันมีลิงทั้งสิ้น ๑๔๒ ตัว รวมทั้งได้มี วบ้านที่รู้เท่าไม่ถึงการนำลิงกังเพศผู้มาปล่อยเข้า ลิงฝูงนี้จนกลายเป็นลิงจ่าฝูงเข้าผสมพันธุ์กับลิง ศเมีย จึงเป็นการจุดประเด็นความสนใจให้ทำ รศึกษาวิจัยลักษณะทางพันธุกรรมของลิงฝูงนี้ **งคาดว่าจะเป็นลิงวอกฝูงสุดท้ายที่พบ นประเทศไทย** เนื่องจากไม่เคยสำรวจพบลิง นิดนี้อีกเลยในประเทศ

รศ.สุจินดา เผยถึงวิธีการศึกษาวิจัยว่าแบ่งออกเป็นการศึกษาในภาคสนามและห้องปฏิบัติการ โดยศึกษาถึงโครงสร้างทางสังคมของลิงวอกซึ่งเป็นสัตว์สังคม มีการแบ่งชั้นวรรณะเป็นลิงจ่าฝูง รองจ่าฝูง และลูกน้อง รวมถึงพฤติกรรมการกินอาหาร การผสมพันธุ์ ฯลฯ จากนั้นจึงมีการวางกรงดักจับลิงขนาด ๖ x ๖ เมตร หรือ ๖ x ๑๒ เมตร ช่วงเวลาที่ดักจับลิงจะเป็นช่วงฤดูแล้ง ลิงที่จับมาได้จะถูกนำไปฉีดยาสลบ เจาะเลือดเพื่อสกัด DNA ตรวจพยาธิในเลือด วัดขนาดร่างกาย สีขน พิมพ์ลายนิ้วมือ ตรวจอุจจาระ ฯลฯ จนถึงขณะนี้ได้ข้อมูลจากการศึกษาเบื้องต้นพบว่าลิงพยายามจะแยกฝูงออกไปแต่ไม่สามารถทำได้ เนื่องจากพื้นที่อยู่อาศัยเป็นเนินเขาที่ถูกล้อมรอบด้วยพื้นที่เกษตรกรรม นอกจากนี้ลูกลิงที่เกิดจากการผสมพันธุ์ระหว่างลิงกังเพศผู้กับลิงวอกเพศเมียมีจำนวนทั้งสิ้น ๓ ตัว ซึ่งมีลักษณะไม่เป็นหมันและเกรงว่าอาจจะไปผสมพันธุ์กับลิงตัวอื่นๆในฝูงต่อไป ส่งผลให้ลักษณะทางพันธุกรรมของลิงวอกที่แท้จริงเปลี่ยนแปลงไปได้

รศ.สุจินดาวาดหวังว่าผลการศึกษาวิจัยเรื่องนี้จะสร้างความตื่นตัวแก่นักวิจัยไทยให้สนใจศึกษาวิจัยเกี่ยวกับลิงมากยิ่งขึ้น เนื่องจากปัจจุบันในบ้านเรามีนักวิจัยที่ศึกษาเรื่องนี้น้อยมาก ในโครงการวิจัยนี้จึงต้องอาศัยความร่วมมือจากนักวิจัยชาวญี่ปุ่นและอินโดนีเซีย (Assoc. Prof. Dr. Yuzuru Hamada จาก Primate Research Institute มหาวิทยาลัยเกียวโต และ Mr. Islamul Hadi นักศึกษาปริญญาโท จาก Laboratory of Zoology, Department of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Science, Border Agricultural University"

ลิงเป็นสัตว์ที่มีลักษณะใกล้เคียงกับมนุษย์ การเปลี่ยนแปลงทางสภาพแวดล้อมที่เกิดขึ้นและมีผลกับลิงย่อมหมายความว่าสามารถมีผลกับคนเราได้เช่นกัน ในการอนุรักษ์ลิงวอกซึ่งมีเหลืออยู่น้อยเต็มทีจนใกล้จะสูญพันธุ์นั้น ส่วนสำคัญเกิดจากการที่มนุษย์เข้าไปทำลาย

พื้นที่อยู่อาศัยและหาอาหารของลิง ส่วนการนำลิงคนละชนิดเข้าไปปล่อยในฝูงก็จะทำให้เกิดจากสูญเสียลักษณะทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตนั้นไป" รศ.สุจินดา กล่าวในที่สุด ■

The Nation

[NATIONAL]

Print this page   Send to friends

Last wild rhesus macaques studied

Published on Sep 8, 2003

A team of researchers yesterday unveiled a study of what it believes to be the last remaining troop of rhesus macaques, a rare monkey species, living in the wild in Thailand.

Researcher Suchinda Malaiwichitnont, also a lecturer at Chulalongkorn University's Science Faculty, said yesterday that her team had spent 15 years scouring the country before locating the group in Loei in 1998.

Chulalongkorn University and Japan's Kyoto University jointly conducted the study.

"We believe this is the last group of free rhesus macaques in Thailand," Suchinda said. She blamed human intrusions into the monkeys' natural habitat and the resulting loss of food sources as a main cause of the rhesus macaques' decline in numbers.

The lecturer said this last troop had 142 members, led by a male pig-tailed macaque that had been released into the wild by local people. The troop includes three |pig-tailed/rhesus macaque hybrids. The hybrids are fertile and could bring about genetic changes in the rhesus-macaque population, the lecturer said.

Suchinda hoped her study would focus more academic attention on the monkeys, which she pointed out are one of the closest species to human beings. "That means environmental factors that affect monkeys can affect human beings as well," she said.

She lamented the fact that very few Thai researchers had expressed an interest in conducting research on monkeys.

อพิมพ์คุณภาพ เพื่อ
าพของประเทศ

มติชน

[ดวงชะตา] [อบรมวิชาชีพ] [ท่องเที่ยว] [ฟอรั่ม] [อีการ์ด] [ข้อมูลบริษัท]

HOME | มติชน | ข่าวสด | ประชาชาติธุรกิจ | มติชนสุดสัปดาห์ | ศิลปวัฒนธรรม | เทคโนโลยีชาวบ้าน | เส้นทางเศรษฐี | สำนักพิมพ์ | ศูนย์ข้อมูล | หางาน

กวันที่ข่าวย้อน
่าวหน้า1
ารเมือง
ศรษฐกิจ
ารศึกษา
ันเทิง
ีฬา
กระบวนการ
ธรรม
ชีวิตคุณภาพ
ภูมิภาค
ผู้หญิง-ครอบครัว
กระแสทรรศน์
ประชาชื่น
ออนไลน์
โลกวัยใส

วันที่ 11 กันยายน พ.ศ. 2546 ปีที่ 26
ฉบับที่ 9316

หวั่นลิงวอกฝูงสุดท้ายในไทยกลายพันธุ์

รศ.สุจินดา มาลัยวิจิตรนนท์ อาจารย์ภาควิชาชีววิทยาคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ผู้ศึกษาวิจัยเรื่อง "การผสมข้ามพันธุ์และความแตกต่างแปรผันทางพันธุกรรมของลิงวอก ที่วัดถ้ำผาหมากฮ่อ อ.วังสะพุง จ.เลย" เปิดเผยว่า "ลิงวอก" (Rhesus Macaques) เป็นหนึ่งในลิง 5 ชนิด ในสกุล Macaca ที่พบในประเทศไทย นอกเหนือจากลิงแสม ซึ่งพบมากที่สุด ลิงกัง ลิงอ้ายเงี๊ยะ ลิงเสน ในอดีตมีการพบลิงชนิดนี้บริเวณตอนบนของประเทศไทยที่ จ.ตาก เชียงใหม่ หนองคาย และเลย จากการศึกษาสำรวจร่วมกันระหว่างจุฬาฯ และ มหาวิทยาลัยเกียวโตประเทศญี่ปุ่น เมื่อ 15 ปีที่ผ่านมา ไม่มีการค้นพบลิงชนิดนี้ในธรรมชาติในประเทศไทย จนกระทั่งในปี 2541 ได้พบลิงวอกฝูงหนึ่งซึ่งมีความแตกต่างจากลิงที่พบโดยทั่วไปที่วัดถ้ำผาหมากฮ่อ อ.วังสะพุง จ.เลย

รศ.สุจินดากล่าวว่า จากการศึกษาพบว่าเริ่มก่อตั้งฝูงตั้งแต่ 20 ปีที่แล้ว จากลิงเพียงแค่ 8 ตัว และได้ผสมพันธุ์กันเองจนปัจจุบันมีลิงทั้งสิ้น 142 ตัว รวมทั้งได้มีชาวบ้านที่รู้เท่าไม่ถึงการณ์นำลิงกังเพศผู้มาปล่อยเข้าสู่ลิงฝูงนี้จนกลายเป็นลิงจ่าฝูงเข้าผสมพันธุ์กับลิงเพศเมีย จึงเป็นการจุดประเด็นความสนใจให้ศึกษาวิจัยลักษณะทางพันธุกรรมของลิงฝูงนี้ ซึ่งคาดว่าจะเป็นลิงวอกฝูงสุดท้ายที่พบในประเทศไทยเนื่องจากไม่เคยสำรวจพบลิงชนิดนี้อีกเลยในประเทศ

รศ.สุจินดาเผยถึงวิธีการศึกษาวิจัยว่า แบ่งออกเป็นการศึกษาในภาคสนามและห้องปฏิบัติการ โดยศึกษาถึงโครงสร้างทางสังคมของลิงวอกซึ่งเป็นสัตว์สังคม มีการแบ่งชั้นวรรณะเป็นลิงจ่าฝูง รองจ่าฝูง และลูกน้อง รวมถึงพฤติกรรมการกินอาหาร การผสมพันธุ์

"การศึกษาเบื้องต้นพบว่าลิงพยายามจะแยกฝูงออกไปแต่ไม่สามารถทำได้ เนื่องจากพื้นที่อยู่อาศัยเป็นเนินเขาที่ถูกล้อมรอบด้วยพื้นที่เกษตรกรรม นอกจากนี้ลูกลิงที่เกิดจากการผสมพันธุ์ระหว่างลิงกังเพศผู้กับลิงวอกเพศเมียมี 3 ตัว ซึ่งมีลักษณะไม่เป็นหมัน และเกรงว่าอาจจะไปผสมพันธุ์กับลิงตัวอื่นๆ ในฝูงต่อไป ส่งผลให้ลักษณะทางพันธุกรรมของลิงวอกที่แท้จริงเปลี่ยนแปลงไปได้" รศ.สุจินดากล่าว และว่า ผลการศึกษาวิจัยเรื่องนี้จะสร้างความตื่นตัวแก่นักวิจัยไทยให้สนใจศึกษาวิจัยเกี่ยวกับลิงมากยิ่งขึ้น เนื่องจากปัจจุบันในบ้านเรามีนักวิจัยที่ศึกษาเรื่องนี้น้อยมาก จึงต้องอาศัยความร่วมมือจากนักวิจัยชาวญี่ปุ่นและอินโดนีเซีย

หน้า 21

<< :::: Back Page ::::o

ธีการค้นหาข่าว
ส่คำที่ต้องการค้น
าที่ ช่องว่างสีแดง
านบน จากนั้นคลิ
ที่ ค้นหาข่าว ค่ะ

มายเหตุ
ากต้องการค้นจาก
นที่ สามารถพิมพ์
น/เดือน/ปี พ.ศ.
ช่น 15/12/2545
รือ
ดือน/ปี พ.ศ. เช่น
2/2545 หรือ
น/ เช่น 15/

ากคำที่ต้องการ
นมีเว้นวรรค
space) เช่น
อ นามสกุล ให้
ขียนเครื่องหมาย
%" แทนที่ว่าง
ังตัวอย่าง
มิตรา จันทร์เงา

Bangkok Post
outlook

Monday
22 September 2003
Last updated 8:48
AM Thai local time

NATURE

Monkey business

Humans are to blame for primate genetic mess

Story by PONGPET MEKLOY Pictures by SUCHINDA MALAIVIJITNOND

Although the rhesus monkey population at Wat Tham Pha Mak Ho keeps growing every year, inbreeding and hybridisation may soon take their toll.

When a lone pig-tailed macaque faces a troop of more than a hundred rhesus macaques and there's nowhere to run, what do you think would happen? Well, in the case at Wat Tham Pha Mak Ho in Loei province, the newcomer simply made the other monkeys, each of whom was only about half his size, recognise him as the new boss. And this is causing scientists to worry.

Assoc Prof Suchinda Malaivijitnond and her colleagues at Chulalongkorn University's Primate Research Unit found this troop of rhesus monkeys, or ling wok in Thai, in 1998, well before the arrival of the pig-tailed macaque, or ling kang as the species is known in Thai.

It was the first discovery of free-roaming ling wok since the team began their studies on the Kingdom's macaques in 1988. The troop had 115 monkeys.

After interviews with the monks and locals, Dr Suchinda found that this population of rhesus macaque originated two decades earlier from only eight individuals. Their habitat, a forested limestone hill on which the monastery is located, is surrounded by farmlands. Living in such an isolated place, plus the fact that over the past decades rhesus macaques in Thailand have become far from common, the

:IALS
ominent
prises
te to the King
mory of Prince
dol
opics
Generation
iomic Reviews
Year 2003
-End 2002
Year 2002
-End 2001
Year 2001
-End 2000
Year 2000
-End 1999
VICES
ing
IAL PROJECTS
r Foundation
Foundation
Care
CATION
ning Post
ent Weekly
d-a-Day
ERTISING
Print Ads
Ads
SCRIBE
gkok Post
Today
lent Weekly
OUT US
ual Report 2002
ual Report 2001
ual Report 2000
ual Report 1999
NTACT US
our team
our newsletter
ister with Us
Directory

The new alpha-male of Wat Tham Pha Mak Ho's troop of rhesus monkeys _ a pig-tailed macaque, or ling kang in Thai.

ling wok at Wat Tham Pha Mak Ho had virtually no chance of exchanging genes with outsiders of their own kind.

It took the primatologist and her team a few years before they could find funding for a systematic study of this rare rhesus macaque population. Finally, with the required support from the Biodiversity Research and Training Programme (BRT), they were able to begin the work in 2001.

With the money, the researchers conducted another survey of Wat Tham Pha Mak Ho's monkeys in February that year. With surprise, they found that the alpha male _ the one with most chances of mating with females in the troop _ is not a member of the same species but a pig-tailed macaque.

``According to the monks, the pig-tailed macaque was a former pet. The animal was cute when it was young, but as it grows it became more and more aggressive towards people. So the owner brought him to the monastery and left him there," says Dr Suchinda.

This young hybrid shows traces of both species. He has a dark cap on the head like his dad, with a whorled hair pattern on each cheek and a hairy tail just like his mum.

With such confined habitat, the pig-tailed macaque had to share resources with the existing rhesus macaques. But the big guy, weighing 13.5 kilogrammes, had no problem getting along with the old folks. The largest rhesus males, who later became his sidekicks, weighed only 6.5kg.

Months after the presence of the new alpha male, females in the troop gave birth to three offspring who have several characteristics that are different from other young members of the troop. One example is the hair on their heads: Instead of being the same colour as the body and facing backwards, it's parted sideways and dark in colour, so much so that it looks as if these youngsters are wearing a cap, just like the pig-tailed macaque (see pictures).

Obviously, the two species have produced hybrids.

``Other than inbreeding, hybridisation is another genetic threat that this rare rhesus macaque population is facing," Dr Suchinda points out.

Early this year the research team decided to trap some of the macaques so they could learn more about them. Out of the 142 monkeys, 33 _ including the pig-tailed macaque and the hybrids _ were caught and anaesthetised so that Dr Suchinda and her colleagues could take measurements and photos and collect blood samples for DNA testing.

``We had to be quick. And while we were busy working on the sleeping monkeys, we had to have several men surrounding us to ward off other members of the troop who were trying to come in and rescue their friends," she relates.

This mother rhesus macaque is holding a baby that looks like a normal ling wok. Yet its parentage can't be confirmed until its DNA is thoroughly examined.

To prevent the pig-tailed macaque from producing more hybrids, the researchers had him neutered. As for the new capped kids, they are now three years old and will soon reach sexual maturity. If these hybrids have the ability to produce offspring, they will have to be sterilised, too.

It seems as if the problem of hybridisation is now under control, at least to some extent. However, during Dr Suchinda's latest trip to Wat Tham Pha Mak Ho just a few weeks ago, she spotted two more hybrids among this year's batch of newborn monkeys.

For now, it is uncertain whether these babies were fathered by the alpha-male before he was neutered or the older hybrids.

At present, the primatologist is trying to figure out how to restore the genetic purity of the rhesus monkey at the monastery.

In the meantime, she has also been seeking information from locals in northern and northeastern provinces from where the species used to be reported.

The good news is that based on that information, she recently found another troop of ling wok, a really wild one, in Phu Wua Wildlife Sanctuary in Nong Khai province.

But living in the forest doesn't guarantee that this newly discovered troop will be free of hybridisation.

``I've seen a hybrid of the stump-tailed macaque and the long-tailed [crab-eating] macaque in Kaeng Krachan National Park," she said, adding that a female long-tailed macaque, a former pet, was released by its owner in the part of the forest occupied by a troop of stump-tailed.

``Hybridisation among primates is widespread in Thailand. And in most cases, it's caused by humans," she says. ``If you take a closer look at the monkey troops at Khao Sammuk in Chon Buri or Sarn Phrakan in Lop Buri, you'll find individuals that are of different species from the majority. They're all discarded pets," the researcher points out.

``To most people, all monkeys are the same. It doesn't matter which species they are. When the keepers don't want to keep their monkeys any more, they just leave them with wild, or semi-wild, troops, thinking that with such company their pet will survive," she continues.

But to the macaques, it's not that easy.

If the newcomer is a male, explains Dr Suchinda, it is likely to be forced away. The pig-tailed macaque at Wat Tham Pha Mak Ho was lucky that the existing rhesus macaques were not as large and strong as he.

``If the newcomer is a female, like the long-tailed macaque at Kaeng Krachan, she may be allowed to hang around nearby. But that just raises the chance of hybridisation," she says.

As a back-up measure for possible genetic crisis, Chula's Primate Research Unit has created a DNA bank which now has more than 400 DNA samples of Thailand's five species of macaques and other primates. But the scientists alone won't be able to fight this problem.

Well, let's be straightforward: No more discarding your pets. Even better, stop keeping wildlife as pets.

ลิงวอก ...ฝูงสุดท้าย

ลูกลิงวอก

ลิงกัง

2547 ไพล่ม ทูเดย์

ฯ กไม่กี่เดือนข้างหน้านี้ก็จะผ่านพ้นปีมะแมเพื่อเข้าสู่ปีวอก เช่น
 เดียวกับการเริ่มต้นวันใหม่ในปีนี้เช่นกัน หากแต่ในขณะที่กำลัง
วนกลับเข้าสู่ปีวอกอีกครั้ง สัตว์ที่เป็นเจ้าของชื่อของปีกลับมีจำนวน
ดน้อยลงมาก จนมีภาวะใกล้สูญพันธุ์ไปจากเมืองไทย

ลิงวอก เป็นลิงโลกเก่าที่อยู่ในตระกูลมาคาคา (Macaca sp.) ซึ่ง
ากไม่รวมลิงวอกแล้ว ในประเทศไทยยังสามารถพบลิงในตระกูลนี้อีก
ชนิดด้วยกัน คือ ลิงหางยาว (หรือลิงแสม) ลิงกัง ลิงอ้ายเงี๊ยะ
ละลิงเสน

ลักษณะเด่นที่ใช้จำแนกลิงวอกออกจากลิงชนิดอื่น คือสีขนจะมี 2
 โดยขนตามลำตัวนั้นจะมีสีน้ำตาลอ่อน แต่ขนบริเวณส่วนหลังและ
ัวจะมีสีน้ำตาลที่เข้มกว่า ส่วนขนที่สะโพกจะออกสีส้มแดง ส่วนของ
างมีขนยาวเป็นพวง ความยาวของหางนั้นประมาณครึ่งหนึ่งของ
วามยาวหัวถึงลำตัว (ไม่เกิน60%) ที่สำคัญคือ ขนบริเวณสองข้าง
ก้มม้วนวนเป็นก้นหอยชัดเจน

โดย
โครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบาย
การจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย (BRT)

ไม่เพียงมีรูปร่างลักษณะ สีขนหรือความยาวหางที่ แตกต่างไปจากลิงชนิดอื่น เท่านั้น ลิงวอกยังเป็นสัตว์ที่
มีฤดูกาลในการผสมพันธุ์ต่างจากลิงในสกุลมาคาคาในชนิดอื่นๆ ที่
สามารถผสมพันธุ์ได้ตลอดทั้งปี โดยที่ฤดูการผสมพันธุ์ของลิงวอกนั้นจะ
ไม่แน่นอนขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อม หากอาศัยอยู่ในประเทศเขตหนาว
ลิงวอกก็จะเริ่มผสมพันธุ์ในฤดูใบไม้ร่วง (ประมาณเดือนกันยายนหรือ
ตุลาคม) และคลอดลูกในฤดูใบไม้ผลิ (ช่วงเดือนกุมภาพันธ์) แต่ถ้าลิง
วอกอาศัยอยู่ในบริเวณสภาพแวดล้อมที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงมากนัก
ฤดูกาลผสมพันธุ์อาจจะไม่ชัดเจนเท่าที่ควร

สำหรับการย่างเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์ของลิงวอกนั้นต่างกันในเพศผู้และเพศเมีย ตัวผู้จะเข้าสู่วัยรุ่นเมื่ออายุ 4.5 ปี มีน้ำหนักตัวประมาณ 6 กิโลกรัม ส่วนเพศเมียจะเข้าสู่วัยรุ่นเมื่ออายุ 3.5 ปี มีน้ำหนักประมาณ 3 กิโลกรัม โดยหากเข้าสู่ช่วงฤดูผสมพันธุ์อัณฑะของลิงวอกเพศผู้จะมีขนาดใหญ่ขึ้นจากเดิมประมาณ 2 เท่า ส่วนในลิงวอกเพศเมียสังเกตได้จากการมีประจำเดือนครั้งแรก ซึ่งการมีประจำเดือนลิงวอกนั้นไม่ต่างจากคนเลยคือ มีความยาวแต่ละรอบเดือนประมาณ 29 วัน และในแต่ละรอบเดือนจะนานประมาณ 3 วัน ดังนั้นจึงมีช่วงระยะเวลายอมรับการผสมพันธุ์เพียง 11 วันในแต่ละรอบเดือน เมื่อเข้าสู่ช่วงฤดูผสมพันธุ์ ลิงวอกตัวเมียที่ได้รับการผสมพันธุ์และตั้งท้องมันจะใช้เวลาตั้งท้องนานถึง 165 วัน แต่ออกลูกเพียงครั้งละ 1 ตัว โดยลูกจะเกาะติดอยู่กับอกแม่นาน 7-14 เดือนทีเดียว

การแพร่กระจายของลิงวอกส่วนใหญ่นั้นพบที่ อัฟกานิสถาน

อินเดีย เนปาล อัสสัม พม่า จีน และประเทศในแถบอินโดจีน สำหรับในประเทศไทยสามารถพบได้ในบริเวณภาคเหนือตอนบน มักอาศัยอยู่ในป่าเบญจพรรณและป่าเต็งรัง หรือมักพบอาศัยอยู่ร่วมกับมนุษย์ในบริเวณสวนสาธารณะ ในหมู่บ้าน หรือวัด เป็นต้น สาเหตุสำคัญที่มีผลให้ลิงหลายชนิดจำเป็นต้องมีการอพยพมาอาศัยคลุกคลีอยู่ใกล้กับมนุษย์นั้นคือ การถูกรุกล้ำทำลายพื้นที่ซึ่งเป็นแหล่งอาศัยและแหล่งอาหารจนไม่มีเหลือ ลิงที่ไม่สามารถปรับตัวหรือหาอาหารได้อย่างลิงวอก จึงลดจำนวนลงอย่างรวดเร็ว รศ.สุจินดา มาลัยวิจิตรนนท์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ผู้ที่ทำงานวิจัยเกี่ยวกับลิงในตระกูลมาคาคา (Macaca sp.) กล่าวว่า จากการศึกษาวิจัยลิงสกุลมาคาคา ร่วมกับมหาวิทยาลัยโตเกียว ประเทศญี่ปุ่น ตลอด 15 ปีที่ผ่านมา ไม่เคยมีการพบฝูงลิงวอกในประเทศไทยเลย ไม่ว่าจะเป็นในป่าหรือในวัด ในขณะที่ลิงหางยาวยังสามารถพบได้ตามสถานที่แหล่งท่องเที่ยว หรือสถานที่ศักดิ์สิทธิ์ทางศาสนา เช่น ศาลพระกาฬ จังหวัดลพบุรี ศาลเจ้าแม่สามมุข บางแสน หรือเขาวัง เป็นต้น อีกทั้งยังไม่พบรายงานการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับลิงวอกเลย ทั้งที่เมื่อประมาณ 30 ปีที่แล้ว ลิงวอกเป็นลิงที่นิยมนำมาใช้เป็นสัตว์ทดลองทางด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์ โดยเฉพาะงานวิจัยในด้านจิตวิทยา

แม้ว่าการเริ่มต้นทำงานวิจัยของ รศ.สุจินดา จะเป็นลิงหางยาวไม่ใช่ลิงวอก แต่ด้วยความเพียรพยายามออกสำรวจศึกษาในภาคสนามร่วมกับนักวิจัยชาวต่างชาติในหลายพื้นที่ ได้กลายเป็นสิ่งชักนำไปสู่การค้นพบครั้งสำคัญของฝูงลิงวอก ณ วัดถ้ำหมากก่อ เมื่อปี 2541 และถือเป็นลิงวอกฝูงเดียวที่มีการค้นพบในประเทศไทยนับถึงวันนี้

รศ.สุจินดา เล่าว่า การพบฝูงลิงวอก ณ วัดถ้ำหมากก่อ อำเภอวังสะพุง จังหวัดเลย นั้นเป็นการพบโดยบังเอิญ จากการสอบถามเจ้าอาวาสทำให้ทราบว่าเริ่มต้นฝูงลิงวอกมีเพียงแค่ 8 ตัวเท่านั้น โดยลิงวอกเหล่านี้สามารถรอดพ้นจากกระบวนการฆ่าแม่ลิงเพื่อเอาลูกไปขายเป็นสัตว์เลี้ยง หรือจับไปขายภัตตาคารเพื่อทำเป็นอาหารตอบสนองตัณหาของคนไม่กี่คนที่มีความเชื่อผิดๆ โดยลิงวอกฝูงนี้จึงเข้ามาอาศัยอยู่ในวัดแห่งนี้เป็นเวลานานกว่า 20 ปีแล้ว และเกิดการผสมพันธุ์กันเองภายในกลุ่มจนปัจจุบันมีลิงอยู่ทั้งหมด 115 ตัว ซึ่งการผสมกันเองภายในฝูงแบบนี้จะมีผลให้ความแตกต่างทางพันธุกรรมลดลง จนความผิดปกติทางพันธุกรรมบางอย่างอาจแสดงออกมาได้ในรุ่นหลังๆ

ไม่เพียงเท่านั้น เมื่อทีมวิจัยเดินทางกลับเข้าสำรวจฝูงลิงวอกเพื่อวางแผนวิจัยในครั้งต่อมา จ่าฝูงของลิงกลุ่มนี้กลับกลายเป็น ลิงกังอายุ 7 ปี ซึ่งจากการสอบถามทราบว่าถูกเจ้าของนำมาปล่อยทิ้งไว้ที่วัด โดยที่ไม่รู้ว่าลิงชนิดเดิมที่อาศัยอยู่ในบริเวณนั้นเป็นคนละชนิดกัน ซึ่งการที่ลิงกังตัวนี้มีขนาดใหญ่มาก มีน้ำหนักถึง 13.5 กิโลกรัม ในขณะที่ลิงวอกตัวผู้ขนาดใหญ่ที่สุดของฝูงหนักเพียง 6.5 กิโลกรัม ทำให้ลิงผู้มาใหม่จึงสามารถเข้าไปเป็นจ่าฝูงได้ในที่สุด ซึ่งสิ่งที่นักวิจัยเป็นห่วงคือลิงกังตัวนี้จะมีโอกาสผสมพันธุ์กับลิงวอกในฝูงเป็นอันดับต้นๆ และลูกที่เกิดจากการผสมข้ามสายพันธุ์จะไม่ใช่ลิงวอกอีกต่อไป ซึ่งในที่สุดทีมวิจัยก็ได้พบกับลูกลิงที่มีลักษณะคล้ายลูกผสมระหว่างลิงกังและลิงวอกอย่างที่ห่วงไว้จริงๆ เนื่องจากมีสีขนและลักษณะทั่วไปเหมือนลิงวอก แต่มีขนตั้งบริเวณส่วนหัวเหมือนลิงกัง

จากสภาพปัญหาที่เกิดขึ้น เป็นที่มาของงานวิจัยเรื่อง "การผสมข้ามพันธุ์และความแตกต่างทางพันธุกรรมของลิงวอก ณ วัดถ้ำผาหมากก่อ จังหวัดเลย" ภายใต้การสนับสนุนของโครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย (BRT) โดยนอกจากเพื่อศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมที่เกิดจากการผสมพันธุ์ในลิงฝูงนี้แล้ว ยังต้องการหาแนวทางการจัดการปัญหาที่เป็นอยู่และที่จะเกิดตามมา เนื่องจากลิงตระกูลนี้เมื่อมีการผสมพันธุ์ข้ามชนิดแล้ว ลิงลูกผสมที่เกิดมาสามารถจะผสมพันธุ์และให้กำเนิดลูกหลานต่อไปได้อีก ซึ่งจะส่งผลให้ลูกหลานลิงวอกที่เกิดใหม่ไม่คงรูปร่างลักษณะของลิงวอกชนิดเดิมไว้ และในที่สุดลิงวอกชนิดเดิมก็อาจสูญหายไปในที่สุด รวมทั้งเพื่อเป็นข้อมูลในการจัดการหาแนวทางอนุรักษ์ให้ลิงวอกยัง

คงอยู่สืบไป

รศ.สุจินดา กล่าวว่า งานวิจัยที่กำลังดำเนินการอยู่ในขณะนี้ คือ วิเคราะห์ผลดีเอ็นเอของลิงวอกฝูงนี้ เปรียบเทียบกับลิงวอกสายพันธุ์ที่พบในอินเดียและจีน เบื้องต้นพบว่า ลักษณะทางพันธุกรรมของลิงวอกฝูงนี้ มีลักษณะทางพันธุกรรมที่ใกล้เคียงกับลิงแสมมากกว่าลิงวอกในจีนและอินเดีย โดยมีทฤษฎีอธิบายว่าลิงวอกในเมืองไทยอาจเกิดจากการผสมพันธุ์ระหว่างลิงวอกและลิงแสมก็ได้

สำหรับการวิเคราะห์ดีเอ็นเอว่าลูกลิงในฝูงเป็นลิงลูกผสมหรือไม่นั้น รศ.สุจินดา กล่าวว่า กำลังอยู่ระหว่างรอผลจากห้องปฏิบัติการ ซึ่งหากผลการตรวจดีเอ็นเอออกมาว่าเป็นลูกผสมที่เกิดระหว่างลิงกังและลิงวอกจริง สำหรับลูกผสมที่เกิดในฝูงนี้คงไม่ส่งผลมากนัก เนื่องจากการแก้ปัญหาเบื้องต้น ทีมวิจัยได้จับลิงกังจ่าฝูงมาตัดท่อนำอสุจิ ซึ่งแม้จะผสมพันธุ์ได้แต่ก็ไม่สามารถจะมีลูกกับตัวเมียได้อีกต่อไป ส่วนลูกผสมที่เกิดมาแล้วนั้นมีขนาดเล็ก ยังไม่สามารถสืบพันธุ์ได้ในขณะนี้จึงไม่น่าเป็นห่วงเท่าใดนัก

แต่การศึกษาครั้งนี้ ทำให้สถานภาพของลิงวอกในพื้นที่ป่าธรรมชาติน่าเป็นห่วงมากยิ่งขึ้น เพราะหากพฤติกรรมที่ฝูงลิงวอกยอมรับลิงพันธุ์อื่นเข้าไปเป็นจ่าฝูงเกิดขึ้น อาจนำมาซึ่งการสูญพันธุ์ของสายพันธุ์ลิงวอกในเมืองไทยได้ในระยะยาว ซึ่งอาจป้องกันได้โดยไม่ปล่อยลิงที่ต่างชนิดให้อยู่ด้วยกัน หรือทำหมันลิงตัวนั้นก่อนที่จะปล่อยไป แต่การไม่นำลิงที่เป็นสัตว์ป่ามาเลี้ยงคือวิธีการป้องกันที่ดีที่สุด เพราะลิงตัวเมียที่เกิดและเติบโตในธรรมชาติ จะอยู่กับฝูงมันไปตลอดชีวิต ขณะที่ลูกลิงเพศผู้ที่จะแยกตัวออกมาสร้างฝูงใหม่เมื่ออายุ 2-3 ปี ก็จะไม่เกิดพฤติกรรมผสมข้ามพันธุ์แต่อย่างใด นับเป็นกลไกธรรมชาติที่ช่วยให้ลิงเหล่านี้มีความหลากหลายสูง

แต่ด้วยสภาวะปัจจุบัน เนื่องด้วยแหล่งที่อยู่อาศัยของพวกมันถูกบุกรุกทำลายเหลือน้อยลงทุกที ลิงส่วนใหญ่ต้องอยู่อาศัยในสถานที่ที่จำกัด จนเกิดการผสมพันธุ์กันเองระหว่างเครือญาติภายในฝูงเดิม ส่งผลให้ลูกลิงที่เกิดใหม่พิการและอ่อนแอ และในไม่ช้าลิงวอกจึงค่อยๆ ลดจำนวนลงและสูญพันธุ์ไปในที่สุด

รศ.สุจินดา กล่าวสรุปในตอนท้ายว่า แม้ว่าปัญหาการผสมข้ามสายพันธุ์ จะเป็นปัญหาที่อาจทำให้ลิงวอกแห่งวัดถ้ำผาหมากฮ่อ รวมถึงลิงวอกฝูงอื่นๆ ที่หลงเหลืออยู่ไม่มากนักในเมืองไทย มีพันธุกรรมเปลี่ยนไปในระยะยาว แต่การทำลายสภาพป่าที่อยู่อาศัยของมัน รวมถึงค่านิยมการนำสัตว์ป่ามาเป็นประโยชน์ส่วนตัวของคนบางกลุ่ม ที่เคยเกิดขึ้นและยังไม่หมดไปในปัจจุบัน คือตัวการสำคัญสิ่งที่จะทำให้ลิงผู้เป็นเจ้าของนักษัตรแห่งปี 2547 เหลือเพียงแต่ชื่อไว้ให้เราเรียกกัน เท่านั้น ○

TRAVEL

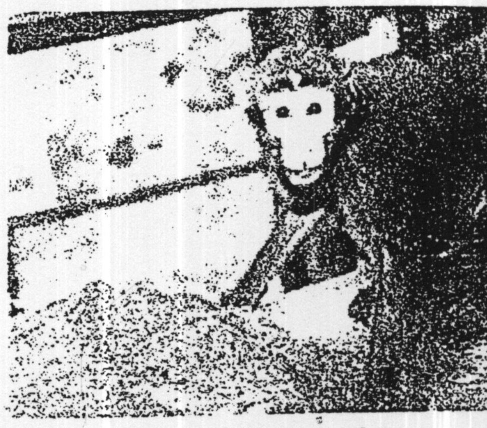
เที่ยวเมืองไทย บทเรียนที่ไม่มีในตำรา

97.5 ผู้จัดการ

วันพุธที่ 21 มกราคม พ.ศ. 2547

ลิงวอกฝูงสุดท้ายที่วัดถ้ำผาหมากฮ่อ

ดูเหมือนว่าปีนี้เรื่องของคุณจ๋อจะถูกกล่าวขวัญถึงอยู่บ่อยๆ คงเพราะปีนี้คือ ปีวอก ปีของพวกเขานั่นเอ ลิงวอก ตัวแทนนักษัตรตัวจริงนั้นกำลังจะสูญพันธุ์ไปจากประเทศไทยในเวลาอันใกล้นี้



หน้าตาชัดๆของลิงวอก

สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ได้ออกมาเปิดเผยการทำวิจัยของ **รศ.ดร.สุจินดา มาลัยวิจิตรนนท์** ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ภายใต้การสนับสนุนของโครงการ BRT (โครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพแห่งประเทศไทย) ทำให้ได้รู้ว่าตอนนี้ลิงวอกกำลังเจอกับวิกฤตของสายพันธุ์ แทบจะหาฝูงลิงวอกในประเทศไทยไม่ได้เลยแม้แต่ฝูงเดียว

จนเมื่อทีมวิจัยของ รศ.ดร.สุจินดา ทำการสำรวจภาคสนามจึงได้พบกับฝูงลิงวอกโดยบังเอิญที่ **วัดถ้ำผาหมากฮ่อ อ.วังสะพุง จ. เลย** จำนวน 142 ตัว ซึ่งเจ้าลิงฝูงนี้เกิดผสมพันธุ์กันเองภายในกลุ่ม ส่งผลให้ความแปรผันทางพันธุกรรมลดลง ทำให้มีโอกาสการแสดงยีนด้อยในลูกหลานมากขึ้น และในที่สุดฝูงลิงที่เกิดใหม่ก็จะมีอัตราการเหลือรอดต่ำลงเรื่อยๆ จนอาจท ของลิงฝูงนี้ค่อยๆ ลดลงไปในที่สุด

ที่น่าตกใจไปกว่านั้นก็คือ จ่าฝูงของลิงวอกฝูงนี้กลับกลายเป็นลิงกังตัวผู้อายุ 7 ปี ลูกลิงบางตัวในฝูงนี้ ผสมระหว่างลิงกังกับลิงวอก คือมีสีขนและลักษณะทั่วไปเหมือนลิงวอกแต่มีขนตั้งบริเวณส่วนหัวเหมือนลิงก ไว้อย่างนี้ก็จะไม่เหลือสายพันธุ์ลิงวอกชนิดเดิมในฝูงอีกต่อไป ทีมวิจัยเขาก็เลยจับลิงกังจ่าฝูงมาตัดท่ออสุจิ ต้องไม่มีลูกกับตัวเมียในฝูงได้อีก

ลิงวอกจะอยู่รวมกันเป็นฝูง มีตั
และตัวเมียทำหน้าที่เลี้

ลิงวอก (Rhesus Macaque) อยู่ในตระกูลมาคาคา (Macaca sp.) เป็นลิงฉลาดที่เชื่องไม่กลัวคน คนก็เลยชอบจับลิงวอกมาฝึกให้เล่นละครลิง หน่ำซ้ำนักวิทยาศาสตร์ก็ยังนิยมใช้เป็นสัตว์ทดลองยาหรือวิจัยด้านการแพทย์ต่างๆ เรียกว่าลิงวอกนี้ก็มีคุณประโยชน์แก่คนเรามากเหมือนกัน แต่ถึงแม้ลิงวอกจะจัดเป็นสัตว์ป่าคุ้มครองประเภทที่ 1 ก็ยังต้องอาศัยความร่วมมือของเราที่จะต้องป้องกันไม่ให้ลิงวอกไทยสูญพันธุ์ ด้วยการให้ลิงวอกได้กลับไปสู่แหล่งธรรมชาติที่มันสามารถจะสืบพันธุ์และออกลูกหลานต่อไปได้ และต้องดูให้ดีว่าในแถบนั้นมีลิงเจ้าถิ่นชนิดเดียวกับที่จะนำไปปล่อยหรือไม่ ถ้าเป็นลิงตัวผู้ก็ควรทำหมันก่อนเพื่อป้องกันการผสมข้ามพันธุ์

แต่สำคัญที่สุดก็คือมนุษย์เราต้องหยุดการรุกรานพวกเขา เพราะปัญหาที่เกิดขึ้นทั้งหมด ก็ล้วนเป็นผลสะท้อนที่เกิดขึ้นจากการกระทำของมนุษย์ ทั้งการจับลิงออกจากป่า การรุกล้ำทำลายพื้นที่อยู่อาศัยของลิงวอก ทำให้ลิงต่างชนิดต้องมาอยู่รวมแ ผสมพันธุ์เฉพาะในกลุ่มรวมถึงการผสมข้ามพันธุ์กันเกิดขึ้น ไม่อย่างนั้นในอนาคตประเทศไทยก็อาจจะไม่เหล เลยก็ได้

ข่าวหรือบทความอื่นๆ ในหมวด

"แม่คะนิ้ง"น้ำจากฟ้าที่มาพร้อมกับความหนาว(มาก) 18 ธ.ค. 2546 16:18

"ลูกเลียงผา"ของขวัญปีใหม่มีชีวิตที่เขาดิน 2 ธ.ค. 2546 19:32

22 ส.ค. 2547

ไทยรัฐ

ทันโลก

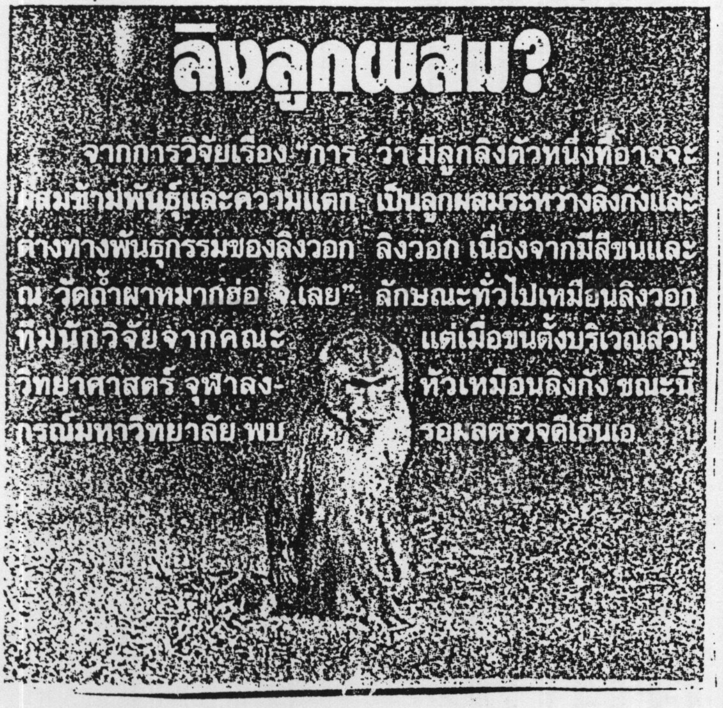
ลิงวอกเมืองไทยเหลือฝูงสุดท้าย เจ้าของนักษัตร47อาจมีแต่ชื่อ

พบลิงวอกอาจเป็นฝูงสุดท้ายในเมืองไทย แต่ลูกหลานกลายพันธุ์เป็นลิงผสม เพราะโดนลิงกังตัวผู้ซึ่งมีตัวใหญ่กว่าเข้ายึดอำนาจเป็นจ่าฝูงแทน ห่วงลิงวอกทั้งฝูงกลายพันธุ์หมด ลิงผู้เป็นเจ้าของนักษัตรปี 2547 อาจเหลือเพียงชื่อเท่านั้น

ทีมนักวิจัยนำโดย รศ.ดร.สุรินดา มาลัยวิจิตรนนท์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย แจ้งว่า ได้สำรวจพบฝูงลิงวอกโดยบังเอิญ ที่วัดถ้ำผาหมากฮ่อ อ.วังสะพุง จ.เลย หลังจากที่ได้ใช้เวลาศึกษามา 15 ปีแล้ว ไม่เคยพบฝูงลิงวอกในประเทศไทยแม้แต่ฝูงเดียว

ลิงวอกที่พบนี้มีจำนวนทั้งสิ้น 142 ตัว แม้ว่าลิงฝูงนี้จะแพร่ขยายพันธุ์จนมีจำนวนเกินกว่า 100 ตัว แต่ก็เป็นการผสมพันธุ์กันเองภายในฝูง ซึ่งจะส่งผลให้ความแปรผันทางพันธุกรรมลดลง ทำให้โอกาสการแสดงยีนด้อยในลูกหลานนั้นมีมาก ในที่สุดลูกลิงที่เกิดขึ้นใหม่จะมีอัตราการรอดต่ำลงเรื่อยๆ จนอาจทำให้จำนวนของลิงฝูงนี้ลดลงและหมดไปในที่สุด

ทีมวิจัยยังพบกับสิ่งที่น่าวิตกยิ่งกว่าว่า จ่าฝูงของลิงวอกฝูงนี้กลับเป็นลิงกังอายุ 7 ปี เนื่องจากลิงกังมีน้ำหนักตัวถึง 13.5 กก. ส่วนลิงวอกตัวผู้ขนาดใหญ่ที่สุดของฝูงมีน้ำหนักเพียง 6.5 กก. ลิงกังจึงเข้าไปยึดตำแหน่งจ่าฝูงได้อย่างง่ายดาย ทีมวิจัยยังได้พบลูกลิงที่อาจจะเป็นลูกผสมระหว่างลิงกังและลิงวอก เนื่องจากมีลูกลิงตัวดังกล่าวมีสีขนและลักษณะทั่วไปเหมือนลิงวอก แต่มีขนหัวตั้งเหมือนลิงกัง จึงเป็นได้ว่า ลูกหลานลิงวอกที่เกิดใหม่จะมีกลายเป็นลิงลูกผสม และในที่สุดจะไม่เหลือสายพันธุ์ลิงวอกชนิดเดิมในฝูงอีกต่อไป.



ลิงลูกผสม?

จากการวิจัยเรื่อง "การผสมข้ามพันธุ์และความแตกต่างทางพันธุกรรมของลิงวอก ณ วัดถ้ำผาหมากฮ่อ จ.เลย" ทีมนักวิจัยจากคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พบว่า มีลูกลิงตัวหนึ่งที่อาจจะเป็นลูกผสมระหว่างลิงกังและลิงวอก เนื่องจากมีสีขนและลักษณะทั่วไปเหมือนลิงวอก แต่เมื่อขนตั้งบริเวณส่วนหัวเหมือนลิงกัง ขณะนี้รอผลตรวจดีเอ็นเอ

...ะลิงพบเจ้าของ ป... ...ารที่ใกล้สูญพันธุ์

สำนักวิจัย สกว.ศึกษาพบลิงวอกที่อาจเป็นฝูงสุดท้ายในเมืองไทย มีปัญหาความ...นแอทางพันธุกรรม เพราะ "ลิงกัง" เข้ามาเป็นจ่าฝูง ทำให้เกิดลูกลิงลักษณะผสม ...าจกลายพันธุ์ ซึ่งจะส่งผลให้เหลือเพียงชื่อเท่านั้น

สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) รายงานว่า สัตว์เจ้าของปีนักษัตร "ลิงวอก" ...จำนวนลดลงจนอาจจะสูญพันธุ์ไปจากประเทศไทยในเวลาอันใกล้นี้ โดยอ้างคำกล่าวของ ...ศ.ดร.สุจินดา มาลัยวิจิตรนนท์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ...ั้งแต่เริ่มศึก... (Maca... ...ตั้งแต่ประมาณ... ในป่าหรือในวัด พบลิงในตระกู... หางยาวหรือลิงแสม ลิงกัง นอก... พบได้ตามสถานที่แหล่งท่องเที่ย... ทางศาสนา แต่ตลอด 15 ปีของ... ฝูงลิงวอกในประเทศไทยเลยแม้แ...

รศ.ดร.สุจินดา กล่าวว่า เมื่อไ... ทางออกสำรวจในภาคสนาม ทีมวิ... บังเอิญ ณ วัดถ้ำผาหมากฮ่อ อำ... จากการสอบถามชาวบ้านพบว่า ลิง... พักพิงเพื่อหลบหนีจากการล่าของม... มีแค่ 8 ตัว หลังจากผสมพันธุ์กั... ขณะนี้พบลิงวอกแล้วทั้งสิ้น 142 ตั...

"แม้ว่าลิงฝูงนี้จะสามารถแ... มากกว่าร้อยตัว แต่เป็นการผส... จะส่งผล... ...ปรผันทาง... การแสด... ...ในลูกหล...

...ตระ... ...มาคาคา ...546 ไม... ...ชนิด เช... ...แล้วยังสา... ...สถานที่ศักดิ์... ...ากลับไม่เคย... ...ย... ...จากกา... ...ฝูงลิ... ...วอ... ...ฝูง... ...ที่... ...โด... ...จากเริ... ...ใน... ...ม... ...พันธ์... ...มี... ...ใน... ...ต... ...ที่... ...ใหม่จะมีอัตราการรอดต่ำลงเรื่อยๆ จนอาจทำให้...ของลิงฝูงนี้ลดลงและหมดไปในที่สุด ซึ่งได้รับการยืนยันจากเจ้าอาวาสว่า มีการพบซากลูกลิงเพิ่มขึ้นกว่าแต่ก่อน จึงเป็นเรื่องที่น่าเป็นห่วงต่ออนาคตของลิงวอกฝูงนี้" รศ.ดร.สุจินดา ระบุ และว่า หลังจากทีมวิจัยเข้าสำรวจใน...ครั้งต่อมา กลับพบสิ่งที่น่าวิตกยิ่งกว่า คือ จ่าฝูงของลิง...กลุ่มนี้ กลับกลายเป็นลิงกัง อายุ 7 ปี

รศ.ดร.สุจินดา กล่าวว่า ขนาดของลิงกังมีน้ำหนักถึง 13.5 กิโลกรัม ในขณะที่ลิงวอกตัวผู้ขนาดใหญ่ที่สุดของฝูงมีน้ำหนักเพียง 6.5 กิโลกรัม ลิงกังตัวนี้จึงเข้าไปเป็นจ่าฝูงได้อย่างง่ายดาย ที่น่าวิตกคือ ลิงกังตัวนี้จะเป็นลิงตัวผู้ตัวแรกๆ ที่มีโอกาสผสมพันธุ์กับลิงวอกตัวเมียในฝูง ผลรายงาน...ศึกษาที่ผ่านมาพบว่า ลูกผสมที่เกิดจากการผสมพันธุ์ของลิงต่างชนิดในตระกูลมาคาคานั้น สามารถสืบพันธุ์ให้ลูกหลานต่อไปได้ จึงเป็นไปได้ว่าลูกหลานลิงวอกที่เกิดใหม่จะมีกลายเป็นลิงลูกผสม และในที่สุดจะไม่เหลือสายพันธุ์ลิงวอกชนิดเดิมในฝูงอีก

สำหรับแนวทางการคุ้มครองลิงวอกในเมืองไทยนั้นนอกเหนือจากการตรวจสอบค้นหาว่ามีลิงวอกไทยหลงเหลืออยู่ในผืนป่าแห่งใดบ้างแล้ว คนที่เป็นเจ้าของและเลี้ยงลิงวอกไว้ก็เป็นอีกกลุ่มหนึ่งที่สามารถช่วยป้องกันการสูญพันธุ์ของลิงวอกไทยได้ ด้วยการนำลิงเหล่านี้กลับไปสู่แหล่งธรรมชาติที่มันสามารถจะสืบพันธุ์และออกลูกหลานต่อไปได้ โดยให้เป็นหน้าที่ของเจ้าหน้าที่ที่จะดำเนินการ เพราะต้องศึกษาให้ดีก่อนว่าในบริเวณปล่อยลิงตระกูลนี้มีลิงเจ้าถิ่นชนิดเดียวกับลิงที่จะนำไปปล่อยหรือไม่

บ้านเมือง 22 มี.ค. 2547

เอกสารแนบหมายเลข 15

สกู๊ป

5

วิกฤติแห่งพันธุกรรม สัตว์สัญลักษณ์นักษัตรปี'47

ลิงวอกฝูงสุดท้ายที่วัดถ้ำผาหมากฮ่อ...!!!

2 6 ส.ค. 2547 แนวหน้า

วิกฤติแห่งพันธุกรรม
สัตว์สัญลักษณ์นักษัตรปี'47
ลิงวอกฝูงสุดท้าย

ที่วัดถ้ำพาหมากอ่อ...!!!

ลิงวอก RHESUS MACAQUES (*Macaca mulatta*)

ถิ่นกำเนิด ลิงวอกพบทางภาคเหนือของไทยตลอดไปถึงพม่าอินเดียตอนเหนือ เนปาล ขึ้นไปทางด้านตะวันออกของอัฟกานิสถาน จีนได้ และอินโดจีน

ลักษณะ เป็นลิงที่ใช้ฝึกเล่นละครได้ และฝึกให้เล่นละครได้ดีกว่าลิงแสม ลำตัวส่วนหลังสีน้ำตาล ส่วนอื่นสีน้ำตาลเทา หางยาวสมตัวแต่สั้นกว่าลิงแสม ขนบนหัวไม่มีกันหอยและจะขึ้นโค้งไปทางด้านหลังที่แก้มมีขนขึ้นวนเป็นกันหอย

นิสัย ฉลาด หัดง่าย ซุกซน เคลื่อนไหวอยู่เสมอ เป็นลิงที่ชอบอยู่รวมกันเป็นฝูงใหญ่ มีตัวผู้แก่เป็นจ่าฝูง ชอบอยู่ตามป่าที่มีโขดหินหรือหน้าผาและเป็นป่าที่ค่อนข้างแห้งแล้ง ออกหากินบริเวณใกล้เคียงกับที่อาศัย ชอบลงมาเดินบนพื้นดิน เป็นลิงที่เชื่องและไม่ค่อยกลัวคน

การสืบพันธุ์ อายุประมาณ 3-4 ปี ผสมพันธุ์ได้ ตั้งท้องประมาณ 5-7 เดือน ตกลูกครั้งละ 1 ตัว ลูกจะเกาะติดอกแม่ แม่จะเลี้ยงลูกประมาณ 1 ปี จึงปล่อยให้พ้นอกออกหากินเอง อายุยืนประมาณ 20 ปี

อาหาร กินผลไม้ ใบไม้อ่อน แมลงต่างๆ และสัตว์เล็กๆ เวลากินอาหาร มันจะเก็บอาหารไว้ถุงข้างแก้มก่อนแล้วจึงค่อยเอามือดันออกมากินภายหลัง

ย่างเข้าปี "นักษัตรวอก"...โหรหลายสำนักชี้ตรงกันว่าครอบครัวไหนอยากมีบุตรให้รีบเดินเครื่องปั๊มซะแต่เนิ่นๆ เนื่องจากวอกปีนี้ดีเป็นสิริมงคลเหมาะแก่การให้กำเนิดบุตร อีกทั้งเด็กที่เกิดปีนี้จะมีบุคลิกที่โดดเด่นกระฉับกระเฉงและดึงดูดผู้คน

ขณะที่หลายคู่กำลังเร่งปั๊มทายาทจะมีกี่มากน้อยที่ทราบว่าหนึ่งในสัตว์สัญลักษณ์นักษัตรอย่างเจ้าลิงวอกกลับมีจำนวนลดลงจนอาจจะสูญพันธุ์หมดไปจากบ้านเรา...!!!

ลิงวอก (Rhesus Macaques) เป็นลิงส[illegible]คาคา(Macaca) 1 ใน 5 ชนิดที่พบ[illegible]ศไทย นอกเหนือจากลิงแสม ลิง[illegible]เซี๊ยะ ลิงเสน ในอดีตมีการพบลิง[illegible]ณตอนบนของประเทศไทยที่ อ.[illegible]หนองคาย และเลย

[illegible]ศึกษาลิงในตระกูลมาคาคา มา[illegible]ช่วงปี 2526 ไม่เคยมีการ[illegible]ระเทศไทยเลยแม้

[illegible]สุจินดา มาลัยวิจิตรนนท์ ภา[illegible] คณะวิทยาศาสตร์ [illegible]มหาวิทยาลัย หนึ่งในทีมวิจัยลิ[illegible]ในประเทศไทย กล่าว พร้อมทั้งเล่าต่อว่า กระทั่ง[illegible]อไม่นานมานี้ จากการเดิ[illegible]อาสำรวจ[illegible]ภาคสนาม ทีมวิจัยได้พ[illegible]จากโดยบังเอิญ ณ วัดถ้ำผาห[illegible] จ.เลย ซึ่งจากการสอบถามชาวบ้านและ[illegible]นั้นจึงทำให้ทีมวิจัยพบคำตอบว่า ลิ[illegible]ป็นลิงที่เข้ามาพักพิงเพื่อ[illegible]ตั้งแต่ 20 ปีที่แล้วจา[illegible] 6 ตัว [illegible]ากผสมพันธุ์กันเองภายในฝูงทำให้ปัจจุบันมีลิงวอกทั้งสิ้น 142 ตัว

แม้ว่าจำนวนลิงมีเพิ่มขึ้นกว่าร้อยตัว แต่สิ่งที่น่าวิตกคือ การผสมพันธุ์กันเองภายในฝูงจะส่งผลให้ความแปรผันทางพันธุกรรมลดลง ทำให้โอกาสการแสดงยีนด้อยในลูกหลานนั้นมีมาก ในที่สุดลูกลิงที่เกิดใหม่จะมีอัตราการรอดต่ำลงเรื่อยๆ จนอาจทำให้จำนวนของลิงฝูงนี้ลดลงและหมดไปในที่สุด ซึ่งได้รับการยืนยันจากเจ้าอาวาสว่ามีการพบซากลูกลิงเพิ่มขึ้นกว่าแต่ก่อน จึงเป็นเรื่องที่น่าห่วงต่ออนาคตของลิงวอกฝูงนี้...!!!

รศ.ดร.สุจินดา อธิบายต่อว่า หลังจากทีมวิจัยทำการสำรวจในครั้งต่อมากลับได้พบกับสิ่งที่น่าวิตกว่า จ่าฝูงของลิงวอกฝูงนี้กลับเป็นลิงกังที่มีอายุเพียง 7 ปี...!!! โดยตามธรรมชาติแล้วลิงจ่าฝูงจะเป็นลิงตัวแรกๆ ที่มีโอกาสผสมพันธุ์กับลิงตัวเมียในฝูง และจากการตรวจสอบผลรายงานศึกษาที่ผ่านมาพบว่า ลูกผสมที่เกิดจากการผสมพันธุ์ของลิงต่างชนิดใน "ตระกูลมาคาคา" นั้น

สามารถสืบพันธุ์ให้ลูกหลานต่อได้ จึงเป็นไปได้ว่าลูกหลานลิงวอกที่เกิดใหม่จะมีการกลายเป็นลิงลูกผสม และในที่สุดก็จะไม่เหลือสายพันธุ์ลิงวอกชนิดเดิมในฝูงอีกต่อไป อีกทั้งทางทีมวิจัยเริ่มพบกับลูกลิงที่อาจเป็นลูกผสมระหว่างลิงกังกับลิงวอก ซึ่งลูกลิงดังกล่าวจะมีขนและลักษณะทั่วไปเหมือนลิงวอก แต่มีขนบริเวณส่วนหัวเหมือนลิงกัง

ด้วยเหตุนี้จึงเป็นการจุดประเด็นให้งานวิจัย "การผสมข้ามสายพันธุ์และความแตกต่างทางกรรมพันธุ์ของลิงวอก ณ วัดถ้ำผาหมากฮ่อ จ.เลย" ภายใต้การสนับสนุนของโครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพแห่งประเทศไทย (BRT) จึงได้เกิดขึ้นเพื่อทำการศึกษาตรวจสอบว่าลูกลิงดังกล่าวใช่ลูกผสมที่เกิดขึ้นระหว่างลิงกังและลิงวอกหรือไม่ อันจะเป็นข้อมูลสำคัญในการจัดการและวางแผนอนุรักษ์ลิงวอกฝูงสุดท้ายนี้ให้คงอยู่ต่อไป ซึ่งในขณะนี้ทางทีมวิจัยกำลังรอผลการตรวจสอบ "ดีเอ็นเอ" จากห้องปฏิบัติการ หากผลการตรวจสอบดีเอ็นเอ ออกมาว่าเป็นลูกผสมที่เกิดระหว่างลิงกังและลิงวอกจริง ก็ต้องมีการหาวิธีป้องกันการผสมข้ามสายพันธุ์สำหรับลิงตระกูลนี้

"สำหรับลูกลิงที่เกิดใหม่ฝูงนี้คงไม่ส่งผลมากนัก เนื่องจากทีมวิจัยได้จับลิงกังจ่าฝูงมาตัดท่อน้ำอสุจิที่ทำให้ไม่สามารถจะมีลูกให้ตัวเมียในฝูงได้อีกต่อไป ส่วนลูกผสมที่เกิดมาแล้วนั้นมีขนาดเล็กไม่สามารถสืบพันธุ์ได้ ในขณะนี้จึงไม่น่าเป็นห่วงมากนัก แต่ที่น่าวิตก คือ หากมีการผสมพันธุ์ข้ามชนิดเกิดขึ้นได้จริง ลิงตระกูลนี้ใน

26 ต.ค. 2547

พื้นที่อื่นๆ ของประเทศไทยก็มีความเสี่ยงเป็นลิงลูกผสม จนอาจทำให้สายพันธุ์ของลิงพันธุ์แท้หมดไปในที่สุด" รศ.ดร.สุจินดา กล่าว

ในส่วนของแนวทางการคุ้มครองลิงวอกในเมืองไทยนั้น รศ.ดร.สุจินดา ชี้แจงว่า นอกเหนือจากการตรวจสอบค้นหาว่ามีลิงวอกไทยหลงเหลืออยู่ในผืนป่าแห่งใดบ้างแล้ว คนที่เป็นเจ้าของและเลี้ยงลิงวอกไว้ก็เป็นอีกกลุ่มหนึ่งที่สามารถช่วยป้องกันการสูญพันธุ์ของลิงวอกไทยได้ โดยการนำลิงเหล่านี้กลับไปสู่แหล่งธรรมชาติที่มันสามารถจะสืบพันธุ์และออกลูกหลานต่อไปได้ แต่การปล่อยลิงตระกูลนี้เข้าป่าควรเป็นหน้าที่ของเจ้าหน้าที่มากกว่า เพราะต้องทำการศึกษาก่อนว่าในบริเวณนั้นมีลิงเจ้าถิ่นชนิดเดียวกับลิงที่จะนำไปปล่อยหรือไม่ หากเป็นลิงตัวผู้ก็ควรทำหมันก่อนจะนำไปปล่อยเพื่อป้องกันการผสมข้ามสายพันธุ์

"ปัญหาที่เกิดขึ้นเหล่านี้ล้วนเป็นผลสะท้อนที่เกิดจากการกระทำของมนุษย์แทบทั้งสิ้น ทั้งการที่จับลิงออกจากป่า การรุกล้ำทำลายพื้นที่อยู่อาศัยของลิงวอก ทำให้ที่อยู่อาศัยของลิงถูกจำกัดไม่เชื่อมต่อ ลิงตัวเมียไม่สามารถออกไปตั้งฝูงใหม่ จึงเท่ากับเป็นการบีบให้ลิงต่างชนิดต้องมาอาศัยอยู่ร่วมกัน กระทั่งลิงเหล่านี้เกิดการผสมพันธุ์ภายในกลุ่ม หรือการผสมข้ามสายพันธุ์ซึ่งต่างก็มีผลต่อการคงอยู่ของลิงเหล่านี้ ไม่แน่ว่าในอนาคตอาจจะไม่มีลิงเจ้าของปีนักษัตรให้ได้ชื่นชมกันอีกต่อไป"...!!! รศ.ดร.สุจินดา กล่าวทิ้งท้าย

SCOOP_NAEWNA@LYCOS.COM

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

National Research Council of Thailand

จุฬาฯ วิจัยอนุรักษ์ลิงวอกฝูงสุดท้ายในไทย

วันจันทร์ ที่ 08 กันยายน 2546 - 00:09 น.

Topic ข่าวในวงการวิจัย

อาจารย์จุฬาฯ ศึกษาอนุรักษ์ "ลิงวอก" ฝูงสุดท้ายที่เหลืออยู่ในประเทศ พบลักษณะทางพันธุกรรมเปลี่ยนแปลงไปกลายเป็นลิงลูกผสมข้ามพันธุ์ ส่วนหนึ่งเกิดจากฝีมือของมนุษย์ที่รู้เท่าไม่ถึงการณ์

รศ.สุจินดา มาลัยวิจิตรนนท์ ภาควิชาชีววิทยาคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทำศึกษาวิจัยเรื่อง "การผสมข้ามพันธุ์และความแตกต่างแปรผันทางพันธุกรรมของลิงวอก ณ วัดถ้ำผาหมากฮ่อ อำเภอวังสะพุง จังหวัดเลย เปิดเผยว่า "ลิงวอก" (Rhesus Macaques) เป็นหนึ่งในลิง ๕ ชนิดในสกุล Macaca ที่พบในประเทศไทย นอกเหนือจากลิงแสม ซึ่งพบมากที่สุด ลิงกัง ลิงอ้ายเงี๊ยะ ลิงเสน ในอดีตมีการพบลิงชนิดนี้บริเวณตอนบนของประเทศไทยที่จังหวัดตาก เชียงใหม่ หนองคาย และเลย จากการศึกษาสำรวจร่วมกันระหว่างหน่วยวิจัย Primate ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาฯ และ Rrimate Research Institute มหาวิทยาลัยเกียวโต ประเทศญี่ปุ่นพบว่า นับตั้งแต่ ๑๕ ปีที่ผ่านมา ไม่มีการค้นพบลิงชนิดนี้ตามธรรมชาติในประเทศไทย จนกระทั่งในปี ๒๕๔๑ ได้พบลิงวอกฝูงหนึ่งซึ่งมีความแตกต่างจากลิงที่พบโดยทั่วไปที่วัดถ้ำผาหมากฮ่อ อำเภอวังสะพุง จังหวัดเลย และได้ทำการศึกษาจนพบว่าลิงเหล่านี้เริ่มก่อตั้งฝูงตั้งแต่ ๒๐ ปีที่แล้ว จากลิงเพียงแค่ ๘ ตัว และได้ผสมพันธุ์กันเอง จนปัจจุบันมีลิงทั้งสิ้น ๑๔๒ ตัว รวมทั้งได้มีชาวบ้านที่รู้เท่าไม่ถึงการณ์นำลิงกังเพศผู้มาปล่อยเข้าสู่ลิงฝูงนี้จนกลายเป็นลิงจ่าฝูงเข้าผสมพันธุ์กับลิงเพศเมีย จึงเป็นการจุดประเด็นความสนใจให้ทำการศึกษาวิจัยลักษณะทางพันธุกรรมของลิงฝูงนี้ ซึ่งคาดว่าจะเป็นลิงวอกฝูงสุดท้ายที่พบในประเทศไทย เนื่องจากไม่เคยสำรวจพบลิงชนิดนี้อีกเลยในประเทศ

รศ.สุจินดา เปิดเผยว่า วิธีการศึกษาวิจัยแบ่งออกเป็นการศึกษาในภาคสนามและห้องปฏิบัติการ โดยศึกษาถึงโครงสร้างทางสังคมของลิงวอกซึ่งเป็นสัตว์สังคม มีการแบ่งชั้นวรรณะ เป็นลิงจ่าฝูง รองจ่าฝูง และลูกน้อง รวมถึงพฤติกรรมการกินอาหาร การผสมพันธุ์ ฯลฯ จากนั้นจึงมีการวางกรงดักจับลิงขนาด ๖ X ๖ เมตร หรือ ๖ X ๑๒ เมตร ช่วงเวลาที่ดักจับลิงจะเป็นช่วงฤดูแล้ง ลิงที่จับมาได้จะถูกนำไปฉีดยาสลบเจาะเลือดเพื่อสกัด DNA ตรวจพยาธิในเลือด วัดขนาดร่างกาย สีขน พิมพ์ลายนิ้วมือ ตรวจอุจจาระ ฯลฯ จนถึงขณะนี้ได้ข้อมูลจากการศึกษาเบื้องต้นพบว่าลิงพยายามจะแยกฝูงออกไปแต่ไม่สามารถทำได้ เนื่องจากพื้นที่อยู่อาศัยเป็นเนินเขาที่ถูกล้อมรอบด้วยพื้นที่เกษตรกรรม นอกจากนี้ ลูกลิงที่เกิดจากการผสมพันธุ์ระหว่างลิงกังเพศผู้กับลิงวอกเพศเมีย มีจำนวนทั้งสิ้น ๓ ตัว ซึ่งมีลักษณะไม่เป็นหมัน และเกรงว่าอาจจะไปผสมพันธุ์กับลิงตัวอื่น ๆ ในฝูงต่อไปส่งผลให้ลักษณะทางพันธุกรรมของลิงวอกที่แท้จริงเปลี่ยนแปลงไปได้

"หวังว่าผลการศึกษาวิจัยเรื่องนี้จะสร้างความแตกตื่นตัวแก่นักวิจัยไทย ให้สนใจศึกษาวิจัยเกี่ยวกับลิงมากยิ่งขึ้น เนื่องจากปัจจุบันในบ้านเรามีนักวิจัยที่ศึกษาเรื่องนี้น้อยมากในโครงการวิจัยนี้จึงต้องอาศัยความร่วมมือจากนักวิจัยชาวญี่ปุ่นและอินโดนีเซีย ลิงเป็นสัตว์ที่มีลักษณะใกล้เคียงกับมนุษย์ การเปลี่ยนแปลงทางสภาพแวดล้อมที่เกิดขึ้นและมีผลกับลิงย่อมหมายความว่าสามารถมีผลกับคนเราได้เช่นกัน ในการอนุรักษ์ลิงวอกซึ่งมีเหลืออยู่น้อยเต็มทีจนใกล้จะสูญพันธุ์นั้น ส่วนสำคัญเกิดจากการที่มนุษย์เข้าไปทำลายพื้นที่อยู่อาศัยและหาอาหารของลิง สวนการนำลิงคนละชนิดเข้าไปปล่อยในฝูงก็จะทำให้เกิดสูญเสียลักษระทางพันธุกรรมของลิงมีชีวิตนั้นไป" รศ.สุจินดา กล่าว

ที่มา : สำนักข่าวไทย

บทความนี้มาจาก NRCT
http://www.nrct.net/

ชื่อ URL ของเรื่องนี้อยู่ที่:
http://www.nrct.net/modules.php?op=modload&name=News&file=article&sid=661