



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์ชีวภาพป่าไม้)

ปริญญา

วิทยาศาสตร์ชีวภาพป่าไม้

ชีววิทยาป่าไม้

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง ความหลากหลายทางพันธุกรรมของช้างป่า (*Elephas maximus* Linnaeus, 1758)

ในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูวัว จังหวัดหนองคาย

Genetic Diversity of Wild Asian Elephant (*Elephas maximus* Linnaeus, 1758)
in Phu Wua Wildlife Sanctuary, Nong Khai Province

นามผู้วิจัย นางสาวสุนันทา ทองไชย

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์รองลาภ สุขมาสรวง, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(อาจารย์สิทธิวิทย์ ทองทิพย์ศิริเดช, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์วิจักขณ์ นิยม, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา ธีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของช้างป่า (*Elephas maximus* Linnaeus, 1758)
ในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูวัว จังหวัดหนองคาย

Genetic Diversity of Wild Asian Elephant (*Elephas maximus* Linnaeus, 1758)
in Phu Wua Wildlife Sanctuary, Nong Khai Province

โดย

นางสาวสุนันทา ทองไชย

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตรชีวภาพป่าไม้)

พ.ศ. 2555

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สุนันทา ทองไชย 2555: ความหลากหลายทางพันธุกรรมของช้างป่า (*Elephas maximus* Linnaeus, 1758) ในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูวัว จังหวัดหนองคาย ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์ชีวภาพป่าไม้) สาขาวิทยาศาสตร์ชีวภาพป่าไม้ ภาควิชาชีววิทยาป่าไม้ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผู้ช่วยศาสตราจารย์รองลาภ สุขมาศรวง, Ph.D. 75 หน้า

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของช้างป่า ดำเนินการที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูวัว จังหวัดหนองคาย เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าดงใหญ่ จังหวัดบุรีรัมย์ เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูหลวง จังหวัดเลย และเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูเขียว จังหวัดชัยภูมิ ระหว่างเดือนกันยายน 2552 ถึงเดือนสิงหาคม 2553 เพื่อให้ทราบถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของช้างป่า ตลอดจนเพื่อศึกษาเปรียบเทียบความหลากหลาย และความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของประชากรกับพื้นที่แห่งอื่น ด้วยวิธีการเก็บตัวอย่างมูลช้าง แล้วใช้เทคนิค PCR และการหาลำดับเบสในส่วน Cytochrome b จนถึงส่วนต้นของ control region ภายในไมโทคอนเดรียคลีเอ็นเอ นำมาจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรม (haplotype) ผลการศึกษาจากการเก็บตัวอย่างมูลจากเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูวัว เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูเขียว เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูหลวง และเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าดงใหญ่ จำนวน 39, 57, 10 และ 8 ตัวอย่างตามลำดับ รวม 114 ตัวอย่าง พบว่าหากวิเคราะห์ในส่วนของ Cytochrome b พบความแตกต่างของลำดับเบส 9 ตำแหน่ง บนความยาว 250 bp สามารถจำแนกความหลากหลายทางพันธุกรรมของช้างป่าในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูวัว ได้ 2 haplotypes (HapA และ HapB) เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูเขียว จำแนกได้ 2 haplotypes (HapA และ HapC) เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูหลวง จำแนกได้ 2 haplotypes (HapA และ HapB) และเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าดงใหญ่ จำแนกได้ HapA เพียง haplotype เดียว ส่วนผลจากการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมจากลำดับเบสตั้งแต่ส่วนปลาย Cytochrome b ถึงส่วนต้นของ control region พบความแตกต่างของลำดับเบส 27 ตำแหน่ง บนความยาว 601 bp สามารถจำแนกความหลากหลายทางพันธุกรรมของช้างป่า ในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูวัว ได้ 3 haplotypes (HapAH HapBQ และ HapNewB) เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูเขียว จำแนกได้ 3 haplotypes (HapAH HapNewA1 และ HapBH) เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูหลวง จำแนกได้ 3 haplotypes (HapAH HapAB และ HapBO) และเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าดงใหญ่ จำแนกได้ 2 haplotypes (HapAH และ HapAD) รวมความหลากหลายทางพันธุกรรมของช้างป่าจากการศึกษาจำนวน 8 haplotypes สามารถแบ่งกลุ่มประชากรช้างป่าออกเป็น 2 กลุ่มคือ Clade A และ Clade B โดยในภาคตะวันออกเฉียงเหนือพบ Clade A มากกว่า Clade B พบว่า ช้างในกลุ่ม HapAB HapAD HapAH และ HapNewA1 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมากกว่าช้างในกลุ่มอื่นๆ ส่วนช้าง ในกลุ่ม HapNewB มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับช้างในกลุ่ม HapBO โดยพบว่า HapAD เป็นบรรพบุรุษของ haplotypes อื่น

ลายมือชื่อนิพนธ์

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ รุ่งลาภ สุขมาสรวง ประธานกรรมการ
ที่ปรึกษา และ อ.น.สพ.ดร. สิทธิวีร์ ทองทิพย์ศิริเดช กรรมการที่ปรึกษาร่วม ที่กรุณาให้คำปรึกษา
แนะนำ ในด้านการเรียน การค้นคว้าวิจัย การตรวจและการแก้ไขข้อบกพร่องในการเขียน
วิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสำเร็จลุล่วง

ขอขอบพระคุณ กรมอุทยานแห่งชาติสัตว์ป่าและพันธุ์พืช ที่อนุเคราะห์และเอื้อเฟื้อตัวอย่าง
ในการศึกษาครั้งนี้ รวมทั้งเจ้าหน้าที่ทุกท่าน และขอกราบขอบพระคุณ
รองศาสตราจารย์ ดร. วรวิทย์ วัชชวัลคุ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขต
กำแพงแสนที่เอื้อเฟื้อสถานที่สำหรับการทำงานในห้องปฏิบัติการ

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อมานิต ทองไชย คุณแม่วาสนา ทองไชย พี่สาว และญาติพี่น้อง
ที่คอยสนับสนุนและเป็นกำลังใจให้เสมอมา และขอบคุณ คุณสุรชาติพิทย์ เดชชัยศรี ที่ช่วยเหลือ
ช่วยสอนในทุกเรื่อง และพี่ๆ ในห้องปฏิบัติการที่ให้คำแนะนำต่างๆ

สุนันทา ทองไชย

พฤษภาคม 2554

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(5)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	26
อุปกรณ์	26
วิธีการ	27
ผลและวิจารณ์	34
สรุปและข้อเสนอแนะ	51
สรุป	51
ข้อเสนอแนะ	52
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	53
ภาคผนวก	62
ภาคผนวก ก สารเคมี	63
ภาคผนวก ข สัญลักษณ์ที่ใช้แทนลำดับเบสและกรดอะมิโน	65
ภาคผนวก ค โปรแกรมที่ใช้ในการศึกษา	67
ภาคผนวก ง ข้อมูลตัวอย่างมุลข้าง	71
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	75

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	จำนวนประชากรช้างในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ในปี พ.ศ.2543	6
2	แสดงยีนและโปรตีน 13 ชนิดของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ	15
3	ส่วนผสมของ PCR reaction mixture สำหรับ primer คู่ที่ 1 CB0fw-CB2re ที่จัดเตรียมในการศึกษา	29
4	ส่วนผสมของ PCR reaction mixture สำหรับ primer คู่ที่ 2 MDL5fw-MDL3re ที่จัดเตรียมในการศึกษา	30
5	แสดง Primers 2 คู่ที่ใช้ในการทำ PCR และช่วงอุณหภูมิการจับตัวที่เหมาะสม (Ta)	30
6	แสดงตำแหน่งที่มีความแตกต่างกันของลำดับเบสของตัวอย่างมูลช้างทั้ง 4 พื้นที่บริเวณ Cytochrome b (250 bp) โดยตัวเลขตำแหน่งด้านบนใช้เทียบกับลำดับเบสของช้างเอเชียที่รายงานใน GenBank (accession number NC_005129) ซึ่ง (.) หมายถึงลำดับเบสที่เหมือนกับเบสด้านบน	35
7	แสดงตำแหน่งที่มีความแตกต่างกันของลำดับเบสของตัวอย่างมูลช้างทั้ง 4 พื้นที่ บริเวณ ส่วนปลาย cytochrome b ถึงส่วนต้นของ control region (601 bp) โดยตัวเลขตำแหน่งด้านบนจะเทียบกับลำดับเบสของช้างเอเชียรายงานใน GenBank (accession number NC_005129) ซึ่ง (.) หมายถึงลำดับเบสที่เหมือนกับเบสด้านบน	37
8	แสดง Haplotypes และจำนวนตัวอย่างที่พบในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูวัว เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าสัตว์ป่าภูเขียว เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูหลวง และเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าดงใหญ่	41
9	แสดงค่าความถี่ของ Haplotype และค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของตัวอย่างมูลของช้างป่าในพื้นที่ศึกษา	43

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
10	Sequence identity matrix วิเคราะห์ส่วนปลาย cytochrome b ถึงส่วนต้นของ control region (601 bp) ของ Haplotypes ที่พบใน เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูวี่ เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าสัตว์ป่าภูเขียว เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูหลวง และเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าดงใหญ่	46
11	แสดงตำแหน่งที่มีความแตกต่างกันของลำดับเบสของตัวอย่างมูลช้างทั้ง 4 พื้นที่ บริเวณ ส่วนปลาย cytochrome b ถึงส่วนต้นของ control region (601 bp) และ บริเวณ cytochrome b (250 bp) โดยตัวเลขตำแหน่งด้านบนจะเทียบ กับลำดับเบสของ ช้างเอเชียที่รายงานใน GenBank (accession number NC_005129) ซึ่ง (.) หมายถึง ลำดับเบสที่เหมือนกับเบสด้านบน	47
ตารางผนวกที่		
ก1	แสดงส่วนประกอบสารเคมีที่ใช้ในการศึกษา	64
ข1	แสดงสัญลักษณ์ที่ใช้แทนลำดับเบส	66
ง1	ข้อมูลตัวอย่างมูลช้างเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูวี่	72
ง2	ข้อมูลตัวอย่างมูลช้างเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูหลวง	74
ง3	ข้อมูลตัวอย่างมูลช้างเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าดงใหญ่	74

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอแสดงตำแหน่งของยีน	16
2	การทำ PCR เพื่อเพิ่มปริมาณ DNA ภายนอกเซลล์ โดยภาพซ้ายเป็นการเพิ่มปริมาณ DNA รอบที่ 1 และภาพขวาเป็นการเพิ่มปริมาณ DNA รอบที่ 2	18
3	แสดงตำแหน่งที่ต้องการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (สีแดง)	31
4	แสดง PCR product จากการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอด้วยวิธีการ PCR	34
5	แสดง PCR product จากการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอด้วยวิธีการ PCR	36
6	Phylogenetic tree ของลำดับเบสส่วนปลาย cytochrome b ถึงส่วนต้น ของ control region (601 bp) โดยใช้วิธี Neighbor-joining (NJ)	45
7	เครือข่ายของกลุ่ม (haplotypes) ตัวอย่างมูลช้าง 4 พื้นที่ ในส่วนปลาย cytochrome b ถึงส่วนต้นของ control region	48
8	การแบ่งกลุ่ม Clade ของตัวอย่างมูลช้าง 4 พื้นที่ โดย สีเหลือง สีครีม สีส้ม คือ CladeA สีน้ำเงิน สีฟ้า คือ CladeB	50
ภาพผนวกที่		
ก1	โปรแกรมสำหรับถ่ายรูปแบบไฟล์ AlphaDigiDoc RT	68
ก2	โปรแกรมสำหรับวิเคราะห์ลำดับเบส BioEdit Sequence Alignment Editor	68
ก3	โปรแกรมสำหรับสร้างแผนภูมิต้นไม้พันธุกรรม (phylogenetic tree) MEGA version 4.1	69
ก4	โปรแกรมสำหรับสร้างเครือข่ายพันธุกรรม (network) TCS version 1.21	70

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

CR	=	control region
Cyt b	=	Cytochrome b
D-loop	=	displacement loop
DNA	=	deoxyribonucleic acid
Hap	=	Haplotype
mtDNA	=	mitochondrial deoxyribonucleic acid
mRNA	=	messenger ribonucleic acid
PCR	=	polymerase chain reaction
rRNA	=	ribosomal ribonucleic acid
tRNA	=	transfer ribonucleic acid

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของช้างป่า (*Elephas maximus* Linnaeus, 1758)
ในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูวัว จังหวัดหนองคาย

Genetic Diversity of Wild Asian Elephant (*Elephas maximus* Linnaeus, 1758)
in Phu Wua Wildlife Sanctuary, Nong Khai Province

คำนำ

ในอดีตช้างเป็นสัตว์ป่าที่มีอยู่จำนวนมาก ในทุกแห่งการแพร่กระจาย แต่การพัฒนาความเจริญก้าวหน้าของมนุษย์มาตามลำดับ ทั้งการสร้างที่อยู่อาศัย พื้นที่เพื่อการเกษตรกรรม ถนนหนทาง ทำให้พื้นที่อาศัยของช้างตามธรรมชาติลดลง (Taylor, 2008) ถูกตัดขาดออกจากกันเป็นหย่อมเล็กหย่อมน้อย และเสื่อมสภาพ ช้างเป็นสัตว์บกที่มีขนาดใหญ่ที่สุดต้องการพื้นที่อาศัยมาก จึงเป็นสัตว์ที่ได้รับผลกระทบจากกิจกรรมของมนุษย์มากเช่นกัน จนปัจจุบันประชากรมีจำนวนลดลงในทุกแห่งการแพร่กระจาย (Leimgruber *et al.*, 2003) ในประเทศไทยเคยมีชื่อว่ามิประชากรช้างอยู่นับล้านตัวในบางพื้นที่ แต่ปัจจุบันมีช้างป่าอาศัยในธรรมชาติของประเทศไทยรวมทั้งประเทศเพียงประมาณ 1,500 ตัวเท่านั้น (กฤษฎา, 2545) และสำนักนโยบายและแผนทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม (2008) ได้จัดช้างป่าเป็นสัตว์ที่มีสถานภาพใกล้สูญพันธุ์ (Endangered species) นับตั้งแต่ปี พ.ศ. 2528 เป็นต้นมา ปัจจุบัน IUCN (2009) ได้จัดช้างป่าเป็นสัตว์ที่มีสถานภาพใกล้สูญพันธุ์เช่นกันและทั้งนี้ช้างป่ายังถูกจัดอยู่ในบัญชีที่ 1 (appendix I) ของอนุสัญญาไซเตส (CITES) ด้วย

ช้างป่าในประเทศไทยปัจจุบันอาศัยอยู่ตามผืนป่าอนุรักษ์ต่างๆที่กระจายอยู่ทุกภูมิภาคทั่วประเทศ มีประชากรในแต่ละพื้นที่ระหว่าง 5 – 300 ตัว (กองทุนสัตว์ป่าโลก, 2543) อีกทั้งประชากรที่หลงเหลืออยู่มีลักษณะกระจาย ถูกแยกขาดออกจากกันตามลักษณะของผืนป่าที่ถูกแบ่งตัดขาดออกจากกันเป็นผืนเล็กผืนน้อย การแลกเปลี่ยนพันธุกรรมจึงเกิดขึ้นได้ยาก การผสมในเลือดใกล้ชิดของช้างจึงมีโอกาสเกิดขึ้นสูงทำให้ลักษณะประชากรค่อยลงเรื่อยๆ

ในกรณีของช้างเลี้ยง นิกอร์ และคณะ (2544) รายงานว่าช้างเลี้ยงช้างเพศผู้ 1 เชือก ถูกใช้ในการผสมกับเพศเมียหลายเชือกเนื่องจากการลดลงของช้างพ่อพันธุ์ที่มีลักษณะสวยงาม และคำนิยม

ในการให้ช้างเพศเมียผสมพันธุ์กับช้างพ่อพันธุ์ที่มีประวัติให้ลูก ทำให้มีการผสมเลือดชิด (inbreeding) สูงขึ้น ดังนั้นปัญหาที่ช้างป่าประสบอยู่นอกเหนือจากการลดจำนวนลงของประชากรแล้ว ปัญหาที่สำคัญอีกประการหนึ่งคือการสูญเสียความหลากหลายทางพันธุกรรมของช้างป่า ด้วยข้อจำกัดทางพื้นที่ไม่เอื้อต่อการแลกเปลี่ยนพันธุกรรมระหว่างประชากร ดังนั้นการศึกษาเพื่อให้ทราบถึงลักษณะทางพันธุกรรม ทั้งในด้านความหลากหลายทางพันธุกรรม และความสัมพันธ์กับกลุ่มประชากรอื่นจึงมีความสำคัญ นอกเหนือไปจากการศึกษาโครงสร้าง จำนวนของประชากร และถิ่นที่อาศัย ทั้งนี้เพื่อเป็นพื้นฐานสำหรับการจัดการช้างป่าในพื้นที่อนุรักษ์ของประเทศไทยต่อไป

การศึกษาพันธุกรรมของช้างป่าปัจจุบัน มีผู้ดำเนินการในพื้นที่อนุรักษ์ส่วนต่างๆ ของประเทศ เช่น อุทยานแห่งชาติแก่งกระจาน และเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูเขียว (สุชาติพิทย และคณะ, 2552) แต่อย่างไรก็ตามความหลากหลายทางพันธุกรรมของช้างป่าในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูวัว จังหวัดหนองคาย ยังไม่เคยมีการศึกษามาก่อนอีกทั้งในอดีตประชากรช้างป่าในพื้นที่นี้มีการเดินทางไปมาระหว่างประเทศไทยและประเทศสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว แต่ปัจจุบันถูกตัดขาดออกจากกลุ่มประชากรอื่นอย่างสิ้นเชิง โดยยังคงมีประชากรอยู่ประมาณ 30-50 ตัว เท่านั้น (แผนแม่บทการอนุรักษ์ช้างแห่งชาติ ปี 2546-2555, ม.ป.ป.) ผลที่ได้จากการศึกษานี้สามารถเป็นข้อมูลพื้นฐานทางพันธุกรรม สำหรับใช้ในการวางแผนการจัดการประชากรช้างไทยทั้งในพื้นที่นี้ และพื้นที่แห่งอื่นของประเทศไทย ตลอดจนประชากรช้างป่าในแหล่งการแพร่กระจายอื่นๆ ต่อไปในอนาคต

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของช้างป่า ในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูวัว จังหวัดหนองคาย
2. เพื่อให้ทราบถึงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของช้างป่าที่ปรากฏทั้งในพื้นที่นี้ และพื้นที่แห่งอื่นทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย

สมมติฐานการศึกษา

1. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของช้างป่า ในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูวัว มีความแตกต่างจากพื้นที่อนุรักษ์แห่งอื่นของประเทศ เนื่องจากในอดีตมีการแลกเปลี่ยนพันธุกรรมระหว่างประเทศไทยกับประเทศสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว
2. ลักษณะทางพันธุกรรมของช้างป่าในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูวัว มีความสัมพันธ์กับพื้นที่อนุรักษ์แห่งอื่นในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย

การตรวจเอกสาร

1. ช้าง (*Elephant*)

ช้างเป็นสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่มีขนาดใหญ่ มีวิวัฒนาการเมื่อประมาณ 50-60 ล้านปี มีบรรพบุรุษหน้าตาคล้ายหมู วิวัฒนาการเป็นช้างโบราณหลายร้อยชนิด กระจายตัวไปแทบทุกทวีปทั่วโลก ยกเว้นแอนตาร์กติกาและออสเตรเลีย แต่ช้างโบราณเหล่านี้ได้สูญพันธุ์ไปจากโลกนานมาแล้ว ปัจจุบันคงเหลือเพียงช้างเอเชียและช้างแอฟริกา (ปรามินทร์, 2546; สุวัฒน์, 2550; ศรีณย์, 2550)

อนุกรมวิธาน

การจัดหมวดหมู่อนุกรมวิธานของช้าง ตาม Lekagul and McNeely (1988) จาก Kingdom ดังนี้

Kingdom Animalia

Phylum Chordata

Subphylum Vertebrata

Class Mammalia

Order Proboscidea

Family Elephantidae

Genus *Elephas*

Species *Elephas maximus* Linnaeus, 1758

ช้างเอเชียมีวิวัฒนาการมาจาก *Primelephas* ซึ่งเป็นช้างในแอฟริกา (Spinage, 1997) ปัจจุบันช้างเอเชียมีอยู่ 3 ชนิดย่อย คือ

1. ชนิดย่อยศรีลังกา (*Elephas maximus maximus*) เป็นช้างที่มีอยู่ในป่าธรรมชาติเฉพาะในเกาะซีลอนหรือเกาะลังกา หรือประเทศศรีลังกาในปัจจุบัน เป็นช้างเอเชียที่มีขนาดใหญ่ที่สุดและมีสีของผิวหนังเข้มที่สุด

2. ชนิดย่อยอินเดีย (*Elephas maximus indicus*) เป็นช้างที่มีอยู่ในป่าธรรมชาติ บนผืนแผ่นดินใหญ่ของทวีปเอเชีย ได้แก่ เนปาล ภูฐาน อินเดีย พม่า ไทย ลาว เวียดนาม กัมพูชา แคว้นยูนนานในประเทศจีน และมาเลเซีย ในประเทศไทยนั้นมีช้างเอเชียชนิดพันธุ์ย่อยอินเดีย กระจายอยู่ตามธรรมชาติทั่วทุกภาคของประเทศ ช้างชนิดนี้มีขนาดตัวเล็กกว่าและสีตามจุดต่างๆ จางกว่าชนิดพันธุ์ย่อยศรีลังกา

3. ชนิดย่อยสุมาตรา (*Elephas maximus sumatranus*) พบเฉพาะบนเกาะสุมาตรา ประเทศอินโดนีเซีย เป็นชนิดพันธุ์ที่มีขนาดตัวเล็กที่สุด และสีผิวหนังจางมากที่สุด (รองลาก, 2536; กฤษณา, 2545; Fernando *et al.*, 2003)

ทั้งนี้ Fernando *et al.* (2003) ได้ศึกษาในระดับชนิดย่อย (subspecies) ของช้างเอเชีย โดยทำการเปรียบเทียบดีเอ็นเอของช้างบอร์เนียวกับช้างเอเชียจาก 10 ประเทศ จำนวน 337 ตัวอย่าง ได้แก่ ศรีลังกา (n=81) อินเดีย (n=81) ภูฐาน (n=13) บังกลาเทศ (n=30) ไทย (n=8) ลาว (n=20) เวียดนาม (n=5) กัมพูชา (n=30) มาเลเซีย (n=9) อินโดนีเซีย (n=40) และมาเลเซีย บนเกาะบอร์เนียว (n=20) ศึกษาในส่วนของ d-loop และ microsatellite พบว่าช้างที่บอร์เนียว ประเทศมาเลเซีย น่าจะเป็นชนิดย่อยที่ 4 ของช้างเอเชีย คือ *Elephas maximus borneensis*

ช้างแอฟริกา (African elephant) มีการกระจายตัวในทวีปแอฟริกาตอนใต้ของทะเลทรายซาฮารา เช่น เคนยา แทนซาเนีย อูกันดา แอฟริกาใต้ เป็นต้น ถิ่นที่อยู่อาศัยส่วนใหญ่เป็นทะเลทราย ช้างจึงมีความทนทานต่ออากาศร้อนและแห้งแล้งได้ดี และชอบออกหากินทั้งเวลากลางวันและกลางคืน มี 2 ชนิดพันธุ์ย่อย คือ

1. ชนิดพันธุ์ย่อยช้างทุ่งแอฟริกา (Savannah elephant, *Loxodonta africana africana*) เป็นช้างทุ่งขนาดใหญ่ สูงกว่า 3 เมตร ขึ้นไป มีถิ่นที่อยู่อาศัยในทุ่งหญ้าและทะเลทรายทางทิศตะวันออกและทิศใต้ของทวีปแอฟริกา (อารีย์, 2538; Roca *et al.*, 2001, 2005)

2. ชนิดพันธุ์ย่อยช้างป่าแอฟริกา (Forest elephant, *Loxodonta africana cyclotis*) เป็นช้างป่าขนาดเล็ก มีความสูงราว 2 เมตร อาศัยอยู่ในป่าทางทิศตะวันตกของทวีปแอฟริกา (อารีย์, 2538; Roca *et al.*, 2001, 2005)

การแพร่กระจาย

ช้างเอเชีย (Asiatic elephant) หรือที่เรียกว่าช้างอินเดีย (Indian elephant) มีแหล่งการแพร่กระจายปัจจุบันตั้งแต่ประเทศแถบทวีปเอเชียตอนใต้ เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และหมู่เกาะที่อยู่ใกล้เคียง เช่น อินเดีย เนปาล พม่า ไทย หมู่เกาะนิโคบาร์ เกาะสุมาตรา เป็นต้น ช้างป่าชอบอาศัยอยู่ในป่าดงดิบ ที่มีอากาศร่มเย็น ไม่ชอบอากาศร้อนจัด (อุมพร, 2550) โดยมีจำนวนประชากรช้างเอเชียทั้งหมดทุกแหล่งการแพร่กระจาย ระหว่าง 41,430 ถึง 52,250 ตัว อาศัยอยู่ในพื้นที่คุ้มครองซึ่งมีเนื้อที่รวมกันทั้งหมด 486,800 ตารางกิโลเมตร (Sukumar, 2003)

ประเทศไทยเป็นศูนย์กลางของประเทศในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ซึ่งแวดล้อมด้วยประเทศต่างๆ ที่มีประชากรช้างอันประกอบไปด้วย พม่า ลาว กัมพูชา และมาเลเซีย ซึ่งเป็นแหล่งพันธุกรรมสำคัญของช้างเอเชีย โดยทั้ง 5 ประเทศในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้มี ประชากรช้างรวมกันประมาณ 22,017 ตัว เป็นช้างป่าประมาณ 11,117 ตัว และช้างเลี้ยงอีกประมาณ 10,900 เชือก ดังรายละเอียดตามตารางที่ 1 เมื่อนำประชากรช้างป่าและช้างเลี้ยงของประเทศไทยมารวมกันจะได้ประชากรช้างคิดเป็นร้อยละ 25 ของประชากรช้างทั้งหมดของประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และเมื่อพิจารณาเฉพาะช้างป่าพบว่า พบว่าคิดเป็นร้อยละ 21 ของประชากรช้างป่าทั้งหมดในภูมิภาคนี้ (กองทุนสัตว์ป่าโลก, 2543)

ตารางที่ 1 จำนวนประชากรช้างในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ในปี พ.ศ.2543

ประเทศ	จำนวนช้างเลี้ยง (เชือก)	จำนวนช้างป่า (ตัว)
ไทย	2,705	2,384
พม่า	6,000 – 7,000 (6,500)	4,000 – 6,000 (5,000)
ลาว	1,100 – 1,350 (1,225)	983
กัมพูชา	300 – 600 (450)	500 – 1,000 (750)
มาเลเซีย	20	1,700 – 2,300 (2,000)
รวม	10,900	11,117

หมายเหตุ ในวงเล็บเป็นค่าเฉลี่ย

ที่มา: กองทุนสัตว์ป่าโลก สำนักงานประเทศไทย (2543)

กองทุนสัตว์ป่าโลก (2543) รายงานจำนวนช้างป่าในประเทศไทยว่ามีอยู่รวม 2,384 ตัว กระจายอยู่ในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าจำนวน 28 แห่ง รวม 1,276 ตัว ในอุทยานแห่งชาติ จำนวน 35 แห่ง รวม 1,083 ตัว เขตห้ามล่าสัตว์ป่า จำนวน 1 แห่ง มีประชากร 20 ตัว และในเขตป่าเตรียมที่จะประกาศเป็นเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่า 1 แห่ง จำนวน 5 ตัว พื้นที่ที่มีจำนวนช้างป่ามากที่สุดในบริเวณป่าอนุรักษ์ทางภาคตะวันตกของประเทศ ส่วนพื้นที่ที่ถูกระบุว่ามีจำนวนช้างป่าน้อยที่สุดเพียง 2 ตัว คือ เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าคอยผาช้าง จังหวัดน่าน และอุทยานแห่งชาติเขาแหลม จังหวัดกาญจนบุรี

สำนักอนุรักษ์สัตว์ป่า (ม.ป.ป) รายงานว่ามีกลุ่มป่าของประเทศไทยที่มีความสำคัญต่อการอนุรักษ์ช้างป่า ได้แก่

1. กลุ่มป่าทางภาคเหนือตอนบนและตอนล่าง ประกอบด้วยพื้นที่อนุรักษ์ 9 แห่ง รวมพื้นที่ 9,153 กม² มีจำนวนช้างป่า ประมาณ 300 ตัว
2. กลุ่มป่าตะวันตก ทั้งตอนบน และตอนล่าง มีจำนวนพื้นที่อนุรักษ์ 14 แห่ง รวมพื้นที่ 21,693 กม² มีจำนวนช้างป่า ประมาณ 1,400 – 1,600 ตัว
3. กลุ่มป่าภาคตะวันออกเฉียงเหนือ มีจำนวนพื้นที่อนุรักษ์ 13 แห่ง รวมพื้นที่ 6,181 กม² มีจำนวนช้างป่า ประมาณ 300 - 400 ตัว
4. กลุ่มป่ารอยต่อ 5 จังหวัด หรือกลุ่มป่าภาคตะวันออก มีจำนวนพื้นที่อนุรักษ์ 6 แห่ง รวมพื้นที่ 2,355 กม² มีจำนวนช้างป่า ประมาณ 300 - 400 ตัว
5. กลุ่มป่าภาคใต้มีจำนวนพื้นที่อนุรักษ์ 22 แห่ง รวมพื้นที่ 9,375 กม² มีจำนวนช้างป่า ประมาณ 200 - 350 ตัว

ชีววิทยาบางประการ

ช้างเป็นสัตว์บกที่มีขนาดใหญ่ที่สุด เป็นสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม แข็งแรง มีกำลังมาก อาศัยอยู่รวมกันเป็นฝูง กินพืชเป็นอาหาร (สุทธิลักษณ์, 2537)

ซ้างป่าตัวโตเต็มวัยมีความสูงจากพื้นถึงไหล่เฉลี่ยประมาณ 200–270 เซนติเมตร น้ำหนักตัวประมาณ 3,500-4,000 กิโลกรัม มีจุดสูงสุดอยู่ที่กลางหลัง หัวกว้างมี 2 ลอน มีใบหูเล็ก โดยขอบใบหูสูงไม่เกินระดับหัว จะงอยที่ปลายวงมี 1 จะงอย มีเงาเฉพาะเพศผู้เรียก ซ้างพลาย ซ้างเพศผู้ที่มีไม่ มีเงาเรียกว่า ซ้างสีคอ ส่วนซ้างเพศเมียอาจมีเงาเล็กๆ หรือขนาย เรียก ซ้างพัง มีความยาววงเฉลี่ย 1.2-1.6 เมตร หางยาวประมาณ 100 - 150 เซนติเมตร เล็บเท้าหน้า 5 เล็บ เท้าหลัง 4 หรือ 5 เล็บ อาศัยอยู่รวมกันเป็นฝูง มีจำนวนสมาชิกในฝูงปกติประมาณ 10 ตัว บางฝูงอาจมีสมาชิกหลายสิบตัว ในฝูงซ้างป่ามีซ้างเพศเมีย เป็นผู้นำ เรียก แม่แปรง ส่วนเพศผู้ที่โตเต็มวัยไม่เข้าร่วมอยู่ในฝูง ยกเว้นในช่วงฤดูผสมพันธุ์ ซ้างป่าเพศเมียที่ได้รับการผสมพันธุ์ตั้งท้องประมาณ 19 - 22 เดือน (Lekagul and McNeely, 1988) ตกลูกครั้งละหนึ่งตัว ลูกซ้างป่าแรกเกิดหนักประมาณ 90 - 100 กิโลกรัม สูงประมาณ 90 เซนติเมตร อาศัยอยู่กับแม่ และหย่านมเมื่ออายุประมาณ 3 ปี ซ้างกินพืชอาหารได้หลากหลายชนิดทั้งพืชที่เป็นไม้ต้น ไม้พุ่ม ไม้เถา และหญ้า รองลาก (2546) รายงานจำนวนชนิดพืชอาหารของซ้างป่าในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง ว่ามีไม่ต่ำกว่า 235 ชนิด กินอาหารวันละประมาณ 100 กิโลกรัม น้ำหนักสด และกินน้ำวันละประมาณ 200 ลิตร

นิเวศวิทยาและการเลือกใช้พื้นที่อาศัย

ซ้างป่าชอบอาศัยในป่าผสมผลัดใบ แต่มักพบได้ในป่าดิบ และพบได้บ่อยในบริเวณแหล่งน้ำ แหล่งโป่ง (Parr, 2003) ทั้งนี้ศุภกิจ (2546) ศึกษาการประยุกต์ใช้ระบบสารสนเทศทางภูมิศาสตร์เพื่อวิเคราะห์การแพร่กระจายของซ้างป่าในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูเขียว จังหวัดชัยภูมิ โดยการประยุกต์ใช้ข้อมูลจากการสำรวจระยะไกลและใช้ระบบสารสนเทศทางภูมิศาสตร์รวมกับการสำรวจทางภาคสนามโดยใช้ปัจจัยในการวิเคราะห์ทั้งสิ้น 7 ปัจจัย ได้แก่ ชนิดป่า แหล่งน้ำ แหล่งโป่ง หน่วยพิทักษ์ป่า ถนน ความสูง และความลาดชัน พบว่า ในช่วงหน้าแล้งมีปัจจัย 3 ประการ ที่มีผลต่อการกระจายของซ้างป่า คือ แหล่งโป่ง แหล่งน้ำ และความลาดชัน ส่วนในช่วงหน้าฝนพบว่า มีปัจจัย 4 ประการที่มีผลต่อการกระจายของซ้างป่า คือ แหล่งโป่ง แหล่งน้ำ ความลาดชันและหน่วยพิทักษ์ป่า เมื่อพิจารณาปัจจัย ที่มีความสำคัญต่อการกระจายของซ้างป่าตลอดทั้งปีพบว่า มีอยู่ 4 ปัจจัย ได้แก่ แหล่งโป่ง ความลาดชันของพื้นที่ แหล่งน้ำและถนนที่มีผลต่อการกระจายและการเลือกใช้พื้นที่ของซ้างป่า ข้อมูลจากการศึกษาที่ได้นำไปสู่การจัดการพื้นที่ให้เป็นไปอย่างเหมาะสมเพื่อรองรับการเข้ามาใช้ประโยชน์ของซ้างป่าในแต่ละช่วงเวลาและลดผลกระทบอันเนื่องมาจากอิทธิพลของกิจกรรมต่างๆ ที่เกิดขึ้น โดยมนุษย์เพื่อเป้าหมายในการอนุรักษ์ซ้างป่าให้เป็นไปอย่าง

เหมาะสม ซึ่งเป็นแนวทางในการจัดการพื้นที่ในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูเขียวจังหวัดชัยภูมิโดยรวม ในอีกทางหนึ่งด้วย รองลาก (2546) ศึกษาานิเวศวิทยาของช้างป่าในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่า ห้วยขาแข้ง จังหวัดอุทัยธานี และจังหวัดตาก พบว่า ช้างป่าใช้ประโยชน์จากพื้นที่อยู่อาศัยในป่า หลายประเภท การเลือกพื้นที่อยู่อาศัย และกินพืชอาหารของช้างป่ามีความสัมพันธ์กับการ เปลี่ยนแปลงของพืชอาหาร พันธุ์พืชคลุมดิน และแหล่งน้ำตามฤดูกาล มีจำนวนประชากรช้างป่าใน พื้นที่ประมาณ 300 ตัว ขนาดของโขลงช้างโดยเฉลี่ย 5.4 ตัว มีอัตราส่วนระหว่างเพศของช้างตัวเต็ม วัยเป็นเพศผู้ 1 ตัว เพศเมีย 6.25 ตัว พบช้างป่าถูกล่าโดยมนุษย์ในปี พ.ศ. 2535 จำนวน 1 ตัว และใน ปี พ.ศ. 2536 จำนวน 2 ตัว และพบช้างป่าถูกล่าระหว่างปี 2540 – 2546 รวม 10 ตัว ตายโดยไม่ทราบ สาเหตุ 4 ตัว การเข้ากินหรือทำลายพืชผลการเกษตรของราษฎร โดยรอบเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่า ห้วยขาแข้งพบปรากฏเป็นครั้งคราว แต่ไม่รุนแรง

2. การเก็บตัวอย่างโดยไม่รุกรานสัตว์ป่า (Non-Invasive Sampling)

การศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของสัตว์ป่า มีความสำคัญต่อการอนุรักษ์และระบบ นิเวศของสัตว์ป่า การวิจัยการอนุรักษ์สัตว์ป่าแบบดั้งเดิมมักถูกกล่าวหาว่ามีวิธีการที่ส่งผลกระทบต่อ ทางลบต่อสัตว์ป่า โดยเฉพาะอย่างยิ่งสัตว์ป่าที่ใกล้สูญพันธุ์ เช่น การเก็บเนื้อเยื่อจากสัตว์ป่าโดยตรง อาจส่งผลให้สัตว์ป่ามีพฤติกรรมที่เปลี่ยนแปลงไป ซึ่งวิธีการเก็บตัวอย่างโดยไม่รุกรานสัตว์ป่า เป็น วิธีการเก็บตัวอย่างจากสัตว์ป่าชนิดไม่รบกวนสัตว์จึงมีความสำคัญและเหมาะสมในการศึกษา เกี่ยวกับการอนุรักษ์สัตว์ป่า ทั้งนี้การใช้พันธุศาสตร์ในการอนุรักษ์สัตว์ป่ามีความสำคัญ โดยเฉพาะ การเก็บตัวอย่างเพื่อให้ได้มาซึ่งสารพันธุกรรม โดยไม่เป็นการรุกรานสัตว์ป่า ซึ่งผู้วิจัยสามารถได้รับ การพันธุกรรมจากการเก็บตัวอย่างผม ขน มูลหรืออุจจาระ น้ำลาย กระดูก เช่น จากซากสัตว์ จาก การสำรวจของนกผู้ล่า เชื้อเปลือกไข่ ปัสสาวะ หนอง โดยแหล่งที่มาของดีเอ็นเอที่ใช้กันมากที่สุด จากวิธีการเก็บตัวอย่างโดยไม่รุกรานสัตว์ป่า คือ การเก็บตัวอย่างมูล และผม โดยเฉพาะในมูลมี จำนวนของเซลล์เยื่อบุลำไส้ซึ่งมีดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตในปริมาณมาก (Waits and Paetkau, 2005) ซึ่งวิธีการนี้ได้ทดสอบสำเร็จแล้วในสัตว์หลายชนิด เช่น นก (Broderick *et al.*, 2003; Idaghdour *et al.*, 2003) สิงโตภูเขา (Ernest *et al.*, 2000) แมวป่า (Palomares *et al.*, 2002) หมาป่า (Paxinos *et al.* 1997) หมี (Taberlet *et al.*, 1997; Wasser *et al.*, 1997) ลิง (Lathuilliere *et al.*, 2001) ชิมแพนซี (Bradley *et al.*, 2000; Morin *et al.*, 2001), กอริลล่า (Bradley *et al.*, 2000; Jensen-Seaman and Kidd, 2001) และช้าง (Fernando and Lande, 2000; Okello *et al.*, 2005; Ahlering *et al.*, 2011) ทั้ง

ในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก (Dallas *et al.*, 2003) แม้กระทั่งในสัตว์น้ำ เช่น ปลาโลมา (Michelle *et al.*, 2007)

ข้อดีของการเก็บตัวอย่างโดยไม่รุกรานสัตว์ป่า

สามารถกล่าวได้ว่าเป็นไปตามหลักจรรยาบรรณของนักวิจัย ซึ่งเป็นการเก็บตัวอย่างโดยไม่รบกวนสัตว์ป่า จึงไม่ทำให้พฤติกรรมของสัตว์ป่าเปลี่ยนแปลงไป ตัวอย่างที่ได้ สามารถระบุตัวของตัวอย่าง (Taberlet and Luikart, 1999) ใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสัตว์ป่า การพบเส้นขนในกองมูลของสัตว์ผู้ล่า เช่น เลื้อย หมาใน นำมาใช้ตรวจสอบชนิดของสัตว์ที่เป็นเหยื่อของสัตว์ผู้ล่า ทั้งได้รับดีเอ็นเอของเหยื่อ สามารถวิเคราะห์อาหารของผู้ล่า และความชุกชุมของชนิดเหยื่อ นอกจากนี้ ในมูลสามารถตรวจระดับฮอร์โมนของสัตว์ป่าได้ ทั้งยังสามารถใช้เพื่อการประเมินขนาดประชากรน้อยสุด และการประเมินสัดส่วนระหว่างเพศในประชากร (Alcaide *et al.*, 2010)

ข้อเสียของการเก็บตัวอย่างโดยไม่รุกรานสัตว์ป่า

ตัวอย่างที่ได้มาจะเข้าสู่ขั้นตอนการวิเคราะห์ข้อมูลในห้องปฏิบัติการ มีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีการ PCR ซึ่งเป็นกระบวนการพื้นฐานที่ห้องปฏิบัติการทั่วโลกใช้เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอให้มีจำนวนมากในเวลาอันรวดเร็ว แต่ประสิทธิภาพของผลผลิต PCR บ่อยครั้งขึ้นอยู่กับประสิทธิภาพในการสกัดดีเอ็นเอ กล่าวคือ ถ้าดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างที่ได้ยังมีการปนเปื้อนจากขยะในแหล่งตัวอย่าง อาจมีผลในการขัดขวางการเกิดการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในขั้นตอนการทำ PCR ทำให้ผลผลิตที่ได้มีประสิทธิภาพต่ำ หรืออาจไม่ได้ผลผลิตเลย (Roques *et al.*, 2011) และการเก็บตัวอย่างมูลในสัตว์แต่ละชนิดมีความยากง่ายต่างกัน โดยเฉพาะสัตว์น้ำมักมีความลำบากในการเก็บตัวอย่างมูล จึงต้องมีการพัฒนาวิธีการเก็บตัวอย่างมูลให้มีความจำเพาะกับสัตว์น้ำมากขึ้น (Green *et al.* 2007)

3. เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูวัก

ข้อมูลทั่วไป

ปี พ.ศ. 2517 กรมป่าไม้ได้ทำการสำรวจพื้นที่ภูวัก และเสนอพื้นที่ป่าภูวัก ให้เป็นเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูวัก ประกาศในราชกิจจานุเบกษา เล่ม 92 ตอนที่ 87 ลงวันที่ 2 พฤษภาคม 2518 มีเนื้อที่ประมาณ 186 ตารางกิโลเมตร หรือ 116,562 ไร่ อยู่ในตำบลหนองเคี่ยน ตำบลบุงกล้า ตำบลโคกกว้าง อำเภอบุงกล้า ตำบลบ้านด้อง ตำบลโสกก่าม อำเภอเซกา ตำบลชัยพร อำเภอบึงกาฬ และตำบลท่าดอกคำ อำเภอบึงโขงหลง จังหวัดหนองคาย และในปี 2533 ได้ผนวกพื้นที่หน่วยพิทักษ์ป่าถ้ำฝุ่น รวมมีเนื้อที่ทั้งสิ้น 124,662 ไร่

สภาพภูมิประเทศ

เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูวัก อยู่ทางด้านทิศตะวันออกเฉียงเหนือสุดของภาค เกือบติดพรมแดนประเทศสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว อาณาเขต 2 ด้าน ขนานไปกับแม่น้ำโขง ห่างจากชายแดนประมาณ 2 กิโลเมตร และห่างจากตัวจังหวัดหนองคาย ประมาณ 185 กิโลเมตร ความสูงจากระดับน้ำทะเลอยู่ระหว่าง 160 - 448 เมตร โดยบนหลังภูวักเป็นหน้าผาสองชั้นทางด้านทิศตะวันออก และลาดไปทางตะวันตก จุดสูงสุดสูงจากระดับน้ำทะเล 448 เมตร หินบนภูวักเป็นหินทราย ส่วนตอนล่างรอบๆ ภูวัก เป็นป่าดิบแล้ง ผลสมป่าเบญจพรรณ

สภาพภูมิอากาศ

แบ่งออกเป็น 3 ฤดู

1. ฤดูฝน เดือนมิถุนายน ถึงเดือนตุลาคม ฝนตกทุกปี ปริมาณน้ำฝนเฉลี่ยต่อปี ประมาณ 1,000-1,700 ลูกบาศก์เมตร อุณหภูมิเฉลี่ย 25 องศาเซลเซียส
2. ฤดูแล้ง เดือนพฤศจิกายน ถึงเดือนกุมภาพันธ์ อากาศหนาวเย็น อุณหภูมิเฉลี่ย 20 องศาเซลเซียส

3. ฤดูร้อน เดือนมีนาคม ถึงเดือนพฤษภาคม อากาศแห้งแล้ง เกิดไฟป่าประจำ อุณหภูมิเฉลี่ย 30 องศาเซลเซียส

ทรัพยากรป่าไม้

ป่าส่วนใหญ่เป็นป่าดิบแล้ง ป่าทุ่งหญ้า ป่าเบญจพรรณ ป่าเต็งรัง และป่าไผ่ กระจัดกระจายทั่วไป พันธุ์ไม้สำคัญที่พบ คือ ไม้ยาง ตะเคียนทอง ตะเคียนหิน พะยูง มะค่าโมง กะบาก ไม้ก่อ ไม้พื้นล่างเป็นไม้จำพวกหวาย ปาล์ม และไม้ไผ่

ทรัพยากรสัตว์ป่า

จากการสำรวจ เมื่อต้นปี พ.ศ. 2546 พบว่ามีสัตว์ป่าหลายชนิดที่ยังหลงเหลืออยู่ ได้แก่ ช้างป่า ประมาณ 31 ตัว กระจงหนู หมูป่า อีเห็น ลิง เก้ง นกชนิดต่างๆ ค้างคาว ไก่ป่า และไก่ฟ้า เป็นต้น สำหรับสัตว์ที่มีลักษณะเด่นในพื้นที่ได้แก่ ช้าง สัตว์ที่มีจำนวนมาก ได้แก่ นก แต่เนื่องจากเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูวี่ มีพื้นที่ป่าดงดิบ ประมาณ 40 ตารางกิโลเมตร ซึ่งเป็นพื้นที่ขนาดเล็ก สัตว์ป่าส่วนใหญ่จึงไม่สามารถเพิ่มขยายพันธุ์ (สำนักอนุรักษ์สัตว์ป่า, ม.ป.ป.)

4. พันธุศาสตร์ในการอนุรักษ์สัตว์ป่า (wildlife conservation genetics)

จากอัตราการเพิ่มขึ้นของประชากรโลกในปัจจุบัน ทำให้ต้องมีการผลิตอาหาร และปัจจัยต่างๆ รวมถึงการสร้างถนนในการเดินทาง ขนส่ง ตลอดจนเป็นที่อยู่อาศัย ที่ดินจึงเป็นสิ่งจำเป็น ซึ่งการขยายพื้นที่ดินเพื่อการผลิตของมนุษย์นั้นคือ การบุกรุกพื้นที่อาศัยหรือถิ่นกำเนิดเดิมของพืชและสัตว์ป่า ซึ่งเป็นทั้งที่อยู่อาศัยและแหล่งอาหารของสัตว์ป่า เมื่อแหล่งอาศัยและแหล่งอาหารลดลง จึงส่งผลให้จำนวนประชากรและชนิดสัตว์ป่าลดลงอย่างรวดเร็ว เกิดเป็นปรากฏการณ์คอขวด (bottleneck) ขึ้นในพื้นที่ป่าบางแห่ง ส่งผลให้ความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) ในธรรมชาติลดลง ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลกระทบต่อให้เกิดการสูญพันธุ์ตามมา (Zhang *et al.*, 2002) จึงจำเป็นต้องมีการอนุรักษ์สัตว์ป่าไว้ หนึ่งในหลายวิธีการอนุรักษ์สัตว์ป่า คือ การค้นคว้า วิจัยทางวิชาการ ซึ่งในปัจจุบันนั้นความรู้ทางด้านพันธุศาสตร์มีบทบาทในการเป็นปัจจัยสำคัญปัจจัยหนึ่งในการอนุรักษ์ทางชีวภาพ (Frankham, 2005)

พันธุศาสตร์ในการอนุรักษ์ เป็นการประยุกต์ใช้ข้อมูลทางพันธุกรรมในการจัดการเพื่อการดำรงอยู่ของสิ่งมีชีวิตชนิดใดชนิดหนึ่ง ซึ่งข้อมูลทางพันธุกรรมเป็นข้อมูลที่สำคัญ และใช้เป็นข้อมูลประกอบในการศึกษาประชากรสัตว์ป่า ทั้งในด้านนิเวศวิทยา พฤติกรรม ความสัมพันธ์ทางเครือญาติ และความสัมพันธ์ด้านภูมิประเทศ ซึ่งข้อมูลทางด้านพันธุกรรมเหล่านี้มีการนำไปใช้ประโยชน์ในหลายด้าน เช่น เพื่อคัดเลือกสัตว์สำหรับนำไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ การผสมข้ามสายพันธุ์สัตว์ รวมไปถึงการถ่ายทอดยีน ชนิดนั้นๆ จากรุ่นหนึ่ง ไปยังอีกรุ่นหนึ่ง และในการอนุรักษ์สัตว์ป่านั้นงานในด้านต่างๆ เหล่านี้ถูกนำมาใช้ผสมผสานกันเพื่อเพิ่มจำนวนประชากรสัตว์ป่า ความหลากหลายทางพันธุกรรม และลดการเกิดภาวะเลือดชิดในหมู่ประชากรสัตว์ป่า

การใช้ข้อมูลทางพันธุกรรมเพื่อศึกษาถึงลำดับของการวิวัฒนาการ ซึ่งได้รับการถ่ายทอดพันธุกรรมจากรุ่นหนึ่ง ไปสู่อีกรุ่นหนึ่ง และความหลากหลายทางพันธุกรรม เช่น ข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) จากไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ (mitochondrial DNA) โดยใช้เป็นข้อมูลในการศึกษาการถ่ายทอดพันธุกรรมจากแม่ไปสู่ลูก (maternal inheritance) (Albert *et al.*, 1983) จึงใช้เป็นข้อมูลในการศึกษาต้นกำเนิดในสายแม่ (maternal lineage) ได้

5. ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ (Mitochondrial DNA)

ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ (mitochondrial DNA; mtDNA) พบได้ในเซลล์ยูคาริโอต (Eukaryotic cell) ทุกเซลล์ เป็นดีเอ็นเอที่พบอยู่นอกนิวเคลียส อยู่ในไมโทคอนเดรียซึ่งอยู่ในส่วนไซโทพลาสซึมของเซลล์ เป็นดีเอ็นเอเกลียวคู่อยู่ในสภาพวงกลมปลายปิด (closed circular DNA) ดีเอ็นเอมีความยาว 5 ไมโครเมตร มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 10-12 เมกะดาลตัน (นิภาพร, 2539) ไมโทคอนเดรียแต่ละอันมีดีเอ็นเอประมาณ 2-10 ชุด หรือประมาณ 1,000-10,000 ชุดต่อเซลล์ โดยขนาดจีโนมของไมโทคอนเดรียในคนและสัตว์ส่วนมากจะมีขนาด 16 kb (Cooper, 2000) การถ่ายทอดของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอสู่รุ่นลูกหลานจะเป็นการถ่ายทอดทางสายแม่เท่านั้น (maternal inheritance) และสารพันธุกรรมของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอจะไม่มีการรวมหรือเกาะติดกับโปรตีนใดๆ แต่จะลอยอยู่ในส่วน matrix ของไมโทคอนเดรีย ในขบวนการถ่ายแบบของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นใน matrix นั้นไม่มี repairing system ทำให้เกิดความผิดพลาดในการถ่ายแบบสารพันธุกรรมของยีนไมโทคอนเดรียในอัตราที่สูงกว่าในยีนนิวเคลียสซึ่งมี repairing system ที่ดีมาก (พัชรีย์, 2549)

พัชรีย์ (2549) และ Brown *et al.* (1979) ได้กล่าวไว้ว่า ไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ คือ เครื่องมือที่มีประโยชน์ที่ใช้ในการศึกษาวิวัฒนาการ เนื่องจากมีคุณสมบัติเฉพาะตัว ดังนี้

1. ไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอของมนุษย์รวมถึงสัตว์ทั่วไปมีการถ่ายทอดพันธุกรรมจากแม่สู่ลูกเท่านั้น (maternal inheritance) เนื่องจากในเซลล์สืบพันธุ์เพศชายเมื่อปฏิสนธิกับเซลล์ไข่แล้วจะเข้าไปปฏิสนธิเฉพาะในส่วนหัวและทิ้งส่วนหางที่มีไมโทคอนเดรียไว้ ลูกจึงไม่ได้รับไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอจากพ่อ ดังนั้นลูกจึงควรมีลำดับของเบสในไมโทคอนเดรียเหมือนกับของแม่ทุกประการ ยกเว้นว่าเซลล์สืบพันธุ์ของแม่มีการกลายพันธุ์เกิดขึ้น

2. ไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ มีอัตราการกลายพันธุ์สูงกว่าอัตราการกลายพันธุ์ของดีเอ็นเอในนิวเคลียส ประมาณ 5 - 10 เท่า ในระยะเวลาที่เท่ากัน จึงเป็นเครื่องมือวัดการเปลี่ยนแปลงทางวิวัฒนาการที่มีความไว และความละเอียดที่สูงกว่าดีเอ็นเอในนิวเคลียสด้วย control region บนไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอเป็นส่วนที่มีความผันแปรมากที่สุด เนื่องจากมีอัตราการกลายพันธุ์สูงกว่าในบริเวณอื่นๆ ของจีโนม จึงนิยมนำมาศึกษาลำดับเบสเพื่อตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของจีโนมในการศึกษาวิวัฒนาการ และอัตราการกลายพันธุ์ที่วัดได้จากโอกาสที่เบส ณ ตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่งจะถูกแทนที่ด้วยเบสที่ต่างไปจากตำแหน่งเดิมต่อช่วงเวลาหนึ่งล้านปี หรือบางครั้งก็ใช้ต่อช่วงเวลาหนึ่งรุ่นอายุ เช่น เท่ากับ 20 ปีโดยประมาณในกรณีมนุษย์ โดยจากการประมาณ พบว่าอัตราการกลายพันธุ์ของไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอในส่วน control region อยู่ที่ $0.025 - 0.26$ ต่อตำแหน่งเบสต่อล้านปี ซึ่งเท่ากับ 5×10^{-7} ถึง 5×10^{-6} ต่อตำแหน่งเบสต่อรุ่นอายุ สำหรับส่วนของดีเอ็นเอใน hypervariable region 1 (HVS-1) ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของ control region ประมาณไว้ที่ 3.6×10^{-6} ต่อตำแหน่งเบสต่อรุ่น และสำหรับไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอส่วนอื่นๆ ที่มีได้อยู่ใน control region ประมาณอัตราการกลายพันธุ์อยู่ที่ 3.4×10^{-7} ต่อตำแหน่งเบสต่อรุ่นอายุ

3. ไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ พบได้ในเซลล์ที่มีชีวิตทุกๆ เซลล์ของร่างกาย มีความทนทานต่อสภาพความเป็นกรด และมีจำนวน copies ต่อเซลล์อยู่ในหลักพัน จึงสามารถตรวจพบและสกัดดีเอ็นเอได้ง่ายกว่าดีเอ็นเอจากนิวเคลียส

ไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอประกอบด้วยยีนหลายตำแหน่ง สามารถถอดรหัสให้ยีนทั้งหมด 37 ยีน มียีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการสร้างโปรตีน 13 ชนิด ribosomal RNAs (rRNAs) 2 ชนิด

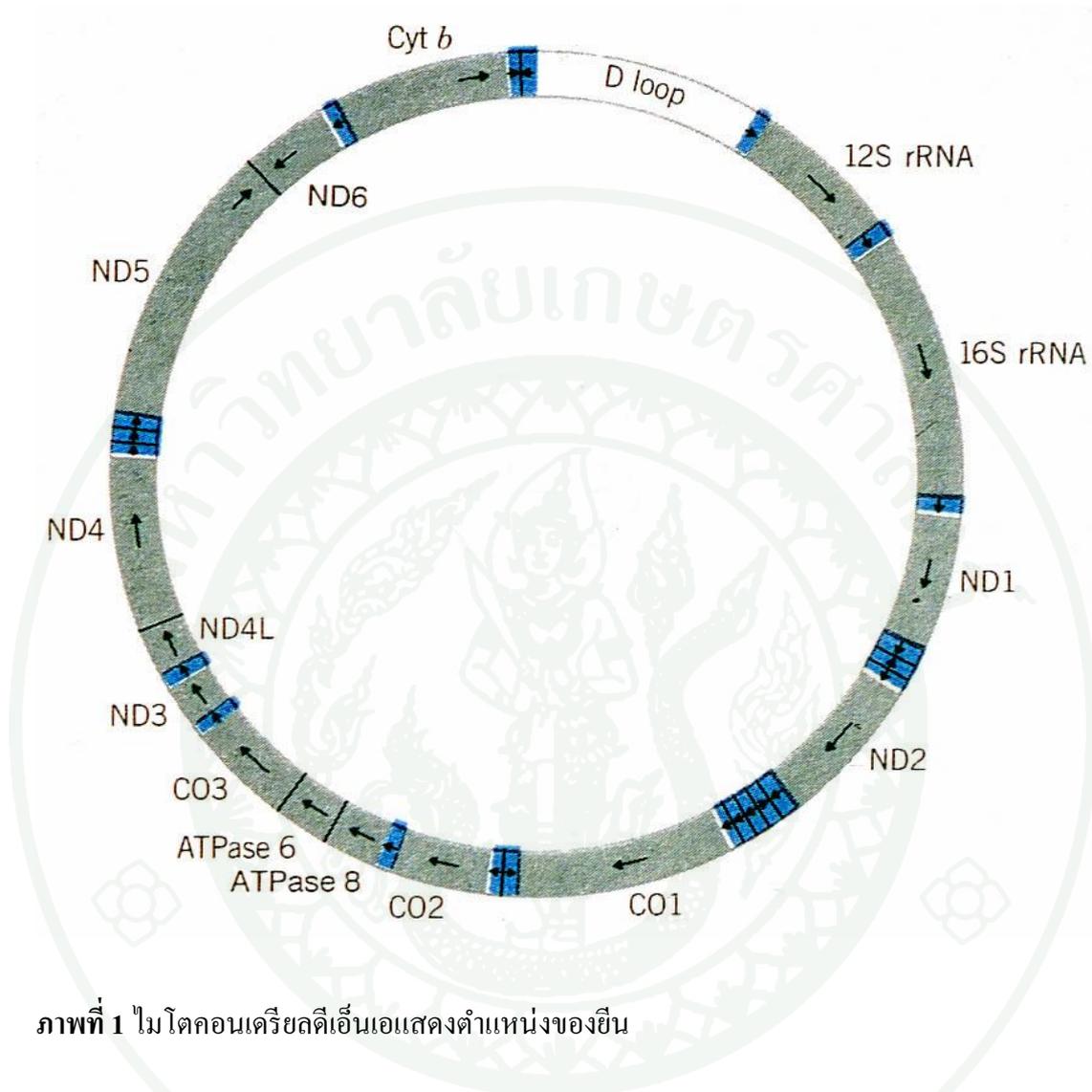
transfer RNAs (tRNAs) 22 ชนิด และส่วนของ control region ซึ่งบริเวณ displacement loop (D-loop) และ Cytochrome b เป็นส่วนที่พบว่ามีความแตกต่างของลำดับเบสมากกว่าส่วนอื่นของ ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ และใช้ศึกษาความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตหลายชนิด (พัชรีย์, 2549, Yang *et al.*, 1996, Noro *et al.*, 1998, Shenglin, 2007)

ตารางที่ 2 แสดงยีนและโปรตีน 13 ชนิดของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ

Gene	Product
ND1	NADH dehydrogenase subunit 1
ND2	NADH dehydrogenase subunit 2
COX1	Cytochrome c oxidase subunit I
COX2	Cytochrome c oxidase subunit II
ATP8	ATP synthase F0 subunit 8
ATP6	ATP synthase F0 subunit 6
COX3	cytochrome c oxidase subunit III
ND3	NADH dehydrogenase subunit 3
ND4L	NADH dehydrogenase subunit 4L
ND4	NADH dehydrogenase subunit 4
ND5	NADH dehydrogenase subunit 5
ND6	NADH dehydrogenase subunit 6
Cyt b	Cytochrome b

ที่มา: อูมาพร (2550)

ตำแหน่งต่างๆของยีนบนไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอแสดงไว้ตามรูปที่ 1 โดยในส่วนของ control region หรือ displacement loop (D-loop) นั้น ไม่มีการถอดรหัส แต่มีหน้าที่สำคัญในการเป็นจุดเริ่มต้นของขบวนการถ่ายแบบดีเอ็นเอ (DNA replication) และเป็นจุดเริ่มต้นของขบวนการสร้างอาร์เอ็นเอจากแม่พิมพ์ดีเอ็นเอ (transcription) โดยที่การมีเบสแตกต่างกัน ไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงใดที่ผิดปกติเกิดขึ้น เนื่องจากบริเวณนี้เป็นส่วนที่ไม่ได้ทำหน้าที่ถอดรหัส (พัชรีย์, 2549)



ภาพที่ 1 ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอแสดงตำแหน่งของยีน

ที่มา: อุมพร (2550)

6. ปฏิริยาอุกโซโพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction)

ปฏิริยาอุกโซโพลีเมอเรส หรือ PCR เป็นเทคนิคการเพิ่มปริมาณยีน (gene) หรือเพิ่มขยายจำนวนสารพันธุกรรม โดยปฏิริยาเกิดขึ้นได้ในหลอดทดลอง (*in vitro*) แบบซ้ำๆ กันหลายรอบ โดยอาศัยเอนไซม์โพลีเมอเรส (*Taq* DNA polymerase) โดยการเพิ่มปริมาณของสารพันธุกรรมนั้น อาศัยหลักการ DNA Replication ซึ่งเทคนิคนี้พัฒนาขึ้นเมื่อปี พ.ศ. 2528 โดย Kary Mullis และคณะ แห่งบริษัท Cetus Corporation

ข้อดีของเทคนิค PCR

1. สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้อย่างเฉพาะเจาะจง คือ มีความแม่นยำและมีความไว (sensitivity) สูง
2. ใช้เวลาไม่นาน
3. ปริมาณดีเอ็นเอที่ได้เกิดขึ้นเป็นล้านเท่า
4. มีความน่าเชื่อถือและเป็นที่ยอมรับทั่วโลก เช่น ทั้งในงานวิจัยทางชีวโมเลกุลและพันธุวิศวกรรม เช่น การเพิ่มปริมาณยีน (gene cloning) การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน (gene sequencing)

เทคนิค PCR สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอได้คราวละ 2 สายพร้อมกัน โดยใช้ไพรเมอร์ (primer) 1 คู่ ปฏิกิริยา PCR มี 3 ขั้นตอน โดยมีการหมุนเวียนต่อเนื่องกันไปภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของแต่ละขั้นตอน ดังนี้

ขั้นแรก Denaturing เป็นขั้นตอนที่ทำให้ดีเอ็นเอสายคู่ (double stranded DNA) แยกเป็นสายเดี่ยว (single strand DNA) เพื่อทำหน้าที่เป็นแม่พิมพ์ โดยเกิดขึ้นที่อุณหภูมิสูง 92 – 95 °C

ขั้นที่สอง Annealing เป็นขั้นตอนที่ primer เข้าไปจับกับนิวคลีโอไทด์ ที่เป็นเบสคู่สมบนสายดีเอ็นเอแม่พิมพ์ โดยเกิดที่อุณหภูมิในช่วง 37-60 °C

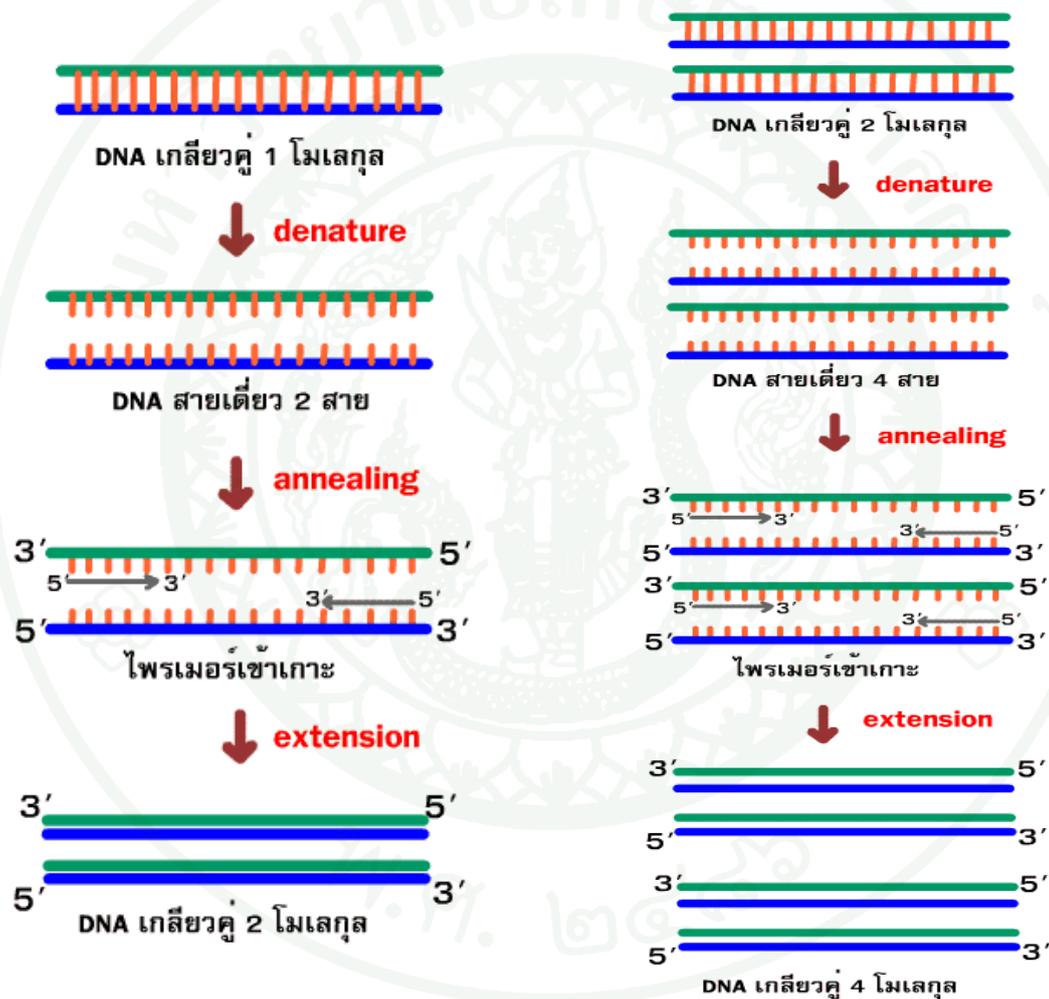
ขั้นที่สาม Extension เป็นขั้นตอนในการเพิ่มความยาวของสายดีเอ็นเอ โดยอาศัย Taq DNA polymerase ทำหน้าที่ต่อกับนิวคลีโอไทด์ ที่ปลาย 3'-OH ของ primer ในทิศทาง 5' ไป 3' เกิดขึ้นที่อุณหภูมิ 72-75 °C

โดย 1 รอบ (one cycle) ของปฏิกิริยา PCR คือขั้นตอนที่ 1-3 จะให้ปริมาณดีเอ็นเอเป็นสองเท่า ดังนั้นปริมาณดีเอ็นเอจะเพิ่มขึ้น 2^n เท่า เมื่อปฏิกิริยาผ่านไป n รอบ

สารเคมีที่ต้องใช้ในปฏิกิริยา PCR มีดังต่อไปนี้

1. Deoxynucleotides (dNTPs: dATP, dCTP, dTTP, dGTP) เป็นนิวคลีโอไทด์ มีความสำคัญในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่
2. Taq DNA polymerase เป็นเอนไซม์ที่ช่วยเร่งปฏิกิริยาเชื่อมต่อกับนิวคลีโอไทด์ใหม่เข้ากับไพรเมอร์

3. Primer (Oligonucleotide) เป็นดีเอ็นเอเริ่มต้นสายสั้นๆ ยาวประมาณ 15-25 bp ที่เป็นเบสคู่สมกับดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบ
4. PCR buffer เช่น $MgCl_2$ เป็นสารละลายที่ควบคุมสถานะของการทำปฏิกิริยาให้เหมาะสม
5. DNA Template คือดีเอ็นเอต้นแบบหรือยีนส่วนที่ต้องการเพิ่มปริมาณ



ภาพที่ 2 การทำ PCR เพื่อเพิ่มปริมาณ DNA ภายนอกเซลล์ โดยภาพซ้ายเป็นการเพิ่มปริมาณ DNA รอบที่ 1 และภาพขวาเป็นการเพิ่มปริมาณ DNA รอบที่ 2

ที่มา: Institute for Innovative Learning (2011)

7. การแยกขนาดดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (Electrophoresis of DNA)

Electrophoresis เป็นวิธีแยกสาร โดยอาศัยการเคลื่อนที่ของโมเลกุลที่มีประจุในสารละลาย ภายใต้สนามไฟฟ้า มีตัวกลางเพื่อเป็นที่ยึดเกาะของโมเลกุลสาร เช่น กระดาษกรอง แผ่น เซลลูโลสอะซีเตท เจลที่ทำจากอะการ์ อะกาโรส หรือโพลีอะครีลาไมด์ เป็นต้น การแยกสารอาศัย ความแตกต่างของประจุไฟฟ้า ขนาด และรูปร่างของโมเลกุล สารที่มีประจุต่างกันจะเคลื่อนที่ไปใน ทิศทางตรงกันข้าม ซึ่งโมเลกุลของดีเอ็นเอประกอบด้วยหมู่ฟอสเฟตจำนวนมาก สารละลายของ ดีเอ็นเอ (หรืออาร์เอ็นเอ) จึงมีประจุเป็นลบที่ pH เป็นกลาง เมื่ออยู่ในสนามไฟฟ้า โมเลกุลของ ดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่จากขั้วลบไปยังขั้วบวก เนื่องจากหมู่ฟอสเฟตเป็นส่วนประกอบของ นิวคลีโอไทด์ทุกชนิด ดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลเล็กมีหมู่ฟอสเฟตอยู่น้อยกว่าโมเลกุลขนาดใหญ่ ดังนั้นจึงพบว่าประจุต่อมวลโมเลกุลของดีเอ็นเอทุกขนาดมีเท่ากัน ความเร็วในการเคลื่อนที่ของ โมเลกุลดีเอ็นเอจึงขึ้นอยู่กับขนาดเป็นส่วนใหญ่ นอกจากประจุแล้วอัตราการเคลื่อนที่ก็ยังขึ้นอยู่กับ ขนาดของโมเลกุลรูปแบบของดีเอ็นเอ (Configuration) แรงเคลื่อนไฟฟ้า (Voltage) เปอร์เซ็นต์และ ชนิดของเจล และบัฟเฟอร์ที่ใช้ด้วย

อะกาโรสเจล (agarose gel) เป็นโพลีเมอร์ของ D-galactose สลับกับ 3,6-anhydrogalactose แยกได้จากวุ้น (agar) ในการแยกโมเลกุลของดีเอ็นเอโดยทั่วไปใช้อะกาโรสเจลเป็นส่วนใหญ่ เพราะมีช่วงที่ใช้ได้มากกว่า การเตรียมทำได้ง่ายและไม่มีอันตราย ซึ่งการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสมักทำ ในแนวราบ (horizontal gel) (สุรินทร์, 2545)

8. การหาลำดับเบส (DNA sequencing)

เทคนิคในการหาลำดับเบสของดีเอ็นเอมี 2 วิธี วิธีแรก คือการหาลำดับเบสโดยการติดฉลาก ที่ปลายดีเอ็นเอ และใช้สารเคมีทำลายนิวคลีโอไทด์ ในตำแหน่งที่มีความจำเพาะต่อชนิดของเบส (sequencing of end-labelled DNA by base-specific chemical cleavage) โดยอาศัยหลักการใช้ สารเคมีปรับเปลี่ยนเบสของดีเอ็นเอ เช่นการเติม methyl group ในตำแหน่งที่จำเพาะต่อเบสบาง ตำแหน่ง ซึ่งเบสจะถูกปรับเปลี่ยนหรือถูกทำลายไปจนเหลือเพียง deoxyribose ซึ่งมักถูกทำลาย ต่อไปจนเกิดการขาดของสายดีเอ็นเอ ในตำแหน่งของเบสดังกล่าว ทั้งนี้เราสามารถติดตามดีเอ็นเอ ด้วยการติดสารกัมมันตรังสี เช่น ฟอสฟอรัส-32 (^{32}P) ซึ่งขนาดของดีเอ็นเอสามารถแยกได้โดยการ

ใช้ไฟฟ้ากระแสตรงใน polyacrylamide gel และลำดับเบสสามารถอ่านได้จากแถบที่ปรากฏบนแผ่นฟิล์มเอกซเรย์

วิธีที่สอง เป็นการหาลำดับเบสของดีเอ็นเอโดยใช้เอนไซม์เพื่อสร้างดีเอ็นเอสายใหม่ จากดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA sequencing by enzymatic synthesis) อาศัยหลักการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่ จากดีเอ็นเอต้นแบบสายเดี่ยวโดยการทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase และนิวคลีโอไทด์ที่ติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสี ซึ่งการสิ้นสุดการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่จะเกิดขึ้นในตำแหน่งของ dideoxy nucleotide จึงเรียกวิธีการนี้ว่า dideoxy chain termination DNA sequencing หรือ Sanger method (กัลยาณี, 2551)

ปัจจุบันใช้วิธี Automated DNA sequencing อาศัยหลักการของ dideoxy chain termination ยกเว้นสีที่ใช้ในการติดฉลากจะใช้สารเรืองแสงแทนการใช้สารกัมมันตรังสี โดยอาศัยอุปกรณ์ติดตามการเรืองแสงที่แตกต่างกัน 4 ชนิด คือ A, G, T และ C โดยสีที่ติดฉลากบนนิวคลีโอไทด์แต่ละตัวจะมีการเรืองแสงที่ความยาวคลื่นแตกต่างกัน โดยการติดฉลากสีในสายดีเอ็นเอจะเกิดขึ้นในขั้นตอนการสร้างสายดีเอ็นเอ โดยจะติดฉลากที่ปลาย 5' ของไพริเมอร์ หรือที่ปลาย 3' ของ dideoxynucleotide triphosphate (จตุรงค์, 2541)

9. การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของประชากร (Phylogenetic Analysis)

การศึกษาวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต เพื่อการจัดจำแนกกลุ่มของสิ่งมีชีวิตนั้น ในอดีตการจัดจำแนกกลุ่มเป็นการนำลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology) เป็นหลัก ซึ่งการเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสิ่งมีชีวิตอาจไม่สามารถที่จัดกลุ่มแยกจากกันได้ แต่ต่อมาข้อมูลทางด้านสรีรวิทยา (physiology) การวิเคราะห์ทางเคมี และความรู้ทางชีวโมเลกุล (molecular biology) ได้มีบทบาทมากในการช่วยวิเคราะห์และสร้างความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการขึ้นใหม่ ทั้งนี้เนื่องจากสารต่างๆ ที่มีอยู่ภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต เช่น ดีเอ็นเอ เป็นแหล่งข้อมูลที่บอกรูปร่างวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต โดยลำดับสายดีเอ็นเอที่เหมือนกันแบบมีจุดกำเนิดเดียวกัน (homology) จะแสดงถึงลำดับสายที่สืบทอดมาจากบรรพบุรุษร่วมกัน ถ้าเหมือนกันมาก แสดงว่าสิ่งมีชีวิตดังกล่าวมีบรรพบุรุษร่วมที่ใกล้เคียงกันมากกว่า

แผนภูมิเดนโดแกรมแสดงในรูปแบบแผนภูมิการแตกกิ่งก้าน หรือแผนภูมิต้นไม้พันธุกรรม (phylogenetic tree หรือ phylogeny) ในแผนภูมินั้นประกอบด้วยปม (node) และกิ่ง (branch) แต่ละปมบนแผนภูมิต้นไม้แสดงถึงหน่วยทางอนุกรมวิธาน (taxonomic unit) หรือ แท๊กซอน (taxon) พหุพจน์ใช้ แท๊กซ่า (taxa) เพื่อหาความสัมพันธ์ของประชากรหรือในระดับสปีชีส์หรือระดับอื่น โดยให้สิ่งมีชีวิตที่ยังมีอยู่ในปัจจุบัน อยู่ที่ตำแหน่งปมที่ปลายสุดของแผนภูมิ (terminal node) และให้สิ่งมีชีวิตที่สูญพันธุ์ไปแล้ว อยู่ที่ตำแหน่งปมที่อยู่ภายในของแผนภูมิ (internal node) หรือ หมายถึงบรรพบุรุษร่วมของปมที่อยู่ถัดขึ้นไป

การสร้างวงศาวรรณวิวัฒนาการขึ้นใหม่นั้น ต้องมีการเลือกลำดับสายดีเอ็นเอที่เป็นยีนอนุรักษ์ (conserved gene) ในระดับที่เหมาะสม มีอัตราการสะสมการเปลี่ยนแปลงของลำดับสายดีเอ็นเอในระดับที่ไม่มากหรือไม่น้อยเกินไปกับระดับของสิ่งมีชีวิตที่สนใจศึกษาและต้องเป็นยีนที่มีอยู่ทั่วไปในสิ่งมีชีวิตที่นำมาใช้ในการสร้างวงศาวรรณวิวัฒนาการขึ้นมาใหม่นับว่าดีคือ ยีนที่ถอดรหัสเพื่อให้อาร์เอ็นเอชนิดที่เป็นองค์ประกอบของไรโบโซม (ribosomal RNA gene; rRNA gene; rDNA) ซึ่งมีอยู่ในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด (เจษฎา, 2545)

การแปลงข้อมูลทางโมเลกุลเป็น tree มี 2 วิธี วิธีแรก โดยอาศัยลักษณะที่แตกต่างกัน (character-based method) วิธีที่สอง โดยอาศัยระยะความห่างไกลกัน (distance-based method) (สุรินทร์, 2552)

Character-based method

การสร้าง tree โดยอาศัย character-based ใช้กับข้อมูลลำดับเบส (หรือลำดับกรดอะมิโน) โดยเปรียบเทียบลำดับเบสเป็นคู่ๆ นับจำนวนการกลายพันธุ์ (mutation) ที่เกิดขึ้น มี 2 วิธี คือ

1. Maximum parsimony (MP) เริ่มจากการหาลำดับเบสที่เป็นบรรพบุรุษ ซึ่งมีโอกาสเป็นไปได้หลายตัวอย่าง ทำให้ได้ tree หลายแบบ สร้าง tree โดยหาความเป็นไปได้ที่จะเกิดการเปลี่ยนแปลงน้อยที่สุดจากลำดับเบสของบรรพบุรุษจนถึงปัจจุบัน การเปรียบเทียบนิวคลีโอไทด์ มักไม่ใช่ทุกตำแหน่ง แต่เลือกเฉพาะตำแหน่งที่พบการแทนที่เบสแบบเดียวกันนั้นอย่างน้อย 2 ตัวอย่าง หรือเกิดการแทนที่เบสที่ตำแหน่งนั้นอย่างน้อย 2 ครั้ง ซึ่งจัดว่าเป็น informative ถ้าเกิดการแทนที่เบสที่ตำแหน่งใดเพียงครั้งเดียวจัดว่าเป็น non-informative จึงไม่นำมาคิด เมื่อเลือกได้ตำแหน่งที่

เป็น informative แล้ว หากจำนวนการแทนที่เบสน้อยที่สุดที่ตำแหน่งดังกล่าว รวมจำนวนการเปลี่ยนแปลงทุกตำแหน่ง สร้าง tree ที่มีการเปลี่ยนแปลงรวมน้อยที่สุด

2. Maximum likelihood (ML) ใช้โมเดลของความน่าจะเป็นเพื่อเลือก tree ที่ดีที่สุด มีความเป็นไปได้มากที่สุด สร้าง tree ทุกแบบแล้วเปรียบเทียบความน่าจะเป็น โดยพิจารณาจาก ลำดับเบสทั้งหมด ไม่ใช่เฉพาะที่เป็น informative เหมือนวิธี MP คำนวณความน่าจะเป็นของ ลำดับเบสของบรรพบุรุษทั้งหมดที่ค่อยๆ เปลี่ยนแปลงจากจุดต่างๆ จนถึงปัจจุบัน

Distance-based method

การสร้าง tree วิธีนี้เริ่มจากการเปลี่ยนข้อมูลทางโมเลกุลให้เป็นค่า distance ก่อน โดย คำนวณค่า distance ระหว่างแต่ละตัวอย่างเป็นคู่ๆ นำมาทำเมทริกซ์ (matrix) แล้วจึงสร้าง tree ค่า distance คำนวณมาจากรูปแบบของแถบดิเอ็นเอหรือโปรตีนที่ได้จากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมาย แบบต่างๆ ซึ่งข้อมูลลำดับเบสสามารถนำมาหาค่า distance ได้ การสร้าง tree ด้วยวิธีนี้มี 2 ระบบ คือ

1. Clustering based method โดยดูจาก distance matrix แล้วเริ่มจับคู่ตัวอย่างหรือ taxon ที่เหมือนกันมากที่สุดคือมีค่า distance น้อยที่สุดก่อน แล้วดำเนินการต่อไปเรื่อยๆ นิยมใช้มี 2 วิธี

- วิธี UPGMA (unweighted pair group method using arithmetic average) การสร้าง tree ใช้การสังเกตจากเมทริกซ์ และจับคู่ taxon หรือตัวอย่างที่มีค่า distance น้อยที่สุดก่อน โดย node คือ จุดกึ่งกลางระหว่าง distance ของ 2 taxon ลดขนาดของเมทริกซ์ลง โดยให้กลุ่มที่จัดแล้วเป็น taxon เดียวกัน คำนวณ distance ระหว่าง taxon ใหม่กับ taxon ที่เหลือ สร้างเมทริกซ์ใหม่ที่ลดจำนวน taxon ลง จับคู่กลุ่มใหม่ที่มีค่า distance น้อยที่สุด ทำซ้ำไปเรื่อยๆ taxon ตัวสุดท้ายคือ outgroup สมมติฐานของ UPGMA คือ ทุก taxon มีการเปลี่ยนแปลงด้วยอัตราคงที่ ซึ่งไม่ถูกต้องเสมอไป จึงอาจมีความคลาดเคลื่อนได้ แต่มีข้อดี คือ ทำได้รวดเร็ว

- วิธี Neighbor joining (NJ) คล้ายกับวิธี UPGMA คือ ค่อยๆ ลดขนาดของเมทริกซ์ลง แต่ไม่ได้คิดว่าทุก taxon มีอัตราการวิวัฒนาการที่คงที่ ข้อเสียของ NJ คือ สร้าง tree ได้เพียง 1 แบบ บางครั้งอาจมี taxon ที่ใกล้เคียงกันมากกว่า 1 คู่ การเลือกเพียง 1 คู่ อาจผิดพลาดได้ วิธีแก้ไขคือ

สร้าง tree ใหม่ โดยเริ่มจับกลุ่มตั้งต้นที่แตกต่างกัน แล้วค่อยเลือก tree ที่เหมาะสมจากข้อมูลประกอบอื่นอีกครั้งหนึ่ง

2. Optimality based method การสร้าง tree โดยใช้วิธีสุ่มจับคู่ taxon แล้วสร้าง tree หลายๆ แบบ แล้วจึงเลือกแบบที่เหมาะสมที่สุด

การทดสอบความเชื่อมั่นของ tree ใช้วิธีการสุ่มข้อมูลซ้ำ (resampling) จากข้อมูลเริ่มต้นหลายๆ ครั้ง เช่น การทำ bootstrap โดยการสุ่มตัวอย่างจากข้อมูลเดิม การสุ่มอาจมีการตัดข้อมูลบางส่วนออกและข้อมูลที่เหลือบางส่วนอาจนำมาพิจารณาเกินกว่า 1 ครั้ง สร้าง tree ขึ้นใหม่ทุกครั้งที่มีการสุ่มเพื่อดูความซ้ำและความแข็งแรงของ tree เปรียบเทียบกัน ทำให้มีความมั่นใจมากขึ้น การทำการสุ่มซ้ำ 100 ครั้ง ถึง 1,000 ครั้ง แล้วคิดเปอร์เซ็นต์ ตัวเลขแสดงผลที่ได้จากการทำ bootstrap จะอยู่บนกิ่งของ tree กิ่งใดมีค่าสูง (เช่น 80-100%) แสดงว่าการจัดกลุ่มของ taxon ที่อยู่รวมกันในกลุ่มนั้นมีความน่าเชื่อถือหรือความเป็นไปได้สูง ถ้าค่า bootstrap ของกิ่งใดมีค่าต่ำ (เช่น ต่ำกว่า 50%) แสดงว่าการจัดกลุ่มของ taxon ที่อยู่รวมกันในกลุ่มนั้นอาจยังไม่ถูกต้องหรือมีข้อมูลไม่เพียงพอ ควรศึกษาเพิ่มเติม หรือหาข้อมูลอื่นมาประกอบ (สุรินทร์, 2552)

10. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของช้างไทย

ปรีดา และคณะ (2546) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของช้างไทยจำนวน 82 เชือก โดยใช้เทคนิค PCR และหาลำดับเบสในส่วนยีน cytochrome b ใน mitochondrial DNA สามารถแบ่งช้างไทยตามความแตกต่างทางพันธุกรรมได้ 8 haplotypes โดยพิจารณาจากความแตกต่างของลำดับเบส 12 ตำแหน่ง ยังพบว่า haplotypes A และ B เป็นรูปแบบที่พบในประชากรช้างไทยมากกว่ากลุ่มอื่นๆ สมาชิกในแต่ละกลุ่มมีการกระจายตัวทั่วพื้นที่ที่ทำการเก็บตัวอย่างเป็นผลเนื่องจากการเคลื่อนย้ายช้างโดยควาญช้างเพื่อการประกอบอาชีพ และจากตัวอย่างช้างป่าจำนวน 2 ตัวพบลำดับเบสมีการเรียงตัวแบบ haplotypes B แสดงให้เห็นว่าช้างป่า และช้างเลี้ยงมีความสัมพันธ์กันในเครือญาติเป็นผลจากการที่มีการจับช้างป่ามาเลี้ยงตั้งแต่อดีต เมื่อนำลำดับเบสของทั้ง 8 haplotypes มาแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนพบว่าลำดับของกรดอะมิโนมีลำดับเหมือนกัน 100%

จากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในส่วนยีน Cytochrome b ของประชากร ช้างป่า (*Elephas maximus*) ในอุทยานแห่งชาติแก่งกระจาน และเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูเขียว ของ สุราทิพย์ และคณะ (2552) โดยศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมบนสายไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ (mitochondrial DNA) บริเวณส่วนต้นของยีน Cytochrome b ผลการเก็บตัวอย่างมูล จาก อุทยานแห่งชาติแก่งกระจาน จำนวน 70 ตัวอย่าง และเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูเขียว จำนวน 49 ตัวอย่าง พบว่า ส่วนต้นของยีน Cytochrome b ขนาด 250 เบส สามารถแบ่งช้างป่าได้เป็น 3 กลุ่ม คือ HapA, HapB และ HapC โดยที่อุทยานแห่งชาติแก่งกระจาน พบทั้ง 3 กลุ่ม คือ HapA จำนวน 6 ตัว HapB จำนวน 42 ตัว และ HapC จำนวน 22 ตัว ในขณะที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูเขียว พบเพียง 2 กลุ่ม คือ HapA จำนวน 41 ตัว และ HapC จำนวน 8 ตัว

11. ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของช้าง

Noro *et al.* (1998) ทำการแยกกลุ่มช้างเอเชีย ช้างแอฟริกา และ woolly mammoth โดยใช้ ความแตกต่างของลำดับเบสในส่วน cytochrome b (1,137bp) 12S ribosomal RNA (961 bp) จาก การเปรียบเทียบลำดับเบสกับ woolly mammoth (accession number S72502) พบว่าลำดับเบสที่มีความใกล้เคียงกับช้างแอฟริกามากกว่าช้างเอเชีย ซึ่งในก่อนหน้านั้น Yang *et al.* (1996) ได้ ทำการศึกษาลำดับเบสในบางส่วนของ cytochrome b พบว่าลำดับเบสของ woolly mammoth มีความใกล้เคียงกับช้างเอเชียมากกว่าช้างแอฟริกา ต่อมา Krause *et al.* (2006) และ Rogaev *et al.* (2006) ได้ทำการศึกษาลำดับเบสในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอทั้งหมดของ woolly mammoth ทั้ง อุมพร (2550) ได้ทำการศึกษาลำดับเบสในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอทั้งหมดของช้างไทยซึ่งเป็นช้าง เอเชีย พบว่า woolly mammoth มีความใกล้เคียงกับช้างเอเชียมากกว่าช้างแอฟริกาเช่นกัน Fleischer *et al.* (2001) ได้เปรียบเทียบ ช้างเอเชีย และช้างแอฟริกาโดยใช้ยีนในส่วน 3' end cytochrome b, tRNA และ control region (CR) ในส่วนดังกล่าวสามารถใช้แยกกลุ่มช้างเอเชียจากช้างแอฟริกาได้ และสามารถที่จะแบ่งช้างเอเชียออกเป็นกลุ่มย่อยได้ 2 กลุ่ม คือ Clade A และ Clade B ซึ่งปริดา และคณะ (2546) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของช้างด้วยเทคนิค PCR และหาลำดับเบส ในส่วนของ 5' end cytochrome b gene ใน mitochondrial DNA ผลการศึกษาสามารถที่จะแบ่ง ช้างไทยออกเป็น 8 haplotypes จากความแตกต่างกัน 12 ตำแหน่ง บนความยาว 250 bp ของยีนที่ นำมาใช้ในการเปรียบเทียบกับรายงานของ Fleischer *et al.* (2001) โดย HapA, HapD, HapE, HapH และ HapG มีความใกล้เคียงกับ Clade A และ HapB, HapC และ HapF มีความใกล้เคียงกับ Clade B ช้างไทยที่ทำการศึกษามีรูปแบบพันธุกรรมทั้ง 2 แบบ และยีนในส่วน 5' end cytochrome b

บนไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอสามารถที่จะใช้แยกแยะระหว่าง ช้างเอเชีย และช้างแอฟริกาได้ มีความแตกต่างมากกว่า 4.6% เช่นเดียวกับที่รายงานใน Fleischer *et al.*, (2001)



อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. ส้อมพลาสติก
2. สายวัดสำหรับใช้วัดขนาดของมูล (butterfly, the Product Republic of China)
3. หลอดเก็บมูลขนาด 50 มิลลิลิตร ที่มีน้ำยารักษาสภาพ DETs Buffer (20% DMSO, 250 mM EDTA, 100 mM Tris pH 7.5, salt solution: NaCl) อยู่ 15 มิลลิลิตร
4. ถุงมือยางสำหรับเก็บตัวอย่าง (Saf-Gard, Union Glove, Thailand)
5. ชุดสกัดดีเอ็นเอ (Nucleospin® Plant II (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Germany)
6. ใบมีด โคน (Laser super stainless, Malhata Shaving Product Pvt. Ltd., India)
7. เครื่องปั่นแยกตะกอน centrifuge, DENVILLE 260D (DENVILLE Scientific. Inc, USA)
8. เครื่องปฏิกิริยา PCR, PTC-200 (Peltier Thermal Cycler machine, USA)
9. เครื่องแห้งตะกอน Dry bath incubation (Major Science Inc, Taiwan)
10. เครื่องถ่ายภาพเจล Gel documentation (Alphadigidoc™, EEC)
11. Gel electrophoresis Gelmate 200 (TOYOBO®, Japan)
12. เครื่องกำเนิดแสง U.V. Electronic U.V. Transilluminator (Alphadigidoc™, EEC)
13. โปรแกรมสำหรับถ่ายรูปแบบเจล AlphaDigiDoc RT
14. โปรแกรมวิเคราะห์ลำดับเบส BioEdit version 7.0.9.0 (Hall, 1997)

วิธีการ

1. การเก็บตัวอย่างมูล

การเก็บตัวอย่างมูลช้าง เลือกเก็บที่บริเวณโป่ง และบริเวณที่ช้างออกมาหากิน โดยเก็บครอบคลุมกลุ่มประชากร เก็บตัวอย่างมูล (non-invasive sampling) ที่มีลักษณะใหม่เป็นมูลสด 24-48 ชั่วโมง ซึ่งเป็นมูลที่มีคุณภาพ สำหรับนำมาวิเคราะห์ หากความหลากหลายทางพันธุกรรม (Sripiboon *et al.*, 2010) จากเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูวัว จำนวน 39 ตัวอย่าง เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูเขียว จำนวน 57 ตัวอย่าง เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูหลวง จำนวน 10 ตัวอย่าง และเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าดงใหญ่ จำนวน 8 ตัวอย่าง เก็บตัวอย่างบริเวณผิวนอกของมูลซึ่งเป็นแหล่งของ ไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอ โดยใช้ส้อมพลาสติกขูดบริเวณผิวนอกของมูลช้างเพียงก้อนเดียวจากในกองมูล จากนั้นปาดมูลที่ติดเนื้อเยื่อลงหลอดเก็บมูลขนาด 50 มิลลิลิตร ที่มีน้ำยารักษาสภาพมูล DETs Buffer (20% DMSO, 250 mM EDTA, 100 mM Tris pH 7.5, salt solution: NaCl) อยู่ 15 มิลลิลิตร (Frantzen *et al.*, 1998) (ภาคผนวก ก) โดยอัตราส่วนน้ำยารักษาสภาพมูล DETs Buffer ต่อตัวอย่างมูล คือ 4:1 (Melanie *et al.*, 2002) ดินฉลากวันเดือนปีที่เก็บตัวอย่าง สถานที่เก็บตัวอย่าง และวัดขนาดมูล 3 ก้อน เลือกวัดขนาดใหญ่สุดและรองลงมา และบันทึกพิกัด โดยเลือกเก็บตัวอย่างมูลช้างป่าจากกองมูลที่มีระยะห่างของแต่ละกองมูลมากกว่า 1 เมตร ทั้งนี้เพื่อเป็นการป้องกันปัญหาที่เกิดจากการเก็บตัวอย่างที่ซ้ำกันจนมากเกินไป ตัวอย่างที่ได้นำมาแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C รอการสกัดดีเอ็นเอ

2. การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากมูลช้าง เป็นวิธีการที่ประยุกต์จากวิธีการตามชุดสกัดดีเอ็นเอ (Nucleospin® Plant II MACHERY-NAGEL GmbH & Co. KG, Germany) (สุรชาติพิทย์ และคณะ, 2552) โดย

2.1 นำตัวอย่างมูลช้าง 1.5 ml ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนใสทิ้ง จากนั้นย่อยเซลล์และโปรตีนด้วย Lysis Buffer PL1 400 μ l และ RNase 10 μ l เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex แล้วนำไปเข้าเครื่องอบที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

2.2 แยกโปรตีนออกจากดีเอ็นเอ โดยนำ Nucleospin® Filter column (violet ring) ใส่ใน micro centrifuge tube 1.5 ml หลอดใหม่ ดูดตัวอย่างใส่ลงไปใน Nucleospin® Filter column (violet ring) ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นทิ้ง Filter column ดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่ที่มี Binding Buffer PC 450 μ l เขย่าให้เข้ากัน เพื่อตกตะกอน

2.3 ใส่ Nucleospin® Plant II Filter column (green ring) ลงไปใน Nucleospin® Collecting tube ดูดตัวอย่างใส่ลงไปใน Filter column (green ring) ปริมาตรสูงสุด 700 μ l ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นทิ้ง flow-through (ของเหลวที่ได้จากการกรอง)

2.4 ล้างตะกอนครั้งแรกโดยเติม Wash Buffer PW1 400 μ l ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นทิ้ง flow-through

2.5 ล้างตะกอนครั้งที่สองโดยเติม Wash Buffer PW2 700 μ l ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นทิ้ง flow-through แล้วเติม Wash Buffer PW2 200 μ l ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นทิ้ง flow-through

2.6 ใส่ Nucleospin® Plant II Filter column (green ring) ลงไปใน micro centrifuge tube 1.5 ml หลอดใหม่ ละลายดีเอ็นเอด้วย Elution Buffer PE 45 μ l โดยใส่ลงตรงกลางของ Filter column เข้าเครื่องอบที่อุณหภูมิ 70 °C เป็นเวลา 10 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที ทิ้ง Filter column เก็บดีเอ็นเอต้นแบบ (Template) ที่ได้ไว้ในอุณหภูมิ -20 °C

3. การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR)

การทำ Polymerase Chain Reaction (PCR) ในการศึกษานี้ใช้ primers 2 คู่ ดังตารางที่ 5 ทั้งนี้ตำแหน่งที่ต้องการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแสดงในภาพที่ 3 โดยในปฏิกิริยาประกอบด้วย mixture กับดีเอ็นเอในอัตราส่วน mixture: DNA, 9: 1 สารละลายในการทำ PCR Mixture 4 ตัวอย่าง สำหรับ primer คู่ที่ 1 CB0fw-CB2re คัดแปลงจาก (Kocher *et al.*, 1989) ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ส่วนผสมของ PCR reaction mixture สำหรับ primer คู่ที่ 1 CB0fw-CB2re ที่จัดเตรียมในการศึกษา

No.	Mixture	Volume (μ l)
1	deionized water	67.5
2	10x PCR buffer $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	10
3	25 mM MgCl_2	8
4	10 mM dNTP	2
5	20 μ M Primer Forward CB0	1
6	20 μ M Primer Reward CB2	1
7	Taq DNA Polymerase (Fermentas®, USA)	0.5
Total Volume		90

PCR product ทั้งหมด 20 μ l มี Mixture 18 μ l และ DNA Template 2 μ l ใช้เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออัตโนมัติ PTC-200 (Peltier Thermal Cycler machine, USA) ขั้นตอนในปฏิกิริยาประกอบด้วย predenature ที่ 95 °C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเข้าสู่รอบของการเพิ่มขึ้นส่วนของดีเอ็นเอ จำนวน 40 รอบ เริ่มจาก denature ที่ 94 °C เป็นเวลา 30 วินาที annealing 53 °C เป็นเวลา 30 วินาที extension 72 °C 30 วินาที และเมื่อครบจำนวนรอบ อุณหภูมิจะเข้าสู่ขั้นตอนของ final extension ที่ 72 °C เป็นเวลา 5 นาที และ final incubation ที่ 4°C ตลอดไป

สำหรับ primer คู่ที่ 2 MDL5fw-MDL3re (Fernando *et al.*, 2003a) การทำ PCR Mixture 1 ตัวอย่าง 20 μ l ดังตารางที่ 4

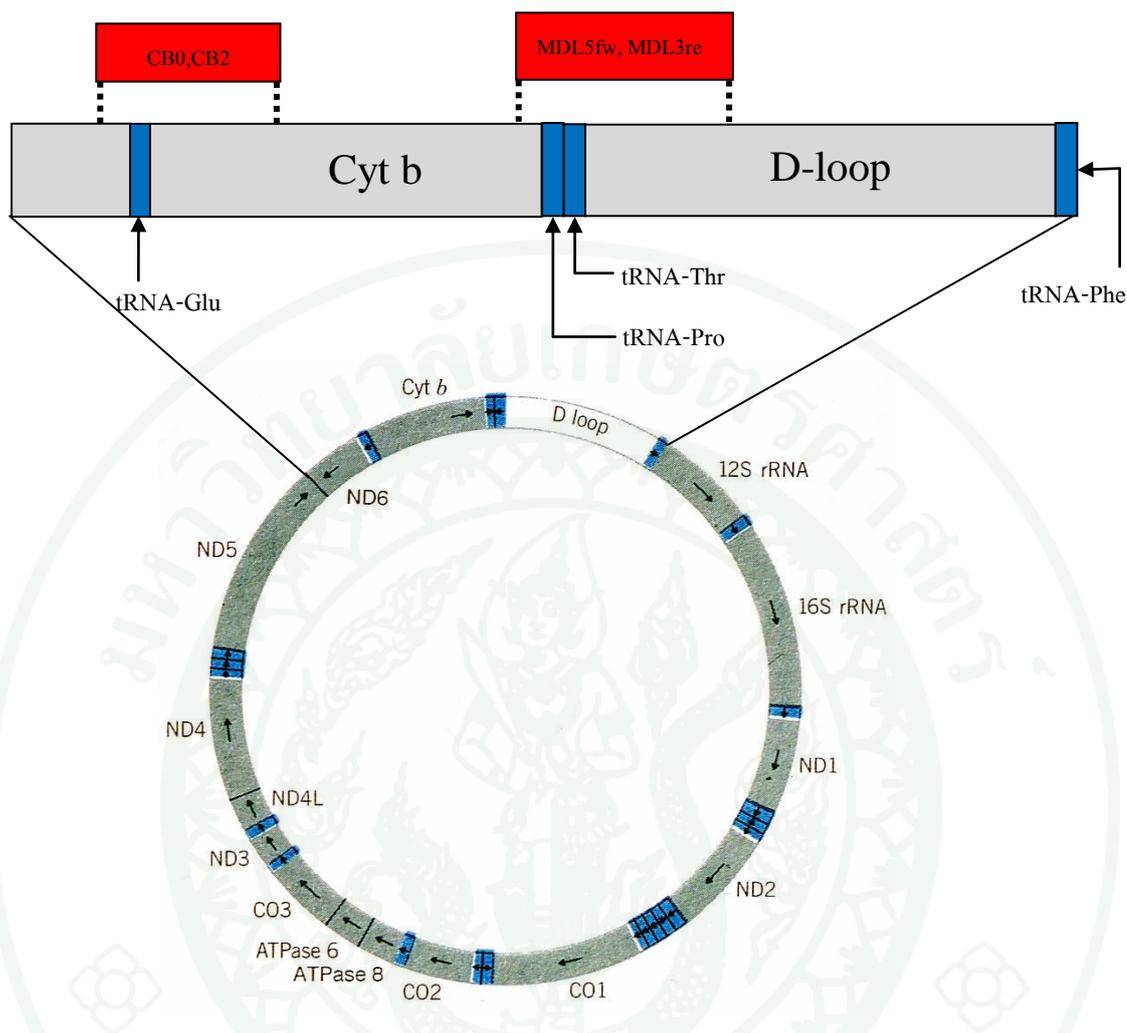
ตารางที่ 4 ส่วนผสมของ PCR reaction mixture สำหรับ primer คู่ที่ 2 MDL5fw-MDL3re ที่
จัดเตรียมในการศึกษา

No.	Mixture	Volume (μ l)
1	deionized water 7.2 μ l	7.2
2	2x High-Fidelity PCR Master Mix (Phusion TM Flash, Finland)	10
3	5 μ M Primer Forward MDL5	0.4
4	5 μ M Primer Reward MDL3	0.4
Total Volume		18

PCR product ทั้งหมด 20 μ l มี Mixture 18 μ l และ DNA Template (dilute 1:10) 2 μ l ใช้
เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออัตโนมัติ PTC-200 (Peltier Thermal Cycler machine, USA) ขั้นตอนใน
ปฏิกิริยา ประกอบด้วย predenature ที่ 98 °C เป็นเวลา 10 วินาที จากนั้นเข้าสู่รอบของการเพิ่ม
ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ จำนวน 30 รอบ เริ่มจาก denature ที่ 98 °C เป็นเวลา 1 วินาที annealing 63 °C
เป็นเวลา 5 วินาที extension 72 °C 15 วินาที และเมื่อครบจำนวนรอบ อุณหภูมิจะเข้าสู่ขั้นตอนของ
final extension ที่ 72 °C เป็นเวลา 1 นาที และ final incubation ที่ 4°C ตลอดไป

ตารางที่ 5 แสดง Primers 2 คู่ ที่ใช้ในการทำ PCR และช่วงอุณหภูมิการจับตัวที่เหมาะสม (Ta)

Pair	Primer	Sequence 5'-3'	bp	Ta (°C)
1	CB0 fw	CAT GAC TAA TGA TAT GAA AAA CC	450	53
	CB2 re	CTC AGA ATG ATA TTT GTC CTC A		
2	MDL5fw	TTA CAT GAA TTG GCA GCC AAC CAG	630	63
	MDL3re	CCC ACA ATT AAT GGG CCC GGA GCG		



ภาพที่ 3 แสดงตำแหน่งที่ต้องการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (สีแดง)

ที่มา: อุมพร (2550)

4. การตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วย Electrophoresis

PCR products ที่ได้ทำการตรวจสอบด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis (ภาคผนวก ก) ผสม loading dye 2 μ l กับ PCR products 5 μ l โดยใช้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์คงที่ 100 โวลต์ 30 นาที ย้อมด้วย ethidium bromide 5 นาที ล้างด้วยน้ำไหลผ่าน 5 นาที แล้วถ่ายรูปภายใต้แสง UV อ่านผลภายใต้เครื่อง Gel documentation หรือ เครื่อง U.V. transilluminator โดยใช้ 100 bp ladder เป็น marker

5. การหาลำดับเบส (DNA Sequencing)

PCR product ที่ได้ นำส่งหาลำดับเบสด้วยเครื่อง Automated DNA sequencing รุ่น A-373 automated sequencer (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA) และใช้ไพรเมอร์คู่เดียวกันกับที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR ที่บริษัท First Base Laboratories, Malaysia

6. การเปรียบเทียบลำดับเบส (Alignment)

นำลำดับเบสที่ได้ขนาดความยาวประมาณ 450 bp สำหรับ Cytochrome b และ 630 bp สำหรับ control region จากนั้นนำลำดับเบสที่ได้มาทำการตัดลำดับเบสที่อ่านไม่ได้ออกก่อน แล้วนำมาทำการเปรียบเทียบกับลำดับเบสใน Genbank (<http://ncbi.nlm.nih.gov/>) เพื่อตรวจสอบว่าลำดับเบสที่ได้มานั้น เป็นช้างเอเชียจริง และใช้โปรแกรม Bioedit (Hall, 1999) ในการตรวจสอบเปรียบเทียบลำดับเบส เพื่อหาความแตกต่างและจัดกลุ่ม (haplotype) ของตัวอย่างมูลช้าง โดยทำการวิเคราะห์ในส่วนต้นของ Cytochrome b และ ส่วนปลาย Cytochrome b ถึงส่วนต้นของ control region ซึ่งในส่วนต้นของ Cytochrome b

7. การวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

ลำดับเบสทั้งหมดจะถูกนำมาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการทางพันธุกรรม ด้วยการสร้างแผนภูมิต้นไม้พันธุกรรม (phylogenetic tree) เปรียบเทียบกับลำดับเบสของตัวอย่างช้างเอเชีย ช้างแอฟริกาและช้างแมมมอทที่มีรายงานใน GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) โดยใช้พะยูนเป็นสัตว์นอกกลุ่ม (outgroup) ด้วยโปรแกรม MEGA version 4.1 โดยใช้วิธี Neighbor-joining (NJ) และทำการทดสอบความน่าเชื่อถือของ tree ด้วย Bootstrap 1,000 รอบ จากนั้นใช้โปรแกรม DnaSP 5.10 ในการหาค่า Haplotype diversity และ Nucleotide diversity

Haplotype diversity (h) คือ ความน่าจะเป็นที่ตัวอย่างของ haplotype ใดๆ มีความแตกต่างกัน ในกลุ่มประชากร (Nei, 1987) คำนวณได้จากสูตร

$$h = \left(\frac{n}{n-1} \right) \left(1 - \sum_{i=1}^k p_i^2 \right)$$

เมื่อ n คือ จำนวนตัวอย่าง
 k คือ จำนวน haplotype
 p_i คือ ความถี่ของแต่ละ haplotype

Nucleotide diversity (π) คือ ค่าเฉลี่ยความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์ เป็นค่าที่สามารถบอกความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรได้ดี (Tajima, 1989) คำนวณได้จากสูตร

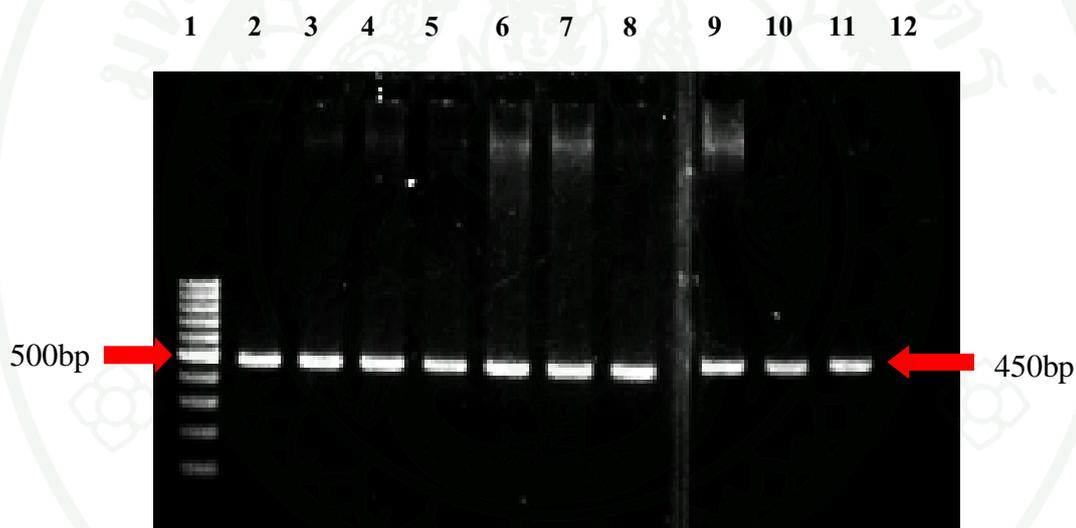
$$\pi = \left(\frac{n}{n-1} \right) \left(\sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^k p_i p_j d_{ij} \right)$$

เมื่อ n คือ จำนวนตัวอย่าง
 k คือ จำนวน haplotype
 p_i คือ ความถี่ haplotype i
 p_j คือ ความถี่ haplotype j
 d_{ij} คือ ค่าที่คำนวณได้จากความแตกต่างระหว่าง haplotype i และ haplotype j

สร้างเครือข่ายพันธุกรรม (network) จากการประเมินความสัมพันธ์ของตัวอย่าง และความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ใน haplotype ด้วยโปรแกรม TCS1.21 (Clement *et al.*, 2000) นำผลที่ได้มาเพื่อพิจารณาจัดความแตกต่างทางพันธุกรรม พร้อมทั้งเปรียบเทียบความหลากหลายทางพันธุกรรมของช้างในพื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูหลวง เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าดงใหญ่ และพื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูเขียวที่ดำเนินการศึกษาโดยสุชาติพิทย์ และคณะ (ติดต่อด่วนตัว)

ผลและวิจารณ์

การหาลำดับเบสเพื่อจัดกลุ่ม (haplotype) ของตัวอย่างมูลช้าง 114 ตัวอย่าง จาก 4 พื้นที่ คือ เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูวี่ว จำนวน 39 ตัวอย่าง เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูเขียว จำนวน 57 ตัวอย่าง เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูหลวง จำนวน 10 ตัวอย่าง และเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าดงใหญ่ จำนวน 8 ตัวอย่าง โดยวิเคราะห์ส่วนของ Cytochrome b 450 bp ที่เหลือ 250 bp หลังจากทำการตัดลำดับเบสส่วนต้นและท้ายที่ออกเพื่อให้ได้ขนาดของลำดับนิวคลีโอไทด์เท่ากับของปริดา และคณะ (2546) ใช้ primer คู่ที่ 1 CB0fw-CB2re ขนาดของ PCR product แสดงในภาพที่ 4 พบความแตกต่างของลำดับเบส 9 ตำแหน่ง สามารถแบ่งช้างได้ 3 haplotypes (HapA, HapB และ HapC) (ตารางที่ 6)

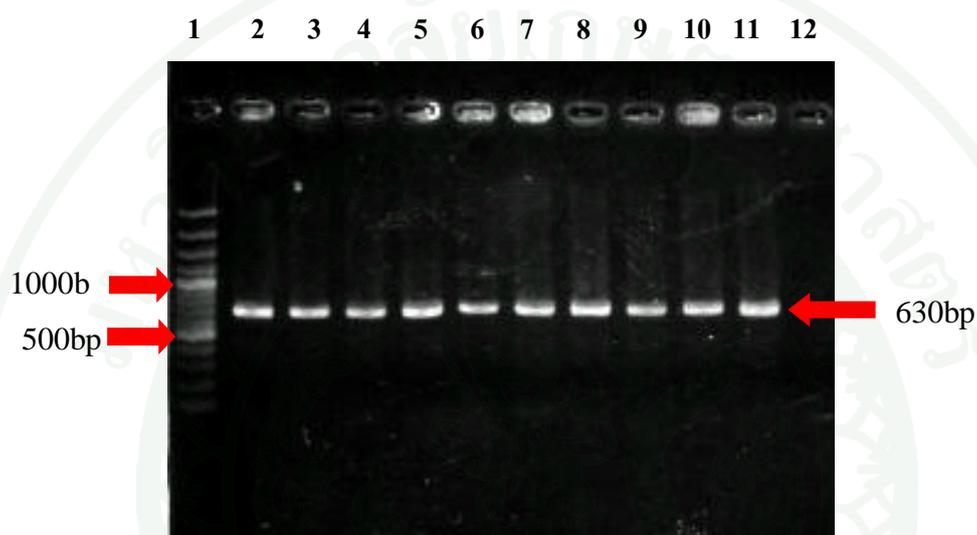


ภาพที่ 4 แสดง PCR product จากการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอด้วยวิธีการ PCR
 ช่องที่ 1 แสดงตำแหน่ง Marker
 ช่องที่ 2-11 แสดง PCR product ของ Primer CB0 กับ CB2
 ช่องที่ 12 แสดงตัวควบคุมที่ไม่เติม Template

ตารางที่ 6 แสดงตำแหน่งที่มีความแตกต่างกันของลำดับเบสของตัวอย่างมูลช้างทั้ง 4 พื้นที่ บริเวณ Cytochrome b (250 bp) โดยตัวเลขตำแหน่งด้านบนใช้เทียบกับลำดับเบสของช้างเอเชีย ที่รายงานใน GenBank (accession number NC_005129) ซึ่ง (.) หมายถึงลำดับเบสที่ เหมือนกับเบสด้านบน

Haplotype	Numerical position of nucleotide sequence									Number (n)
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	4	4	4	4	4	4	4	4	4	
	3	3	4	4	4	4	4	5	5	
	4	9	1	1	6	8	9	0	1	
	2	3	4	7	8	9	6	2	3	
A	T	A	T	C	C	T	C	T	T	81
B	.	G	C	T	T	C	T	C	C	25
C	C	G	C	T	C	C	T	C	C	8

และวิเคราะห์ส่วนปลาย Cytochrome b ถึงส่วนต้นของ control region 650 bp (601 bp เมื่อทำการตัดลำดับเบสส่วนต้นและท้ายที่อ่านได้ไม่ชัดเจนออก) ใช้ primer คู่ที่ 2 MDL5fw-MDL3re ขนาดของ PCR product แสดงในภาพที่ 5 พบความแตกต่างของลำดับเบส 27 ตำแหน่ง และสามารถจัดช่วงได้ 8 haplotypes คือ HapAH HapAB HapAD HapBQ HapBH HapBO HapNewA1 และ HapNewB (ตารางที่ 7)



ภาพที่ 5 แสดง PCR product จากการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอด้วยวิธีการ PCR
 ช่องที่ 1 แสดงตำแหน่ง Marker
 ช่องที่ 2-11 แสดง PCR product ของ Primer MDL5fw กับ MDL3re
 ช่องที่ 12 แสดงตัวควบคุมที่ไม่เติม Template

ตารางที่ 7 แสดงตำแหน่งที่มีความแตกต่างกันของลำดับเบสของตัวอย่างมูลช้าง 4 พื้นที่ บริเวณ ส่วนปลาย cytochrome b ถึงส่วนต้นของ control region (601 bp) โดยตัวเลขตำแหน่งด้านบนจะเทียบกับลำดับเบสของช้างเอเชียที่รายงานใน GenBank (accession number NC_005129) ซึ่ง (.) หมายถึง ลำดับเบสที่เหมือนกับเบสด้านบน

Numerical position of nucleotide sequence																									No.			
Hap.	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	No.			
	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5				
	1	1	1	2	3	3	3	4	5	5	5	5	5	5	5	5	6	6	6	6	6	6	6	7	7	7	No.	
	8	9	9	5	2	3	9	2	1	6	7	7	7	8	8	9	9	0	1	1	2	3	8	8	0	1	4	
	0	0	7	1	0	3	6	7	8	5	2	3	4	4	5	5	6	4	2	8	2	4	2	7	9	8	5	
AH	C	T	C	C	G	A	A	C	T	T	T	A	G	C	A	T	G	C	T	C	T	G	A	G	T	T	T	74
AB	C	C	5
AD	C	1
NewA1	G	1
BQ	T	C	.	T	.	G	G	T	.	C	.	A	.	.	C	C	T	.	T	C	.	C	1
BH	T	C	T	T	.	G	G	T	.	C	.	A	T	G	C	T	T	.	T	C	A	.	.	C	.	C	8	
BO	T	C	.	T	.	G	G	T	.	C	.	.	.	T	G	C	T	T	.	T	C	A	.	A	C	.	.	4
NewB	T	C	.	T	A	G	G	T	.	C	C	.	.	T	.	C	C	T	C	T	C	A	G	A	C	C	.	20

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้างป่าจากการศึกษาส่วนต้น Cytochrome b

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้างป่าในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูวัว

เมื่อนำลำดับเบสจากตัวอย่างข้างป่าในพื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูวัว ที่ได้จากการวิเคราะห์ในส่วนต้น Cytochrome b ไปเปรียบเทียบกับใน Genbank พบ 2 Haplotype ที่เหมือนกันกับที่ ปรีดา และคณะ (2546) ได้รายงานไว้ คือ HapA (n=18) HapB (n=21) ดังตารางที่ 8 และสอดคล้องกับที่ อุมพร (2550) ได้ศึกษาจากเลือดข้าง 11 เชือก แล้วพบว่าสามารถจัดข้างได้ 3 haplotypes (HapA HapB และ HapC) โดยส่วนมากเป็น HapA และ HapB ทั้งนี้ ปรีดา และคณะ (2546) ได้รายงานไว้ อีกว่า HapA และ HapB พบในประชากรข้างป่าไทยมากกว่ากลุ่มอื่นๆ

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้างป่าในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูวัว เปรียบเทียบกับความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้างป่าในพื้นที่อื่น

ตัวอย่างข้างป่าในพื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูเขียวพบ 2 haplotype คือ HapA (n=49) และ HapC (n=8) ตัวอย่างข้างป่าในพื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูหลวงพบ 2 haplotype คือ HapA (n=6) และ HapB (n=4) และตัวอย่างข้างป่าในพื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าดงใหญ่พบ 1 haplotype คือ HapA (n=8) ดังตารางที่ 8 รวมจากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในตัวอย่างมูลข้าง จาก 4 พื้นที่ รวมทั้งหมด 114 ตัวอย่าง ผลการศึกษาที่ได้พบ HapA 81 ตัวอย่าง HapB 25 ตัวอย่าง และ HapC 8 ตัวอย่าง ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับที่ ปรีดา และคณะ (2546) ได้รายงานไว้จากการศึกษาในเลือดข้างเลี้ยงพบว่า HapA และ HapB เป็นรูปแบบที่พบในประชากรข้างป่าไทยมากกว่ากลุ่มอื่นๆ นั้นแสดงว่าข้างป่า และข้างเลี้ยงมีความสัมพันธ์กันในเครือญาติ เช่นเดียวกับที่ อุมพร (2550) ได้ศึกษาจากเลือดข้าง 11 เชือก แล้วพบว่าสามารถจัดข้างได้ 3 haplotype (HapA HapB และ HapC) โดยส่วนมากเป็น HapA และ HapB ส่วน HapC พบได้น้อยที่สุด ซึ่งจากการศึกษานี้พบ HapC เฉพาะในพื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูเขียวและพบในจำนวนน้อย (n=8)

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของซ้างป่าจากการศึกษาส่วนปลาย Cytochrome b ถึงส่วนต้น control region

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของซ้างป่าในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูวัว

ตัวอย่างซ้างในพื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูวัว ที่ได้จากการวิเคราะห์ในส่วนปลาย Cytochrome b ถึงส่วนต้น control region ไปเปรียบเทียบกับใน Genbank ที่ Fernando *et al*, (2000, 2003a) ได้รายงานไว้พบ 3 haplotype โดยที่ HapAH (n=18) HapBQ (n=1) เป็น haplotype ที่เหมือนกันกับที่ Fernando *et al*, (2000, 2003a) ได้รายงานไว้ และ HapNewB (n=20) ดังตารางที่ 8 เป็น haplotype ที่พบใหม่ในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูวัวเท่านั้น ซึ่งไม่มีรายงานไว้ใน GenBank และจากการศึกษาถึงกำเนิดของซ้างเอเชียโดย Vidya *et al*. (2009) ได้รายงานว่าในประเทศสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาวพบ HapAB (n=2) HapAD (n=4) HapAE (n=7) และ HapBQ (n=1) พบได้น้อยที่สุด จาก 14 ตัวอย่าง ซึ่งสอดคล้องกันกับผลการศึกษาในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูวัว พบ HapBQ เพียง 1 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 39 ตัวอย่าง นั่นเป็นไปได้ว่าซ้างป่าจากเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูวัวได้มีความสัมพันธ์กับประเทศสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว จากการเคลื่อนย้ายไปมาระหว่างประเทศไทยกับประเทศสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว แต่ที่พบได้จำนวนน้อย อาจเป็นผลมาจากภัยธรรมชาติ โรคระบาด พื้นที่ตัดขาด หรือภัยคุกคามจากมนุษย์ที่มีการล่าเพื่อการค้า ทำให้ซ้าง HapBQ มีจำนวนประชากรที่มีการปรับตัวให้อยู่รอดน้อยลง และอีกกรณีเนื่องจากการเก็บตัวอย่างทั้งในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูวัว และประเทศสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาวยังไม่มีความครอบคลุมพื้นที่ จึงทำให้พบ HapBQ นี้ในจำนวนน้อย

จากการพบ HapNewB ซึ่งเป็น haplotype ใหม่ซึ่งไม่มีรายงานไว้ใน GenBank ที่พบรองลงมา n=20 และพบเฉพาะในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูวัวนั้นเป็นไปได้ว่าซ้างป่าในพื้นที่นี้มีพันธุกรรมทางสายแม่มาจากพื้นที่โดยรอบ หรือจากประเทศสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว เนื่องจากในอดีต 10-20 ปี ที่ผ่านมาซ้างในพื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูวัวได้มีการเคลื่อนย้ายไปมาระหว่างประเทศไทยกับประเทศสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว เพราะในช่วงเวลานั้นยังไม่มีสิ่งก่อสร้างที่เป็นการขวางกั้นการเคลื่อนย้ายของซ้าง และไม่มี การเคลื่อนย้ายพันธุกรรมนี้ไปยังพื้นที่อื่นในประเทศไทย นั่นเป็นเพราะว่าปัจจุบันพื้นที่ป่าในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูวัวถูกตัดขาดจากพื้นที่ป่าอื่น

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้างป่าในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูวัว เปรียบเทียบกับ ความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้างป่าในพื้นที่อื่น

ตัวอย่างข้างในพื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูเขียวพบ 3 haplotype คือ HapAH (n=44) HapNewA1 (n=1) และ HapBH (n=8) ตัวอย่างข้างในพื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูหลวงพบ 3 haplotype คือ HapAH (n=5) HapAB (n=1) และ HapBO (n=4) และตัวอย่างข้างในพื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าดงใหญ่พบ 2 haplotype คือ HapAH (n=7) และ HapAD (n=1) ดังตารางที่ 8 รวมจากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในตัวอย่างมูลข้าง จาก 4 พื้นที่ รวมทั้งหมด 114 ตัวอย่าง ผลการศึกษาที่ได้พบ 8 haplotype คือ HapAH 74 ตัวอย่าง HapAB 5 ตัวอย่าง HapAD 1 ตัวอย่าง HapNewA1 1 ตัวอย่าง HapBQ 1 ตัวอย่าง HapBO 4 ตัวอย่าง HapBH 8 ตัวอย่าง และ HapNewB 20 ตัวอย่าง ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับผลการศึกษาในส่วนต้น Cytochrome b ซึ่งจัดข้างได้ 3 haplotype พบว่า ผลการศึกษาในส่วนปลาย Cytochrome b ถึงต้น control region จัดข้างได้ 8 haplotype มีความหลากหลายทางพันธุกรรมมากกว่า ซึ่งสอดคล้องกับที่ Brown *et al.* (1979) ได้ศึกษาและพบว่า อัตราการกลายพันธุ์ของ control region มีค่ามากกว่าส่วนอื่นในไมโทคอนเดรียล ดีเอ็นเอ

เมื่อพิจารณาในแต่ละ haplotype พบว่า HapAH เป็น haplotype ที่พบมากที่สุด (n=74) และพบทั้ง 4 พื้นที่การศึกษา ทั้งพบในจำนวนมากในทุกพื้นที่การศึกษา ทำให้ทราบว่าข้างในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูวัว เคยมีการแลกเปลี่ยนพันธุกรรมจากป่าโดยรอบ และเป็นไปได้ว่า HapAH เป็นพันธุกรรมที่มีมานานในพื้นที่

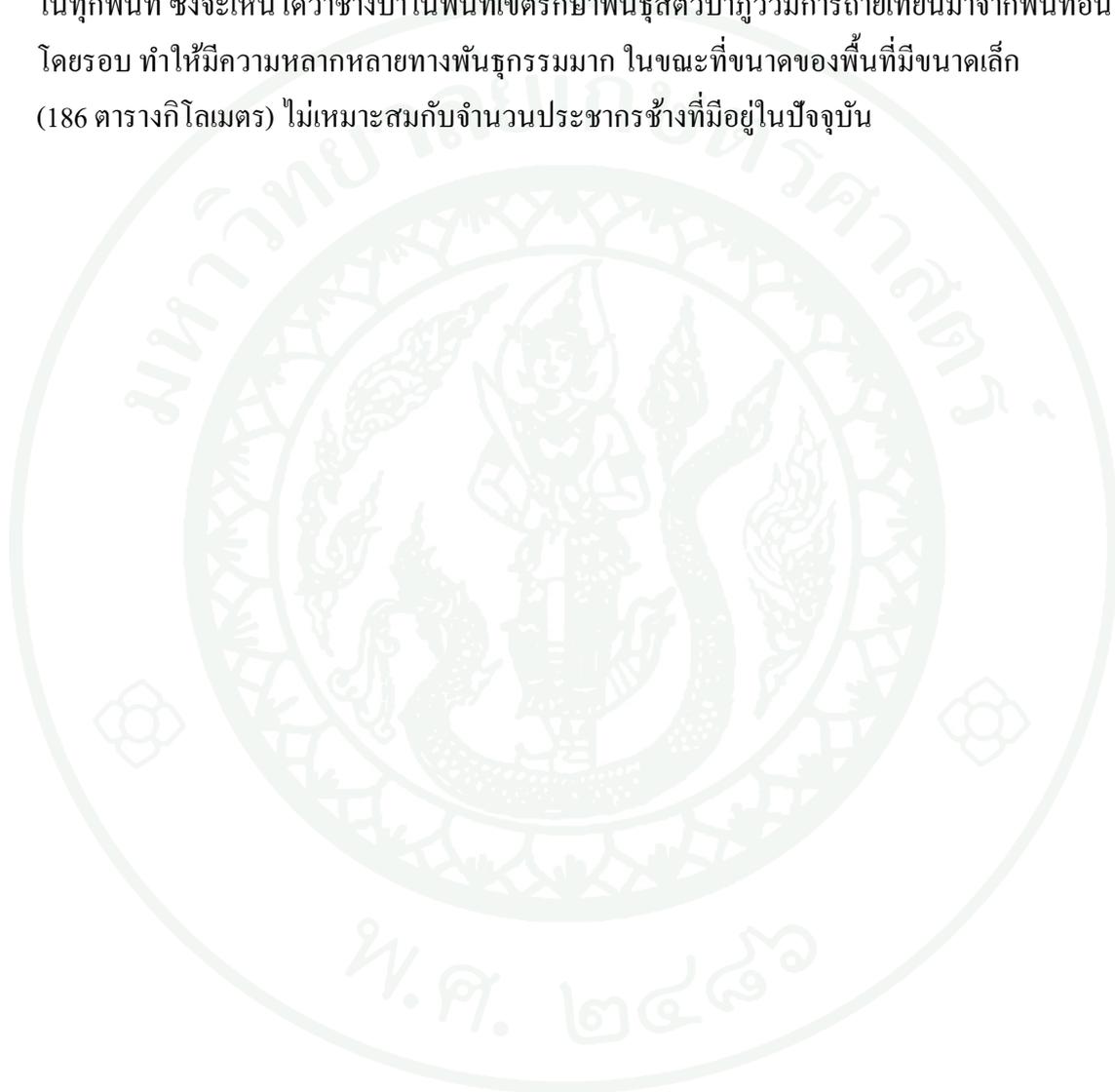
ตารางที่ 8 แสดง Haplotypes และจำนวนตัวอย่างที่พบในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูวัว เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าสัตว์ป่าภูเขียว เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูหลวง และเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าดงใหญ่

Haplotypes		Wildlife Sanctuary								
Cyt-B	D-loop	Phuwua		Phukhico		Phuluang		Dongyai		Total
		(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)	
A	AH	18	46.15	44	77.19	5	50	7	87.5	74
A	AB	0	0	4	7.02	1	10	0	0	5
A	AD	0	0	0	0	0	0	1	12.5	1
A	NewA1	0	0	1	1.75	0	0	0	0	1
B	BQ	1	2.56	0	0	0	0	0	0	1
B	BO	0	0	0	0	4	40	0	0	4
C	BH	0	0	8	14.04	0	0	0	0	8
B	NewB	20	51.28	0	0	0	0	0	0	20
Total (n)		39	100	57	100	10	100	8	100	114

ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

ชนิดและจำนวนของ haplotype ในแต่ละพื้นที่ นำมาคำนวณหาค่า Haplotype diversity (h) และลำดับเบสที่ได้จากตัวอย่างในทุกพื้นที่ทั้งหมด 114 ตัวอย่าง นำมาคำนวณหาค่า Nucleotide diversity (π) ดังตารางที่ 9 โดยเมื่อพิจารณาในค่า Haplotype diversity (h) ตัวอย่างในพื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูหลวงมีค่ามากที่สุด $h=0.644$ เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูวัวมีค่ารองลงมา $h=0.537$ ในขณะที่ทั้งสองพื้นที่นี้พบ 3 haplotype เท่ากัน นั่นเป็นเพราะว่าความถี่ของแต่ละ haplotype ของตัวอย่างในพื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูวัวมีความต่างกันมาก จึงทำให้ค่า Haplotype diversity ที่ได้มีค่าน้อยกว่า เมื่อพิจารณาจำนวน haplotype ในแต่ละพื้นที่พบว่า เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูเขียวมีจำนวนมากที่สุด คือ 4 haplotype แต่กลับมีค่า Haplotype diversity ($h=0.386$) น้อยกว่าเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูวัว นั่นเป็นเพราะความถี่ของแต่ละ haplotype ของตัวอย่างในพื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูเขียวนั้นมีความต่างกันมากเช่นกัน และตัวอย่างในพื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูวัว มีค่า Haplotype diversity น้อยที่สุด $h=0.250$

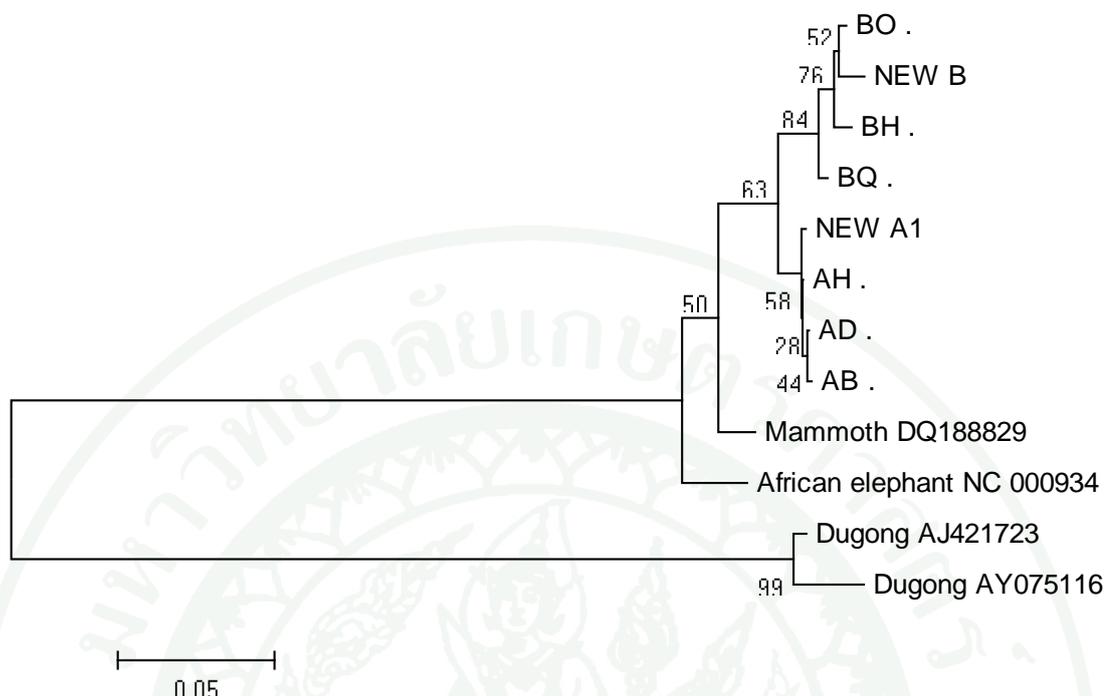
จากผลการคำนวณหาค่า Nucleotide diversity (π) กลับพบว่า ตัวอย่างในพื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูวัว มีค่า Nucleotide diversity ($\pi=0.0181$) มากกว่าตัวอย่างในพื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูหลวง ($\pi=0.0158$) นั่นหมายความว่า ตัวอย่างในพื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูวัว มีความหลากหลายของลำดับเบสมากกว่า หรือกล่าวได้ว่ามีความหลากหลายทางพันธุกรรมมากกว่า ในทุกพื้นที่ ซึ่งจะเห็นได้ว่าช้างป่าในพื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูวัวมีการถ่ายเทยีนมาจากพื้นที่อื่น โดยรอบ ทำให้มีความหลากหลายทางพันธุกรรมมาก ในขณะที่ขนาดของพื้นที่มีขนาดเล็ก (186 ตารางกิโลเมตร) ไม่เหมาะสมกับจำนวนประชากรช้างที่มีอยู่ในปัจจุบัน



ตารางที่ 9 แสดงค่าความถี่ของ Haplotype และค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของตัวอย่างมูลของช้างป่าในพื้นที่ศึกษา

Wildlife Sanctuary	Haplotype frequency								Sample size	Nucleotide diversity(π)	Haplotype diversity(h)
	AH	AB	AD	NewA1	BQ	BH	BO	NewB			
Phuwua	0.462				0.036			0.512	39	0.0181	0.537
Phukhio	0.772	0.070		0.018		0.140			57	0.0083	0.386
Phuluang	0.500	0.100					0.400		10	0.0158	0.644
Dongyai	0.875		0.125						8	0.0004	0.250

เมื่อนำลำดับเบสที่ได้จากการวิเคราะห์ส่วนปลาย Cytochrome b ถึงส่วนต้นของ control region เนื่องจากพบความหลากหลายทางพันธุกรรมมากกว่าไปวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมตามแผนภาพต้นไม้ (Phylogenetic tree) โดยใช้วิธี Neighbor-joining (NJ) และทำการทดสอบความน่าเชื่อถือของ tree ด้วย Bootstrap 1,000 รอบ เพื่อหาความสัมพันธ์ของสายวิวัฒนาการพันธุกรรม เปรียบเทียบกับลำดับเบสของช้างเอเชีย (ตัวอย่างมูลที่ศึกษา) เปรียบเทียบกับลำดับเบสของช้างแอฟริกา (accession number DQ188829) และช้างแอฟริกา (accession number NC_000934) ที่มีรายงานใน GenBank โดยใช้พะยูน (accession number AJ421723 และ AY075116) เป็นสัตว์นอกกลุ่ม (outgroup) ทำการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MEGA version 4.1 ดังภาพที่ 6 พบว่าช้างไทยซึ่งเป็นช้างเอเชีย (HapAH HapAB HapAD HapNewA1 HapBQ HapBH HapBO และ HapNewB) มีความใกล้ชิดกับช้างแอฟริกา มากกว่าช้างแอฟริกา เป็นไปตามการศึกษาของ อูมาพร (2550) Yang *et al.* (1996) Krause *et al.* (2006) และ Rogaev *et al.* (2006) ทั้งนี้จากแผนภูมิต้นไม้สามารถบอกได้ว่า HapNewB ที่พบในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูพานนั้นมีวิวัฒนาการต่อจาก HapBH (พบในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูเขียว) และมีวิวัฒนาการร่วมกันกับ HapBO (พบในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูหลวง) นั่นอาจเป็นไปได้อีกว่า HapNewB มีความผันแปรมาจากประชากรช้างในผืนป่าเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูเขียวและเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูหลวง และเมื่อทำการวิเคราะห์ความเหมือนกันระหว่าง Haplotype พบว่า Haplotype NewA1 ซึ่งพบในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูเขียว เช่นเดียวกับ สุรชาติพิทย์ และคณะ (ติดต่อส่วนตัว) มีความเหมือนกันกับ AH มากที่สุด คือ 0.998 และ NewB มีความเหมือนกันกับ BO มากที่สุด คือ 0.99 (ตารางที่ 10)



ภาพที่ 6 Phylogenetic tree ของลำดับเบสส่วนปลาย cytochrome b ถึงส่วนต้น ของ control region (601 bp) โดยใช้วิธี Neighbor-joining (NJ)

การทดสอบความน่าเชื่อถือของ tree ด้วย Bootstrap 1,000 รอบ เปรียบเทียบกับลำดับเบสของช้าง แมมมอท (accession number DQ188829) และช้างแอฟริกา (accession number NC_000934) ที่มีรายงานใน GenBank โดยใช้พะยูน (accession number AJ421723 และ AY075116) เป็นสัตว์นอกกลุ่ม (outgroup) โดยเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูวัว พบ HapAH HapBQ และ HapNewB เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูเขียว พบ HapAH HapAB HapBH HapNewA1 เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูหลวง พบ HapAH HapAB และ HapBO เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าดงใหญ่ พบ HapAH และ HapAD

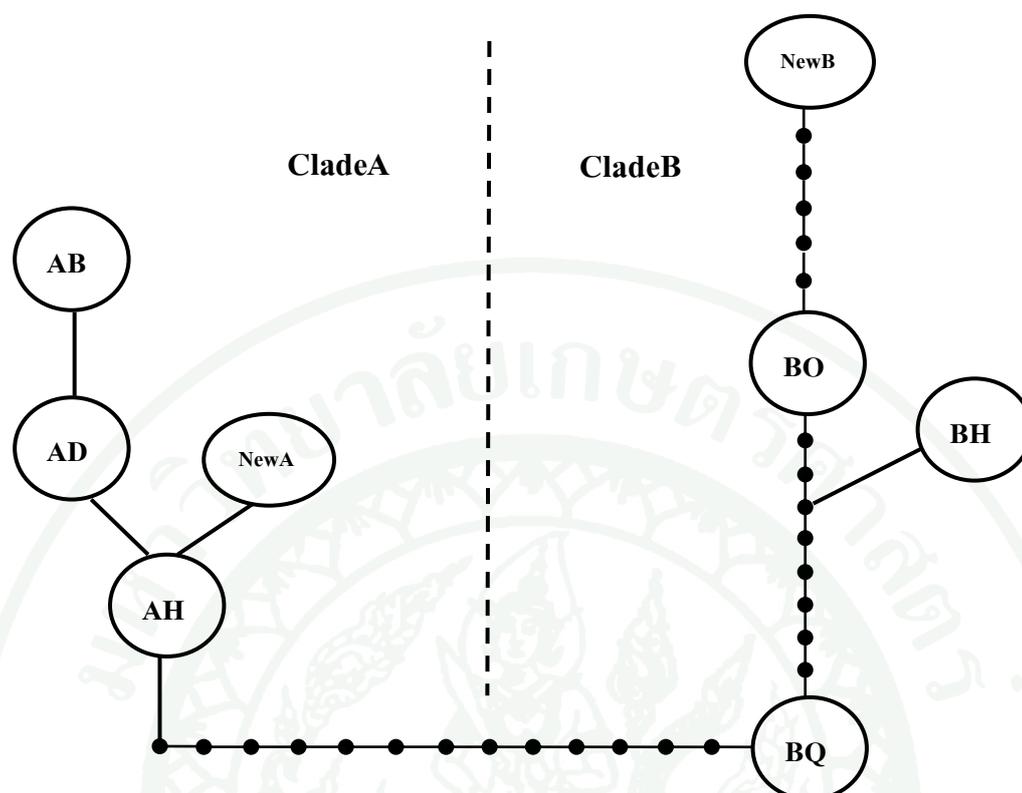
ตารางที่ 10 Sequence identity matrix วิเคราะห์ส่วนปลาย cytochrome b ถึงส่วนต้นของ control region (601 bp) ของ Haplotypes ที่พบใน เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูวัก เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าสัตว์ป่าภูเขียว เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูหลวง และเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าดงใหญ่

	AH	AD	AB	NewA1	BQ	BO	BH	NewB
AH	ID	0.998	0.996	0.998	0.976	0.971	0.968	0.965
AD		ID	0.998	0.996	0.975	0.97	0.966	0.963
AB			ID	0.995	0.973	0.968	0.965	0.965
NewA1				ID	0.975	0.97	0.966	0.963
BQ					ID	0.986	0.99	0.98
BO						ID	0.993	0.99
BH							ID	0.983
NewB								ID

โดยเมื่อนำผลที่ได้ทั้ง 2 ส่วน มาวิเคราะห์ร่วมกัน (ตารางที่ 11) สามารถจัดช่วงได้เป็น 2 กลุ่ม โดย HapA HapAH, HapAB HapAD และ HapNewA1 มีความใกล้เคียง Clade A และ HapB HapC HapBQ HapBH HapBO และ HapNewB มีความใกล้เคียง CladeB (ภาพที่ 7)

ตารางที่ 11 แสดงตำแหน่งที่มีความแตกต่างกันของลำดับเบสของตัวอย่างมูลช้าง 4 พื้นที่ บริเวณส่วนปลาย cytochrome b ถึงส่วนต้นของ control region (601 bp) และบริเวณ cytochrome b (250 bp) โดยตัวเลขตำแหน่งด้านบนจะเทียบกับลำดับเบสของช้างเอเชียที่รายงานใน GenBank (accession number NC_005129) ซึ่ง (.) หมายถึงลำดับเบสที่เหมือนกับเบสด้านบน

Numerical position of nucleotide sequence																													
Hap.	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	No.	CB0-CB2			
	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5					
	1	1	1	2	3	3	3	4	5	5	5	5	5	5	5	5	6	6	6	6	6	6	6	7	7	7			
	8	9	9	5	2	3	9	2	1	6	7	7	7	8	8	9	9	0	1	1	2	3	8	8	0	1	4		
	0	0	7	1	0	3	6	7	8	5	2	3	4	4	5	5	6	4	2	8	2	4	2	7	9	8	5		
AH	C	T	C	C	G	A	A	C	T	T	T	A	G	C	A	T	G	C	T	C	T	G	A	G	T	T	T	74	A
AB	C	C	5	A
AD	C	1	A
NewA1	G	1	A
BQ	T	C	.	T	.	G	G	T	.	C	.	.	A	.	.	C	C	T	.	T	C	.	C	1	B
BH	T	C	T	T	.	G	G	T	.	C	.	.	A	T	G	C	T	T	.	T	C	A	.	.	C	.	C	8	C
BO	T	C	.	T	.	G	G	T	.	C	.	.	.	T	G	C	T	T	.	T	C	A	.	A	C	.	.	4	B
NewB	T	C	.	T	A	G	G	T	.	C	C	.	.	T	.	C	C	T	C	T	C	A	G	A	C	C	.	20	B



ภาพที่ 7 เครือข่ายของกลุ่ม (haplotypes) ตัวอย่างมุลข้าง 4 พื้นที่ ในส่วนปลาย cytochrome b ถึงส่วนต้นของ control region

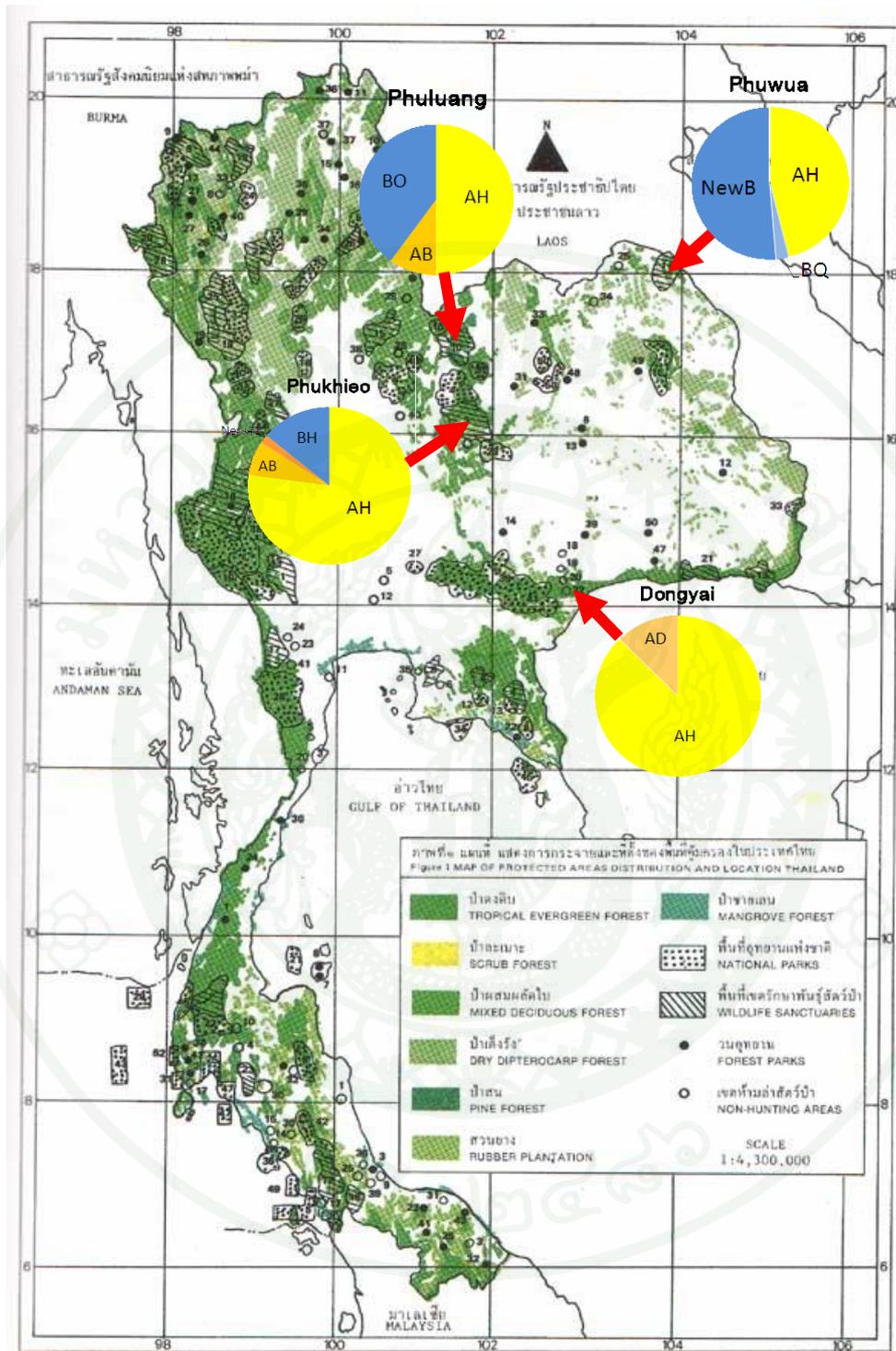
โดยเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูวัว พบ HapAH HapBQ HapNewB เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูเขียว พบ HapAH HapBH HapNewA1 เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูหลวง พบ HapAH HapAB HapBO เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าดงใหญ่ พบ HapAH และ HapAD

จากการนำตัวอย่างข้างทั้ง 8 haplotypes มาสร้างเป็นเครือข่าย (network) ของกลุ่มข้าง ดังแสดงในภาพที่ 7 พบว่า ข้างในกลุ่ม HapAB HapAD HapAH และ HapNewA1 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกันมากกว่าข้างในกลุ่มอื่นๆ และข้างในกลุ่ม HapNewB มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกันกับข้างในกลุ่ม HapBO โดยมีความแตกต่างกันของลำดับเบส 5 ตำแหน่ง ซึ่ง HapBO พบเฉพาะในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูหลวง เป็นไปได้ว่าข้างในกลุ่ม HapNewB ได้แยกกลุ่มออกมาโดยการเคลื่อนย้ายจากเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูหลวง ไปเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูวัว เนื่องจากเมื่อดูจากแผนที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูหลวงและเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูวัว มีแนวเขาที่เชื่อมต่อกันข้างสามารถเคลื่อนย้ายได้ ซึ่งจากการวิเคราะห์ให้ผลว่า HapAD เป็นบรรพบุรุษของ haplotypes อื่นในผลการศึกษา

เมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับเบสที่ได้จากการใช้ primer คู่ที่ 2 ส่วนปลาย cytochrome b ถึง ส่วนต้นของ control region (601 bp) กับการรายงานของ Fickel *et al.* (2007) ที่ได้ศึกษาความ หลากหลายของช้างเลี้ยงในประเทศไทย จากตัวอย่างเลือด จำนวน 78 ตัวอย่าง ใน 8 แห่ง ทำการศึกษาในส่วน of control region พบว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมเมื่อจำแนกจากความ แตกต่างของกลุ่มลำดับเบส สามารถแบ่งออกได้เป็น 20 haplotypes โดยมีลำดับเบสบางส่วนที่ เหมือนกันคือ HapAH เหมือนกับ HT02, HapAB เหมือนกับ HT04, HapAD เหมือนกับ HT03, HapBQ เหมือนกับ HT07, HapBH เหมือนกับ HT05 และ HapNewB เหมือนกับ HT06

จากผลการศึกษาที่ได้ พบ HapNewB เฉพาะในพื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูวัว ซึ่งมีลำดับ เบสเหมือนกับที่พบในช้างเลี้ยงจากแคมป์ช้างกาญจนบุรี มีชื่อว่า HapNewB2 (ข้อมูลส่วนตัว) นั้น เป็นไปได้ว่ามีการเคลื่อนย้ายช้างจากป่าภูวัวหรือจากประเทศสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชน ลาวโดยความยุ่งยากจากการที่มีการจับช้างป่ามาเลี้ยงในอดีต เพื่อการประกอบอาชีพ

ในการศึกษาตัวอย่างมูลช้างป่าจาก 4 พื้นที่ พบว่า เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูวัว พบ CladeB มากกว่า CladeA เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูเขียว พบ CladeA มากกว่า CladeB เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่า ภูหลวง พบ CladeA มากกว่า CladeB และเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าดงใหญ่ พบเฉพาะ CladeA (ตารางที่ 8 ตารางที่ 9 และภาพที่ 8) เช่นเดียวกับที่ Fleischer *et al.* (2001) และ Fernando *et al.* (2003) ที่ได้รายงานไว้ว่า CladeA และ CladeB พบได้ในทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือของไทย และ พบ CladeA มากขึ้นทางภาคตะวันออกไปจนถึงกัมพูชา ในการศึกษาเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่า ภูวัว เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูเขียว และเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูหลวง มีพื้นที่อยู่ทางภาค ตะวันออกเฉียงเหนือและพบทั้ง CladeA และ CladeB ส่วนเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าดงใหญ่ อยู่ใน พื้นที่จังหวัดบุรีรัมย์เป็นพื้นที่ที่ใกล้กับประเทศกัมพูชาจึงเป็นไปได้ที่ตัวอย่างจากพื้นที่นี้ พบเฉพาะ CladeA ส่วน CladeB พบมากขึ้นทางภาคใต้ของไทย จากผลการศึกษาของ สุรชาติพิทย์ และคณะ (2553) ที่รายงานว่าอุทยานแห่งชาติแก่งกระจาน และอุทยานแห่งชาติไทรโยค พบ CladeB มากกว่า CladeA และจะพบเฉพาะ CladeB ในประเทศมาเลเซียและอินโดนีเซีย (Fleischer *et al.* 2001; Fernando *et al.* 2003)



ภาพที่ 8 การแบ่งกลุ่ม Clade ของตัวอย่างมูลช้าง 4 พื้นที่ โดย สีเหลือง สีฟ้า คือ CladeA สีน้ำเงิน สีฟ้า คือ CladeB

ที่มา: นิวัตติ (2546)

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

1. ตัวอย่างมูลช้างในพื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูวัว จากการศึกษาลำดับยีน Cytochrome b จัดหาลำดับได้ HapA และ HapB และจากการศึกษาลำดับยีน Cytochrome b ถึงส่วนต้น control region จัดหาลำดับได้ HapAH HapBQ และ HapNewB

2. ลำดับเบสเพื่อจัดกลุ่ม (haplotype) ของตัวอย่างมูลช้าง 114 ตัวอย่าง จาก 4 พื้นที่ คือ เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูวัว จำนวน 39 ตัวอย่าง เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูเขียว จำนวน 57 ตัวอย่าง เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูหลวง จำนวน 10 ตัวอย่าง และเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าดงใหญ่ จำนวน 8 ตัวอย่าง primer คู่ที่ 1 CB0fw-CB2re วิเคราะห์ส่วนของ Cytochrome b สามารถจัดหาลำดับทั้งหมดได้ 3 haplotypes (HapA, HapB, HapC) พบความแตกต่างของลำดับเบส 9 ตำแหน่ง เฉพาะในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูวัว จัดหาลำดับได้ 2 haplotypes (HapA และ HapB) เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูเขียว จัดหาลำดับได้ 2 haplotypes (HapA และ HapC) เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูหลวง จัดหาลำดับได้ 2 haplotypes (HapA และ HapB) และเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าดงใหญ่ จัดหาลำดับได้ HapA เพียง haplotype เดียว

3. จากการวิเคราะห์ primer คู่ที่ 2 MDL5fw-MDL3re วิเคราะห์ส่วนปลาย Cytochrome b ถึงส่วนต้นของ control region สามารถจัดหาลำดับทั้งหมดได้ 8 haplotypes พบความแตกต่างของลำดับเบส 27 ตำแหน่ง ในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูวัว จัดหาลำดับได้ 3 haplotypes (HapAH, HapBQ และ HapNewB) เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูเขียว จัดหาลำดับได้ 3 haplotypes (HapAH, HapNewA1 และ HapBH) เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูหลวง จัดหาลำดับได้ 3 haplotypes (HapAH, HapAB และ HapBO) และเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าดงใหญ่ จัดหาลำดับได้ 2 haplotypes (HapAH และ HapAD)

4. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของช้างป่าในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูวัว มีค่า Haplotype diversity (h) เท่ากับ 0.537 ซึ่งมีค่าน้อยกว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของช้างป่าในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูหลวง ($h=0.644$) แต่มากกว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของช้างป่าในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูเขียว ($h=0.386$) และตัวอย่างมูลช้างในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าดงใหญ่ ($h=0.250$)

5. แบ่งลักษณะทางพันธุกรรมออกเป็น 2 กลุ่ม คือ Clade A และ Clade B

ข้อเสนอแนะ

1. จากผลการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม อาจไม่ครอบคลุมจำนวนทั้งหมดของพื้นที่แต่ละแห่ง จึงควรมีการศึกษาต่อไป
2. จัดทำเป็นฐานข้อมูลหลากหลายทางพันธุกรรม สำหรับพื้นที่อนุรักษ์ที่ยังมีช้างป่าอาศัยอยู่ โดยเก็บข้อมูลที่ไว้ที่กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพันธุ์พืช เพื่อเป็นข้อมูลในการจัดการประชากรและนำมาประกอบการพิจารณาจัดการพื้นที่ต่อไป
3. ควรมีการพัฒนาความรู้ เกี่ยวกับการควบคุมและเคลื่อนย้ายช้างป่า ในกรณีที่ต้องการปรับปรุงพันธุกรรม หรือกรณีเกิดปัญหาประชากรล้นเกินจนเกิดความขัดแย้ง
4. ในกรณีที่มีการนำช้างเลี้ยงไปปล่อยป่า หรือการเคลื่อนย้ายช้างป่าไปป่าแห่งอื่น ควรมีการตรวจลักษณะทางพันธุกรรม เพื่อเป็นข้อมูลในการติดตามความหลากหลายทางพันธุกรรมต่อไป
5. สร้างแนวเชื่อมต่อพื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูวัว กับพื้นที่อนุรักษ์ในประเทศลาว ซึ่งอยู่ฝั่งตรงข้าม เพื่อคงความหลากหลายทางพันธุกรรมของช้างในบริเวณนี้ไว้
6. ควรจัดการให้เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูหลวงเป็นพื้นที่สำหรับรักษาช้างป่าในระยะยาว โดยการสร้างเส้นทางเชื่อมต่อกับป่าอนุรักษ์ที่อยู่ข้างเคียง ได้แก่ เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูเขียว อุทยานแห่งชาติน้ำหนาว อุทยานแห่งชาติภูกระดึง เป็นต้น
7. สร้างแนวเชื่อมต่อพื้นที่อนุรักษ์เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าดงใหญ่กับป่าอนุรักษ์ที่อยู่ข้างเคียง ประกอบด้วย อุทยานแห่งชาติเขาใหญ่ อุทยานแห่งชาติทับลาน อุทยานแห่งชาติปางสีดา และ อุทยานแห่งชาติตาพระยา

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- กัลยาณี สวรรยาวิสุทธิ์. 2551. พันธุศาสตร์เชิงชีวเคมี, น. 82-123. ใน เดือนจิต คำพิทักษ์
บรรณาธิการ. ตำราพันธุศาสตร์ทางการแพทย์. ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.
- กฤษฎา ลังกา. 2545. คู่มือดูแลสุขภาพช้างเบื้องต้น. โรงพิมพ์นันทพันธ์, เชียงใหม่.
- กองทุนสัตว์ป่าโลก สำนักงานประเทศไทย. 2543. แผนปฏิบัติการเพื่อการอนุรักษ์ช้างป่าเอเชียใน
ประเทศไทย พ.ศ. 2542 - 2544. บริษัท สยามทองกิจ จำกัด, กรุงเทพมหานคร.
- จตุรงค์ พุทธพรทิพย์. 2541. DNA sequencing, น. 112-125. ใน นเรศวร สุขเจริญ, อภิวัฒน์
มุกทีรางกูร และ ยง ภูสุวรรณ, บรรณาธิการ. อนุรักษ์วิทยาทางการแพทย์. เท็ก แอนด์ เจอร์
นัลพับลิเคชั่น, กรุงเทพฯ.
- เจษฎา เด่นดวงบริพันธ์. 2545. ระบบวิวัฒนาการและวงศ์วานวิวัฒนาการ (systematics and phylogeny)
เปิดโลกทัศน์ใหม่ทางชีววิทยา. วารสารวิทยาศาสตร์ 56 (3): 168-175.
- นิภาพร ก้านทอง. 2539. สภาวะหลากหลายรูปแบบของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอในปลาตุ๊กตอย
วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- นิวัติ เรืองพานิช. 2546. การอนุรักษ์ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- ปราชินทร์ เครือทอง. 2546. เรื่องจากปก. ศิลปวัฒนธรรม 24 (10): 88-95.
- ปรีดา เลิศวัชรสารกุล, นิกร ทองทิพย์, สุปราณี บุญโนนแต่, วรวิทย์ วัชชวัลคุ,
สิทธิเดช มหาสาวังกุล, ทวีโชค อังควาณิช, และ ศรันย์ จันทร์สิทธิเวช. 2546.
ความหลากหลายของรหัสพันธุกรรมในส่วนยีน cytochrome b ของช้างไทย. วิทยาศาสตร์
กำแพงแสน 1 (1): 33-39.

พัชรีย์ เลิศฤทธิ. 2549. ตำราพันธุกรรมของยีนไมโทคอนเดรียในประเทศไทย ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล, กรุงเทพฯ.

รองลาภ สุขมาศรวง. 2536. นิเวศวิทยาของช้างป่า (*Elephas maximus* Linnaeus, 1758) ในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง จังหวัดอุทัยธานี และตาก วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

_____. 2546. นิเวศวิทยาของช้างป่าในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง. วารสารสัตว์ป่าเมืองไทย ปีที่ 11 ฉบับที่ 1. คณะวนศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ศรัณย์ ทองปาน. 2550. ช ช้าง กับ ค คน. สารคดี, กรุงเทพฯ.

ศุภกิจ วินิตพรสวรรค์. 2546. การประยุกต์ใช้ระบบสารสนเทศทางภูมิศาสตร์เพื่อวิเคราะห์การแพร่กระจายของช้างป่า (*Elephas maximus* Linnaeus, 1758) ในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูเขียว จังหวัดชัยภูมิ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุทธิลักษณ์ อำพันวงศ์. 2537. ช้างไทย. พิมพ์ครั้งที่ 2. สำนักพิมพ์มติชน, กรุงเทพฯ.

สุธาทิพย์ เดชชัยศรี, เสดมี ฟาน ลิข, ร็อกชาน รัตเทน, มงคล คำสุข, ชุตีอร ชาวินี, พันทิพา พัฒนแก้ว, ทองใบ เจริญคง, เพชร มโนปวิตร, นนท์ เขียวหวาน, ไชมอน เสดเจส, เบน คอเลนแบรนเดอร์, ทอม สเตาท์, ฮาน เลนสตรา, วรวิทย์ วัชวัลคุ, นริศ ภูมิภาคพันธ์, สิทธิวีร์ ทองทิพย์ศิริเดช, ฉัตรโชติ ธิตาราม, อนุชัย ภิญโญภูมิมินทร์, กาญจนา นิตยะ, อภิชา อยู่สมบูรณ์ และชุมพล แก้วเกตุ. 2552. ความหลากหลายทางพันธุกรรมในส่วนยีน **Cytochrome b** ของประชากรช้างป่า (*Elephas maximus*) ในอุทยานแห่งชาติแก่งกระจาน และเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูเขียว. (โปสเตอร์). ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร คณะสัตวแพทยศาสตร์ และ คณะวนศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช, สมาคมอนุรักษ์สัตว์ป่าประเทศไทย, คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุตรดิตถ์ ประเทศเนเธอร์แลนด์ และสมาคมอนุรักษ์สัตว์ป่า เอเชียโปรแกรม, ม.ป.ท.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545. **จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ: ปฏิบัติการอาร์เอฟดีและ เอเอฟแอลพี**. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

_____. 2552. **เครื่องหมายดีเอ็นเอ: จากพื้นฐานสู่การประยุกต์**. สำนักพิมพ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สุวัฒน์ อัสวไชยชาญ. 2550. **ช้างไทย**. ปลาตะเพียน, กรุงเทพฯ.

สำนักอนุรักษ์สัตว์ป่า. ม.ป.ป. **แผนแม่บทการอนุรักษ์ช้างแห่งชาติ ปี2546-2555**.
กลุ่มงานวิจัยสัตว์ป่า, กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพันธุ์พืช, กรุงเทพฯ.

อารีย์ ทองแก้ว. 2538. **ช้าง**. ภาควิชาประวัติศาสตร์ คณะวิชามนุษยศาสตร์และสังคมศาสตร์
สถาบันราชภัฏสุรินทร์, สุรินทร์.

อุมพร ใหม่แก้ว. 2550. **การศึกษาการจัดเรียงตัวของลำดับเบสและความหลากหลายทาง
พันธุกรรมของไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอในช้างไทย** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท,
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Ahlering, M. A., S. Hedges, A. Johnson, M. Tyson, S. G. Schuttler and L. S. Eggert. 2011.
Genetic diversity, social structure, and conservation value of the elephants of the
Nakai Plateau, Lao PDR, based on non-invasive sampling. **Conserv. Genet.** 12 (2): 413-
422.

Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts and J.D. Watson. 1983. The Biogenesis of
mitochondria and chloroplasts, pp. 528w544. **In Molecular Biology of The Cell**.
Garland Publishing, Inc., New York, USA.

Alcaide, M, L. Cadahía, S.A. Lambertucci and J.J. Negro. 2010. Noninvasive estimation of
minimum population sizes and variability of the major histocompatibility complex in the
Andean condor. **Condor** 112 (3): 470-478.

- Bradley, B.J., C. Boesch and L. Vigilant. 2000. Identification and redesign of human microsatellite markers for genotyping wild chimpanzee (*Pan troglodytes verus*) and gorilla (*Gorilla gorilla gorilla*) DNA from faeces. **Conserv. Genet.** 1: 289–292.
- Broderick, D., Y. Idaghdour, A. Korrida and J. Hellmich. 2003. Gene flow in great bustard populations across the Strait of Gibraltar as elucidated from excremental PCR and mtDNA sequencing. **Conserv. Genet.** 4: 793–800.
- Brown, W.M., J.R. George and A.C. Wilson. 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 76: 1967-1971.
- Clement, M., D. Posada, and K. A. Crandall. 2000. TCS: A computer program to estimate gene genealogies. **Mol. Ecol.** 9 (10): 1657–1659.
- Ernest, H.B., M.C.T. Penedo, B.P. May, M. Syvanen and W.M. Boyce. 2000. Molecular tracking of mountain lions in the Yosemite Valley region in California: genetic analysis using microsatellites and faecal DNA. **Mol. Ecol.** 9: 433–441.
- Fernando, P. and R. Lande. 2000. Molecular genetic and behavioral analysis of social organization in the Asian elephant (*Elephas maximus*). **Beh. Ecol. and Sociobiol.** 48: 84–91.
- _____, M.E. Pfrender, S.E. Encalada and R. Lande. 2000. Mitochondrial DNA variation, phylogeography and population structure of the Asian elephant. **Hered.** 84: 362-372.
- _____, T.N.C. Vidya, J. Pyne, M. Stuewe, G. Davison, R.J. Alfred, P. Andau, E. Bosi, A. Kilbourn and D.J. Melnick. 2003. DNA analysis indicates that Asian elephants are native to Borneo and are therefore a high priority for conservation. **Plos. Biol.** 1 (1): 110-115.

- Fickel, J., D. Lieckfeldt, P. Ratanakorn and C. Pitra. 2007. Distribution of haplotypes and microsatellite alleles among Asian elephants (*Elephas maximus*) in Thailand. **Eur. J. Wildl. Res.** 53:298-303.
- Fleischer, R.C., E.A. Perry, K. Muralidharan, E.E. Stevens and C.M. Wemmer. 2001. Phylogeography of the Asian elephant (*Elephas maximus*) based on mitochondrial DNA. **Evol.** 55 (9): 1882-1892.
- Frankham, R. 2005. Genetics and extinction. **Biol. Conserv.** 126: 131w140.
- Frantzen, M.A., J.B. Silk, J.W. Ferguson, R.K. Wayne and M.H. Kohn. 1998. Empirical evaluation of preservation methods for faecal DNA. **Mol. Ecol.** 7 (10): 1423-1428.
- Green, M.L., D.L. Herzog and J.D. Baldwin. 2007. Noninvasive methodology for the sampling and extraction of DNA from free-ranging Atlantic spotted dolphins (*Stenella frontalis*). **Mol. Ecol. N.** 7 (6): 1287-1292.
- Hall, T.A. 1999. BIOEDIT: a userfriendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symp. Ser.** 41: 95w98.
- Idaghdour, Y., D. Broderick and A. Korrida. 2003. Faeces as a source of DNA for molecular studies in a threatened population of great bustards. **Conserv. Genet.** 4: 789–792.
- Institute for Innovative Learning. 2011. **DNA.** Institute for Innovative Learning, Mahidol University. Available Source: <http://www.il.mahidol.ac.th/e-media/dna/chapter/chapter4application.htm>, February 10, 2011.

- Jensen-Seaman, M.I. and K.K. Kidd. 2001. Mitochondrial DNA variation and biogeography of eastern gorillas. **Mol. Ecol.** 10: 2241–2247.
- Kocher, T.D., W.K. Thomas, A. Meyer, S.V. Edwards, S. Paabo, F.X. Villablanca, and A.C. Wilson. 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers. **Proc.Natl.Acad.Sci.USA.** 86 : 6196-6200.
- Krause, J., P.H. Dear, J.L. Pollack, M. Slatkin, H. Spriggs, I. Barnes, A.M. Lister, I. Ebersberger, S. Paabo and M. Hofreiter. 2006. Multiplex amplification of the mammoth mitochondrial genome and evolution of Elephantidae. **Nature.** 439: 724-727.
- Lathuilliere, M., N. Menard, A. Gautier-Hion and B. Crouau-Roy. 2001. Testing the reliability of noninvasive genetic sampling by comparing analyses of blood and fecal samples in Barbary macaques (*Macaca sylvanus*). **Amer. Jour. of Primatol.** 55: 151–158.
- Leimgruber, P., J. B. Gagnon, C. M. Wemmer, D. S. Kelly, M. A. Songer, and E. R. Selig. 2003. Fragmentation of Asia's remaining wildlands: Implications for Asian elephant conservation. **Anim. Conserv.** 6 (4): 347-359.
- Lekagul, B. and J.A. McNeely. 1988. **Mammal of Thailand.** Kurusapha Ladprao, Bangkok.
- Melanie, A.M., L.P. Waits and K.C. Kendall. 2003. The influence of diet on faecal DNA amplification and sex identification in brown bears (*Ursus arctos*). **Mol. Ecol.** 12: 2261-2265.
- Morin, P.A., K.E. Chambers, C. Boesch and L. Vigilant. 2001. Quanti-tative polymerase chain reaction analysis of DNA from noninvasive samples for accurate microsatellite genotyping of wild chimpanzees (*Pan troglodytes verus*). **Mol. Ecol.** 10: 1835–1844.

- Nei, M. 1987. **Molecular evolutionary genetics**. Columbia University Press, New York.
- Noro, M., R. Masuda, I.A. Dubrovo, M.C. Yoshida and M. Kato. 1998. Molecular phylogenetic inference of the Woolly mammoth *Mammuthus primigenius*, based on complete sequences of mitochondrial cytochrome b and 12S ribosomal RNA genes. **J. Mol. Evol.** 46: 314-326.
- Okello, J.B.A., G. Wittemyer and H.B. Rasmussen. 2005. Noninvasive genotyping and Mendelian analysis of microsatellites in African savannah elephants. **Jour. of Hered.** 96: 679–687.
- Palomares, F., J.A. Godoy, A. Piriz, S.J. O'Brien and W.E. Johnson. 2002. Faecal genetic analysis to determine the presence and distribution of elusive carnivores: design and feasibility for the Iberian lynx. **Mol. Ecol.** 11: 2171–2182.
- Parr, J.W.K. 2003. **A guide to the large mammals of Thailand**. Sarakadee press, Thailand.
- Paxinos, E., C. McIntosh, K. Ralls and R. Fleischer. 1997. A noninvasive method for distinguishing among canid species: amplification and enzyme restriction of DNA from dung. **Mol. Ecol.** 6:483–486.
- Roca, A. L., N. Georgiadis, J. Pecon-Slattery and S.J. O'Brien. 2001. Genetic Evidence for Two Species of Elephant in Africa. **Sci.** 293 (5534): 1473-1477.
- Roca, A. L. and S.J. O'Brien. 2005. Genomic inferences from Afrotheria and the evolution of elephants. **Current Opinion in Gene. & Devel.** 15 (6): 652-659.
- Rogaev, E.I., Y.K. Moliaka, B.A. Malyarchuk, F.A. Kondrashov, M.V. Derenko, I. Chumakov and A.P. Grigorenko. 2006. Complete mitochondrial genome and phylogeny of Pleistocene Mammoth *Mammuthus primigenius*. **Plos. biol.** 4 (3): 403-410.

- Roques, S., B. Adrados, C. Chavez, C. Keller, W.E. Magnusson, F. Palomares and J. A. Godoy. 2011. Identification of Neotropical felid faeces using RCP-PCR. **Mol. Ecol. Res.** 11 (1): 171-175.
- Shenglin, Y. 2007. **Genetic diversity of Thai indigenous pigs, wild boars and Chinese qianbei black pigs based on microsatellite DNA and sequence polymorphism of mitochondria DNA cytochrome b gene.** Ph.D. Thesis, Suranaree University of Technology.
- Spinage, C.A. 1997. **Elephant.** Academic Press, London.
- Sripiboon, S., C. Thitaram, S. Dejchaisri and M. Waters. 2010. An Evaluation of the Efficiency of Fecal DNA Extraction Methods in Asian Elephants (*Elephas maximus*), pp. 59-62 In C. Thitaram, ed. **Proceedings of EU Asia-Link Project Symposium “Health and Reproduction of Asian Elephants”.** 31st May – 2nd June, 2010. Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand.
- Sukumar, R. 2003. **The Living Elephants Evolutionary Ecology, Behavior and Conservation.** Oxford University Press, Oxford.
- Taberlet, P., J.J. Camarra and S. Griffin. 1997. Noninvasive genetic tracking of the endangered Pyrenean brown bear population. **Mol. Ecol.** 6: 869–876.
- Taberlet, P. and G. Luikart. 1999. Non-invasive genetic sampling and individual identification. **Biol. J. of the Lin. Soc.** 68 (1-2): 41-55.
- Tajima, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. **Genet.** 123 (3): 585-595.
- Taylor, B. 2008. **Nature Watch: Elephants.** Lorenz Books, London.

Vidya, T.N.C., R. Sukumar and D.J. Melnick. 2009. Range-wide mtDNA phylogeography yields insights into the origins of Asian elephants. **Proc. R. Soc.** 276 (1658): 893-902.

Waits, L.P., D. Paetkau. (2005) Non-invasive genetic sampling tools for wildlife biologists: a review of applications and recommendations for accurate data collection. *Journal of Wildl. Manage.* 69 (4): 1419–1433.

Wasser, S.K., C.S. Houston, G.M. Koehler, G.G. Cadd and S.R. Fain. 1997. Techniques for application of faecal DNA methods to field studies of Ursids. **Mol. Ecol.** 6: 1091–1097.

Yang, H., E.M. Golenberg and J. Shoshani. 1996. Phylogenetic resolution within the Elephantidae using fossil DNA sequence from the American mastodon (*Mammot americanum*) as an outgroup. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 93: 1190-1194.

Zhang, Y.P., X.X. Wang, O.A. Ryder, H.P. Li, H.M. Zhang, Y. Yong and P.Y. Wang. 2002. Genetic diversity and conservation of endangered animal species. **Pure Appl. Chem.** 74 (4): 575-584.





ตารางผนวกที่ ก1 แสดงส่วนประกอบสารเคมีที่ใช้ในการศึกษา

	Contains	Volume
1. สารเคมีในการทำน้ำยารักษาสภาพ	- DMSO	200 ml
มูล DETs Buffer (Frantzen <i>et al.</i> , 1998)	- EDTA	500 ml
	- Tris pH 7.5	100 ml
	- อิมิตัวด้วยsalt solution: NaCl	
	- เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1000 ml	
2. สารเคมีในการทำ Agarose gel Electrophoresis		
2.1 50X TA buffer	- Tris base	121g
	- Glacial acetic acid	28.55 ml
	- ปรับ pH เป็น 8.0 ด้วย NaOH	
	- เติมน้ำกลั่นให้ครบ 500 ml, autoclave	
2.2 1.5% agarose	- Agarose	1.5g
	- 1X TA	100 ml
2.3 Loading dye	- 25% Bromphenol blue	
	- 30% glycerol	

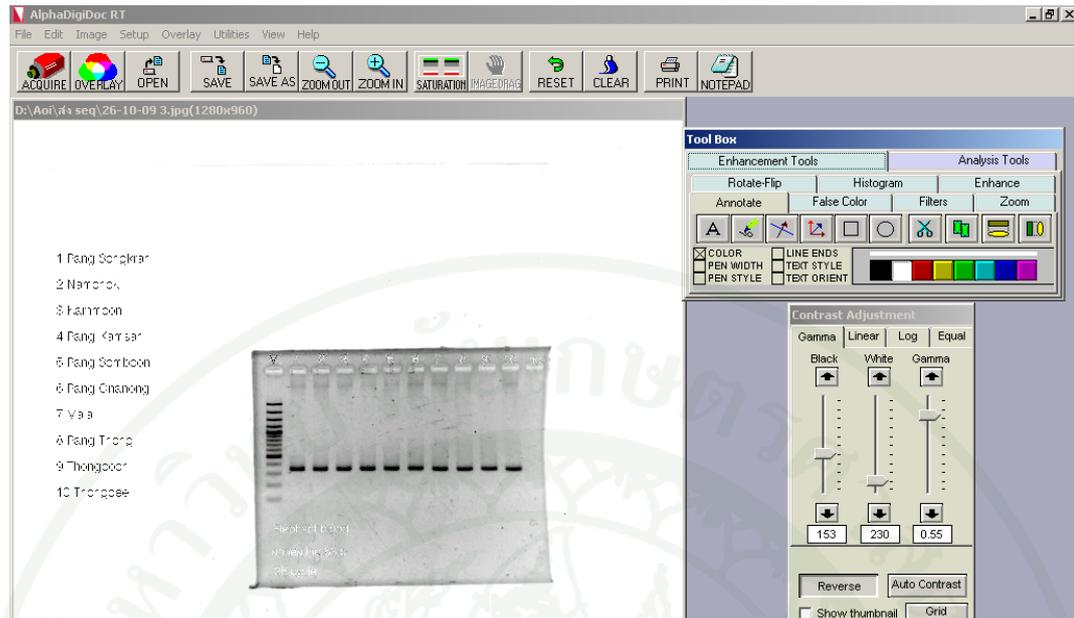


ภาคผนวก ข
สัญลักษณ์ที่ใช้แทนลำดับเบสและกรดอะมิโน

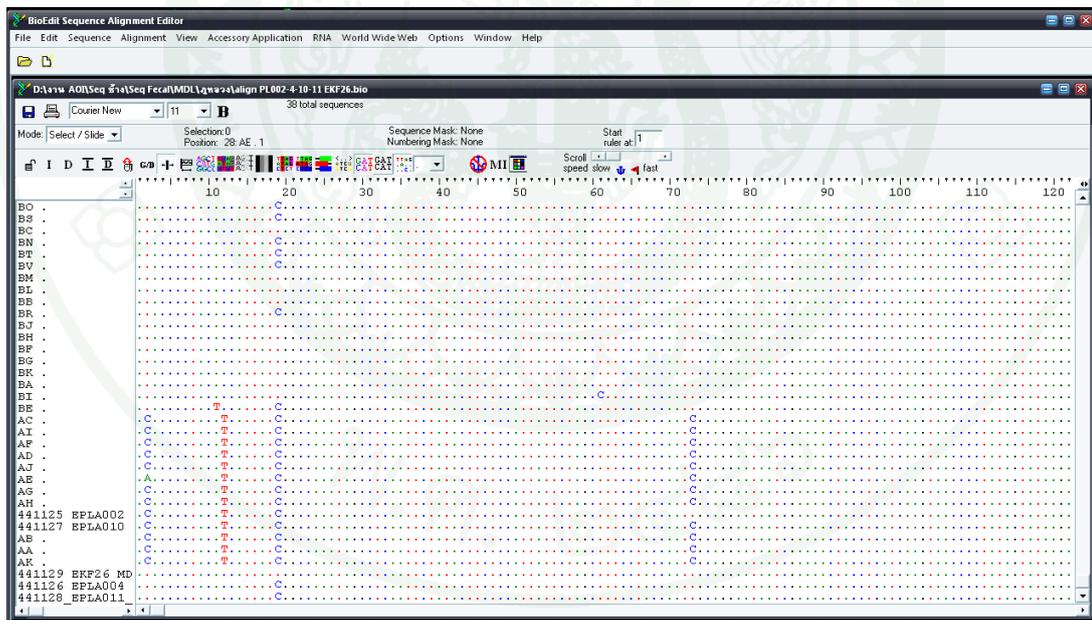
ตารางผนวกที่ ข1 แสดงสัญลักษณ์ที่ใช้แทนลำดับเบส

สัญลักษณ์	เบส
A	Adenine (A)
C	Cytocine (C)
G	Guanine (G)
T	Thymine (T)
M	A หรือ C
R	A หรือ G
W	A หรือ T
S	C หรือ G
Y	C หรือ T
K	G หรือ T
V	A หรือ C หรือ G
H	A หรือ C หรือ T
D	A หรือ G หรือ T
B	C หรือ G หรือ T
X/N	A หรือ C หรือ G หรือ T
*	ไม่ใช่ A, C, G, T

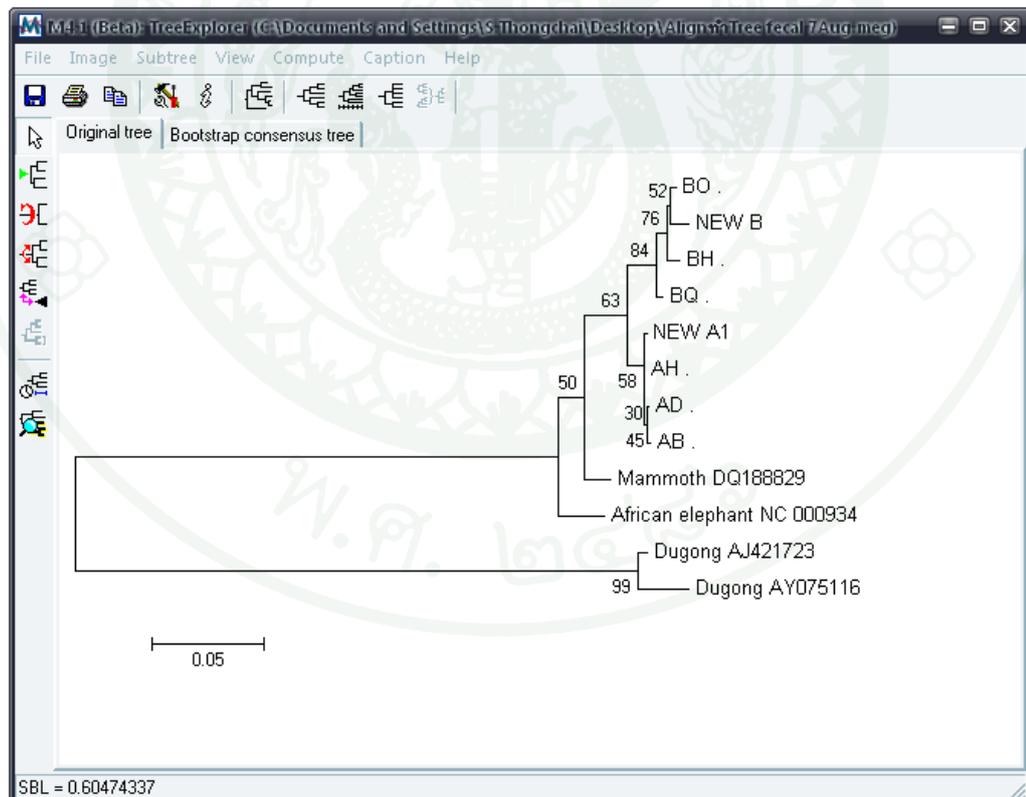
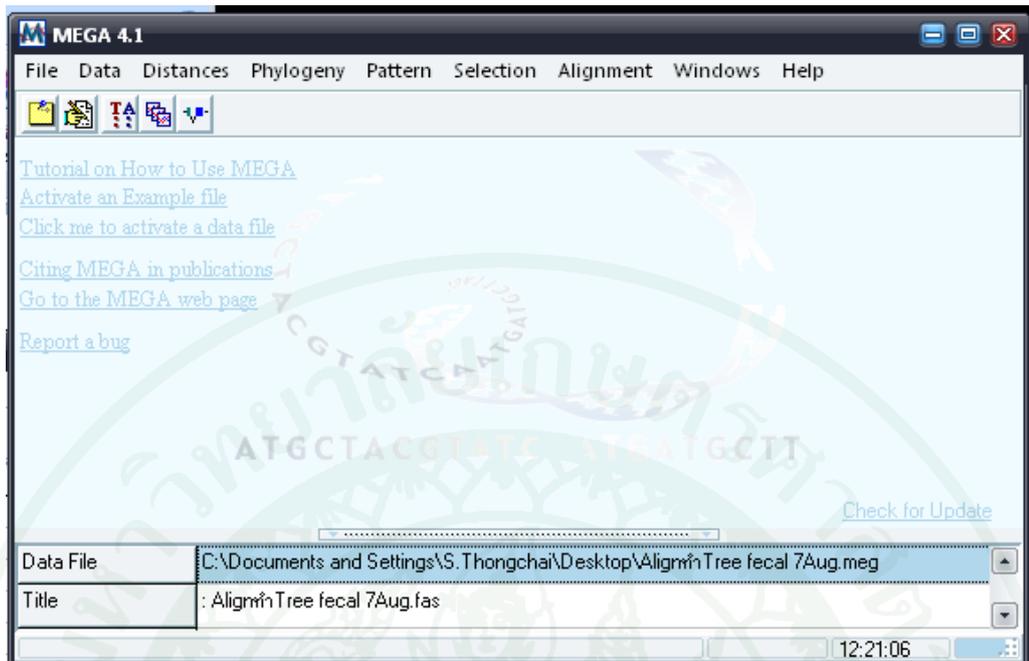




ภาพผนวกที่ ค1 โปรแกรมสำหรับถ่ายภาพแผ่นเจล AlphaDigiDoc RT

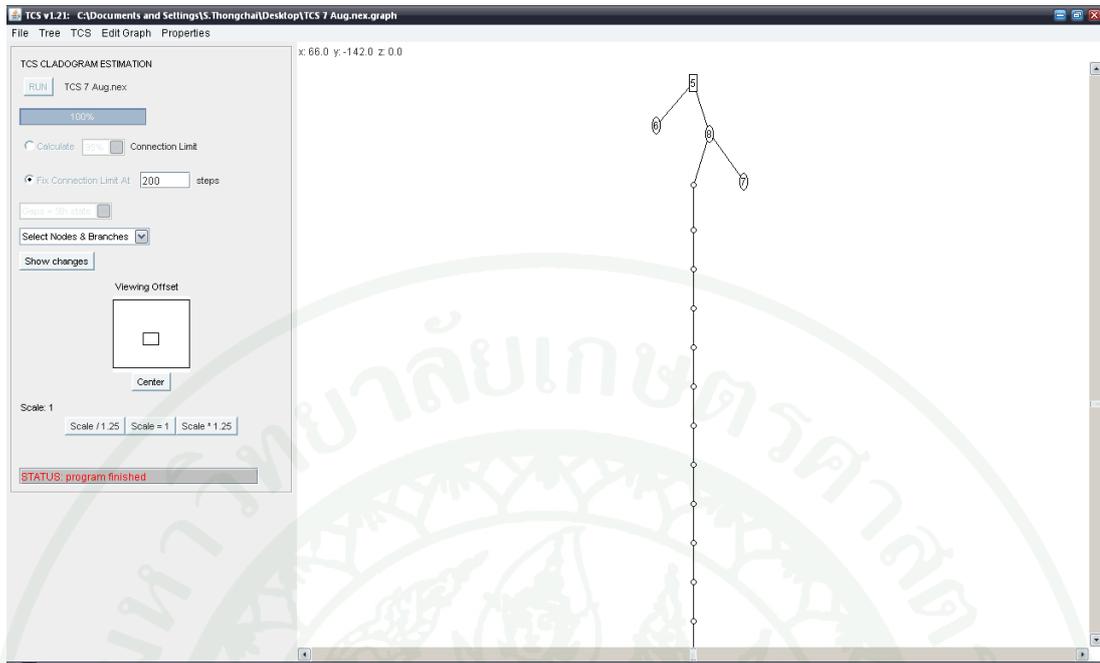


ภาพผนวกที่ ค2 โปรแกรมสำหรับวิเคราะห์ลำดับเบส BioEdit Sequence Alignment Editor



ภาพผนวกที่ ๑๓ โปรแกรมสำหรับสร้างแผนภูมิต้นไม้พันธุกรรม (phylogenetic tree)

MEGA version 4.1



ภาพผนวกที่ ๓4 โปรแกรมสำหรับสร้างเครือข่ายพันธุกรรม (network) TCS version 1.21



ภาคผนวก ง
ข้อมูลตัวอย่างมูลช่าง

ตารางผนวกที่ 1 ข้อมูลตัวอย่างมูลช้างเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูวัว

ลำดับ	ชื่อตัวอย่าง	พิกัดทางภูมิศาสตร์		ขนาดกองมูล (cm)			Haplotypes	
		X	Y	F1	F2	F3	CR	CB0-CB2
1	EPWA001			40.0	44.7	39.5	AH	A
2	EPWA002			36.0	31.8	33.0	AH	A
3	EPWA003			0.0	0.0	0.0	AH	A
4	EPWA004			39.6	38.1	38.5	New B	B
5	EPWA005			39.2	41.0	42.0	New B	B
6	EPWA006			31.0	38.0	32.6	AH	A
7	EPWA007			53.2	51.2	0.0	New B	B
8	EPWA008			42.3	43.3	41.8	New B	B
9	EPWA009			43.0	0.0	0.0	New B	B
10	EPWB001	0392240	2005404	45.5	0.0	0.0	New B	B
11	EPWB002	0392240	2005404	44.1	39.3	36.1	AH	A
12	EPWB003	0392240	2005404	37.0	0.0	0.0	AH	A
13	EPWB004	0392240	2005404	49.0	40.6	42.5	New B	B
14	EPWB005	0392240	2005404	32.0	30.6	29.5	AH	A
15	EPWB006	0392240	2005404	34.3	34.0	34.3	AH	A
16	EPWB007	0392240	2005404	36.1	38.5	34.8	New B	B
17	EPWB008	0392240	2005404	45.2	49.4	46.1	AH	A
18	EPWB009	0392240	2005404	48.6	44.8	45.2	New B	B
19	EPWB010	0392240	2005404	34.0	30.3	0.0	New B	B
20	EPWB011	0392240	2005404	38.0	0.0	0.0	New B	B
21	EPWB012	0392240	2005404	32.4	34.7	35.9	AH	A
22	EPWB013	0392240	2005404	33.5	31.8	32.1	AH	A
23	EPWB014	0392240	2005404	36.1	41.0	38.7	New B	B
24	EPWB015	0392240	2005404	36.4	38.8	36.0	New B	B

ตารางผนวกที่ ง1 (ต่อ)

ลำดับ	ชื่อตัวอย่าง	พิกัดทางภูมิศาสตร์		ขนาดกองมูล (cm)			Haplotypes	
		X	Y	F1	F2	F3	CR	CB0-CB2
25	EPWB016	0392240	2005404	40.7	35.9	35.8	New B	B
26	EPWB017	0392240	2005404	36.5	36.3	36.9	New B	B
27	EPWB018	0392240	2005404	44.6	47.0	44.5	New B	B
28	EPWB019	0392240	2005404	35.0	33.4	35.5	AH	A
29	EPWC001	0397545	2005499	44.5	46.7	49.0	New B	B
30	EPWC002	0392269	2005325	46.0	51.0	47.0	AH	A
31	EPWC003	0392353	2005175	39.0	43.0	34.0	AH	A
32	EPWC004	0392281	2005114				AH	A
33	EPWC006	0392325	2005124				New B	B
34	EPWD001						New B	B
35	EPWD002						BQ	B
36	EPWD003						AH	A
37	EPWD004						New B	B
38	EPWD005						AH	A
39	EPWD006						AH	A

ตารางผนวกที่ ๒ ข้อมูลตัวอย่างมูลช้างเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูหลวง

ลำดับ	ชื่อตัวอย่าง	พิกัดทางภูมิศาสตร์		ขนาดกองมูล (cm)			Haplotypes	
		X	Y	F1	F2	F3	CR	CB0-CB2
1	EPLA001	0766713	1918191	56.0	60.0	51.0	BO	B
2	EPLA002	0766530	1917614	44.0			AH	A
3	EPLA003	0766536	1917594	61.0	59.0	64.5	BO	B
4	EPLA004	0766809	1917593	63.0	72.0	56.0	BO	B
5	EPLA005	0775298	1897988	36.5	37.0	38.5	AH	A
6	EPLA006	0775301	1897986	35.0	36.0	35.5	AH	A
7	EPLA007	0775301	1897986	21.0	19.5	19.0	AH	A
8	EPLA008	0775355	1900231	41.0	39.0	40.0		
9	EPLA009	0775377	1900229	46.5	50.5	44.0	AH	A
10	EPLA010	0775883	1900899	54.0	61.0	57.0	AB	A
11	EPLA011	0766892	1918711	58.5			BO	B

ตารางผนวกที่ ๓ ข้อมูลตัวอย่างมูลช้างเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าดงใหญ่

ลำดับ	ชื่อตัวอย่าง	พิกัดทางภูมิศาสตร์		ขนาดกองมูล (cm)			Haplotypes	
		X	Y	F1	F2	F3	CR	CB0-CB2
1	EDYA001	0238634	1571383	44.0	43.0	42.0	AH	A
2	EDYA002	0238675	1571333	48.0	49.0		AD	A
3	EDYA003	0238675	1571333	33.0	32.0		AH	A
4	EDYA004	0238689	1571330	45.0			AH	A
5	EDYA005	0238629	1571274	48.0			AH	A
6	EDYA006	0238615	1571325	37.0			AH	A
7	EDYA007	0238659	1571352	31.0			AH	A
8	EDYA008	0238677	1571396	54.0			AH	A

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นางสาวสุนันทา ทองไชย
วัน เดือน ปี ที่เกิด	27 เมษายน 2528
สถานที่เกิด	อำเภอปะทิว จังหวัดชุมพร
ประวัติการศึกษา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (ชีววิทยา) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา เพื่อการตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ ปีงบประมาณ 2552