ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)

ปริญญา

เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร | โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา

สาขา | **ภาควิชา**

เรื่อง ความหลากหลายทางพันธุกรรมบนโครโมโซมวายในละมั่งชนิดย่อยไทย (*Cervus eldii siamensis*) และละมั่งชนิดย่อยพม่า (*Cervus eldii thamin*)

Genetic Diversity of Y Chromosome in Siamese Eld's deer (*Cervus eldii siamensis*) and Burmese Eld's deer (*Cervus eldii thamin*)

นามผู้วิจัย นายมานะกร สุขมาก

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก .....

(รองศาสตราจารย์วรวิทย์ วัชชวัลคุ, D.M.S.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....

(อาจารย์สิทธวีร์ ทองทิพย์ศิริเดช, Ph.D.)

ประธานสาขาวิชา .....

(รองศาสตราจารย์พงศ์เทพ อัครธนกุล, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

.....

(รองศาสตราจารย์กัญจนา ธีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ ..... **เดือน** ..... **พ.ศ.** .....

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

ความหลากหลายทางพันธุกรรมบนโครโมโซมวายในละมั่งชนิดย่อยไทย (*Cervus eldii siamensis*) และละมั่งชนิดย่อยพม่า (*Cervus eldii thamin*)

Genetic Diversity of Y Chromosome in Siamese Eld's deer (*Cervus eldii siamensis*) and Burmese Eld's deer (*Cervus eldii thamin*)

โดย

นายมานะกร สุขมาก

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)
พ.ศ. 2553

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

มานะกร สุขมาก 2553: ความหลากหลายทางพันธุกรรมบนโครโมโซมวายในละมั่งชนิดย่อยไทย (*Cervus eldii siamensis*) และละมั่งชนิดย่อยพม่า (*Cervus eldii thamin*) ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร) สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์วรวิทย์ วัชชวัลคุ, D.M.S. 73 หน้า

โครโมโซมวาย (Y chromosome) ถูกนำมาใช้ในการศึกษาข้อมูลทางพันธุกรรมในสายพ่อ (paternal linage) โดยใช้ในด้านพันธุศาสตร์ประชากร (population genetic) ความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) การศึกษาถึงลำดับวิวัฒนาการ (phylogenetic study) การจำแนกการเกิดสายพันธุ์สัตว์ลูกผสม (hybridization identification) และการจำแนกเพศ (sex identification) โดยมีการศึกษาอย่างแพร่หลายใน คน วัว ลิง และ สัตว์ชนิดอื่นๆ อย่างไรก็ตามสำหรับละมั่งซึ่งเป็นสัตว์ป่าสงวนของเมืองไทยยังไม่มีการมีการศึกษาในโครโมโซมนี้ ดังนั้นเราจึงทำการศึกษาโครโมโซมเพศวายในละมั่งชนิดย่อยไทยและพม่า เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมบนโครโมโซมวาย และเพื่อพัฒนาไพรเมอร์ที่ใช้ในการจำแนกเพศของละมั่งจากกองมูลด้วยวิธี PCR โดยทำการศึกษาในยีน DBY (508 bp), ยีน ZFY (1,945 bp) และ ยีน SRY (2,697 bp) ซึ่งทั้งหมดเป็นยีนที่อยู่บนโครโมโซมวาย และใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการศึกษานี้มาออกแบบไพรเมอร์เพื่อใช้ในการจำแนกเพศ จากการศึกษานี้ ไม่พบความแตกต่างระหว่างโครโมโซมเพศวายภายในกลุ่มของประชากรละมั่งชนิดย่อยเดียวกัน แต่พบความแตกต่างระหว่างละมั่งชนิดย่อยทั้งสองชนิด และไพรเมอร์ที่ออกแบบใหม่ในการศึกษานี้ประสบความสำเร็จในการจำแนกเพศจากกองมูลได้ โดยสรุปแล้วจากการศึกษานี้พบว่า ละมั่งชนิดย่อยไทยและพม่ามีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน และสามารถใช้ความแตกต่างบนโครโมโซมวายในติดตามการเกิดละมั่งลูกผสม รวมทั้งสามารถใช้ไพรเมอร์ที่ได้จากการศึกษานี้ศึกษาอัตราส่วนทางเพศในประชากรละมั่งที่ฟื้นฟูสู่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าในประเทศไทย

_____ _____ ___ / ___ / ___

ลายมือชื่อนิสิต ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Manakorn Sukmak 2010: Genetic Diversity of Y Chromosome in Siamese Eld's deer (*Cervus eldii siamensis*) and Burmese Eld's deer (*Cervus eldii thamin*). Master of Science (Agricultural Biotechnology), Major Field: Agricultural Biotechnology, Interdisciplinary Graduate Program. Thesis Advisor: Associate Professor Worawidh Wajjwalku, D.M.S. 73 pages.

Y chromosomal marker has been used as a molecular tool in population genetic such as genetic diversity study, phylogenetic, hybrid identification and sex identification. The application has been successful in many species for instance human, bovine, non-human primate and so forth. According to Wildlife Preservation and Protection Act, B.E.2535 (1992) of Thailand, Eld's deer has been declared as one of the preserved wildlife animal, still lack of Y chromosomal information especially for Y specific polymorphic markers. Our objectives were to develop new male-specific polymorphic marker in the Eld's deer by screening Y chromosome conserved anchored tagged sequences primers in Burmese and Siamese Eld's deer in Thailand. We screened two introns of DBY gene (508 bp in length), three introns of ZFY gene (1,945 bp) and also SRY gene (2,697 bp). We also developed the new two sets of primer for sex identification in fecal sample by using sequence from this study. There was no variation within both Burmese Eld's deer population and Siamese Eld's deer population. However, we found six single nucleotides polymorphism (SNPs) on Y chromosome between Burmese and Siamese Eld's deer. For sex identification, our primers are able to identify the sex of these deer from fecal sample by the polymerase chain reaction (PCR) technique. Conclusion, although these markers were not appropriated for paternal lineage haplotyping within the population, however, they can be used as a phylogenetic marker for detecting hybrid-subspecies between Burmese and Siamese Eld's deer population. The new primer set from this study will also be applied for a non-invasive sexing in Eld's deer and hog deer and be used to follow these deer which were reintroduced into the forest of wildlife sanctuary in Thailand.

_____ _____ ___ / ___ / ___

Student's signature Thesis Advisor's signature

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.วรวิทย์ วัชชวัลคุ ประธานกรรมการที่ปรึกษา และ อ. น.สพ.ดร. สิทธวีร์ ทองทิพย์ศิริเดช กรรมการที่ปรึกษาร่วม ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำ ในด้านการศึกษา งานวิจัย การตรวจและการแก้ไขข้อบกพร่องในการเขียนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสำเร็จลุล่วง

ขอขอบพระคุณ กรมอุทยานแห่งชาติสัตว์ป่าและพันธุ์พืช และองค์การสวนสัตว์ในพระราชูปถัมภ์ ที่อนุเคราะห์และเอื้อเฟื้อตัวอย่างในการศึกษาครั้งนี้ และขอขอบพระคุณคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสนที่เอื้อเฟื้อสถานที่สำหรับการทำงานในห้องปฏิบัติการ

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อชัยกร สุขมาก คุณแม่จันทิมา สุขมาก และน้องชาย ที่คอยสนับสนุนและเป็นกำลังให้เสมอมา และขอบคุณพี่ๆ น้องๆ ในห้องปฏิบัติการ ตลอดจนถึงพี่ๆ น้องๆที่ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพการเกษตรที่เป็นที่ปรึกษาและให้คำแนะนำต่างๆ

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สบว.) สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ

มานะกร สุขมาก

กุมภาพันธ์ 2553

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(5)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	
อุปกรณ์	17
วิธีการ	18
ผลและวิจารณ์	30
สรุปและข้อเสนอแนะ	
สรุป	46
ข้อเสนอแนะ	47
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	48
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก สารเคมี	60
ภาคผนวก ข วิธีการทดลอง	63
ภาคผนวก ค สัญลักษณ์ที่ใช้แทนลำดับเบส	65
ภาคผนวก ง ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนต่างๆบนโครโมโซมวาย	67
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	73

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

1 ตารางแสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการจับของไพรเมอร์ (annealing temperature) และขนาดของผลผลิต PCR ที่คาดว่าจะได้ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษา 26

2 ตารางแสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการจับของไพรเมอร์ (annealing temperature) และขนาดของผลผลิต PCR ที่คาดว่าจะได้ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการจำแนกเพศจากมูล 27

3 ตารางแสดงค่า Pairwise distance ของยีน DBY และ SRY ส่วน coding region 1. ละมั่งชนิดย่อยพม่า (*Cervus eldii thamin*) 2. ละมั่งชนิดย่อยไทย (*Cervus eldii siamensis*) 3. เนื้อทราย (*Axis porcinus*) 4. กวางแดง (*Cervus elaphus*) และ 5. โค (*Bos taurus*) 39

4 ตารางแสดงตำแหน่งเบสที่แตกต่างกันระหว่างละมั่งชนิดย่อยพม่า (*Cervus eldii thamin*) และละมั่งชนิดย่อยไทย (*Cervus eldii siamensis*) บนยีน ในโครโมโซมวายที่ทำการศึกษา 40

ตารางผนวกที่

ข1 ตารางแสดงองค์ประกอบของสารละลายในปฏิกิริยา PCR ในการศึกษาความหลากหลายบนโครโมโซมวาย 64

ข2 ตารางแสดงค่าองค์ประกอบของสารละลายในปฏิกิริยา PCR ในการพัฒนาการจำแนกเพศจากมูล 64

ค1 ตารางแสดงสัญลักษณ์ที่ใช้แทนลำดับเบส 66

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ภาพแสดงตำแหน่งของไพรเมอร์ ณ ตำแหน่งของยีนต่างๆบนโครโมโซมวาย	25
2	ภาพแสดงตำแหน่งและขนาดของผลผลิต PCR ที่คาดว่าจะได้ของไพรเมอร์ SEX1W และ SEX2W ซึ่งออกแบบมาให้จำเพาะต่อยีน *DBY*	28
3	ภาพแสดงการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *DBY* บางส่วนระหว่างละมั่งชนิดย่อยพม่า ละมั่งชนิดย่อยไทย เนื้อทราย และกวางแดง (EU219377) และตำแหน่งของไพรเมอร์ SEX1W และ SEX2W ที่ออกแบบในการศึกษานี้	29
4	แสดงแถบผลผลิต PCR ที่ปรากฏเมื่อทดสอบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อโครโมโซมเพศผู้กับดีเอ็นเอที่สกัดจากตัวอย่างเลือด	38
5	แสดง Phylogenetic tree ของ *DBY* ด้วยวิธี Neighbor-joining (NJ) และใช้ Maximum composite likelihood model ในการวิเคราะห์ ร่วมกับการทดสอบความน่าเชื่อถือของ tree ด้วย Bootstrap 10,000 รอบ เปรียบเทียบระหว่างละมั่งชนิดย่อยพม่า (*Cervus eldii thamin*) ละมั่งชนิดย่อยไทย (*Cervus eldii siamensis*) เนื้อทราย (*Axis porcinus*) และกวางแดง (*Cervus elaphus*) โดยใช้โค (*Bos taurus*) เป็นสัตว์นอกกลุ่ม	41
6	แสดง Phylogenetic tree ของยีน *SRY* ส่วน coding region ด้วยวิธี Neighbor-joining (NJ) และใช้ Maximum composite likelihood model ในการวิเคราะห์ ร่วมกับการทดสอบความน่าเชื่อถือของ tree ด้วย Bootstrap 10,000 รอบ เปรียบเทียบระหว่างละมั่งชนิดย่อยพม่า (*Cervus eldii thamin*) ละมั่งชนิดย่อยไทย (*Cervus eldii siamensis*) เนื้อทราย (*Axis porcinus*) และกวางแดง (*Cervus elaphus*) โดยใช้โค (*Bos taurus*) เป็นสัตว์นอกกลุ่ม	42

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ **หน้า**

7 แสดง Phylogenetic tree ของยีน *DBY* และ *SRY* ส่วน coding region ด้วยวิธี Neighbor-joining (NJ) และใช้ Maximum composite likelihood model ในการวิเคราะห์ ร่วมกับการทดสอบความน่าเชื่อถือของ tree ด้วย Bootstrap 10,000 รอบ เปรียบเทียบระหว่างละมั่งชนิดย่อยพม่า (*Cervus eldii thamin*) ละมั่งชนิดย่อยไทย (*Cervus eldii siamensis*) เนื้อทราย (*Axis porcinus*) และกวางแดง (*Cervus elaphus*) โดยใช้โค (*Bos taurus*) เป็นสัตว์นอกกลุ่ม 43

8 แสดงผลผลิต PCR จากปฏิกิริยา PCR ที่ได้จากชุดของไพรเมอร์ที่ใช้ในการจำแนกเพศ เมื่อทำการทดสอบกับตัวอย่างเลือด 44

9 แสดงผลผลิต PCR ที่ได้จากการทำปฏิกิริยา singleplex PCR ด้วยชุดไพรเมอร์ DRA1Wและ DRA2W แยกกับไพรเมอร์ SEX1W และ SEX2W จากตัวอย่างมูลละมั่งและเนื้อทราย โดย PCR product จากปฏิกิริยา PCR ทั้งสองจะถูกนำมา load ใส่ในหลุมเดียวกัน 45

ภาพผนวกที่

ง1 ภาพแสดงข้อมูลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในยีน *DBY* 68

ง2 ภาพแสดงข้อมูลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในยีน *SRY* 69

ง3 ภาพแสดงข้อมูลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในยีน *ZFY* 71

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

AMELXY	=	amelogenin, X/Y-linked.
DBY	=	dead box polypeptide, Y-linked.
DNA	=	deoxyribonucleic acid.
ML	=	maximum likelihood.
MP	=	maximum parsimony.
MSY	=	male specific reion of Y chromosome.
PAR	=	pseudoautosomal region.
PCR	=	polymerase chain reaction.
SRY	=	sex determining region Y.
UPGMA	=	unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean.
UBE1Y	=	ubiquitin-Activating Enzyme E1, Y-Linked.
ZFY	=	zinc finger protein, Y-linked.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ความหลากหลายทางพันธุกรรมบนโครโมโซมวายในละมั่งชนิดย่อยไทย (*Cervus eldii siamensis*) และละมั่งชนิดย่อยพม่า (*Cervus eldii thamin*)

Genetic Diversity of Y Chromosome in Siamese Eld's deer (*Cervus eldii siamensis*) and Burmese Eld's deer (*Cervus eldii thamin*)

คำนำ

ละมั่ง (*Cervus eldii*) เป็นสัตว์ป่าในวงศ์กวาง (family cervidae) และสัตว์ป่าสงวนของไทย ทั่วทั้งโลกสามารถแบ่งละมั่งออกได้เป็นสี่ชนิดย่อยตามลักษณะรูปร่าง และ พื้นที่อยู่อาศัย ได้แก่ 1. ละมั่งชนิดย่อยมาณีปูร์ (Manipur Eld's deer; *Cervus eldii eldi*) 2. ละมั่งชนิดย่อยทามิน หรือ ละมั่งชนิดย่อยพม่า (Thamin or Burmese Eld's deer; *Cervus eldii thamin*) 3. ละมั่งชนิดย่อยไทย (Siamese Eld's deer; *Cervus eldii siamensis*) และ 4. ละมั่งชนิดย่อยไหหลำ (Hainan Eld's deer: *Cervus eldii hainanus*) ในอดีตประเทศไทยมีละมั่งอยู่สองชนิดย่อย คือ ละมั่งชนิดย่อยพม่า และละมั่งชนิดย่อยไทย แต่ในปัจจุบันละมั่งทั้งสองชนิดย่อยนั้นหมดไปจากธรรมชาติแล้ว เหลือเพียงแต่ประชากรในกรงเลี้ยงเท่านั้น

การอนุรักษ์และฟื้นฟูประชากรละมั่งกลับคืนสู่ธรรมชาติ นอกจากจะเป็นการเพิ่มจำนวนประชากรละมั่งกลับคืนสู่ธรรมชาติแล้ว ประโยชน์อีกอย่างหนึ่งคือ การได้พื้นที่ป่าเต็งรังซึ่งเป็นพื้นที่เปิดโล่ง เกิดจากการจัดการพื้นที่เพื่อให้เหมาะสมกับการอยู่อาศัยของละมั่งกลับมา ซึ่งจะเป็นผลดีต่อสัตว์ป่าชนิดอื่นๆ ที่ใช้พื้นที่เปิดโล่งในการดำรงชีวิต เช่น นกกระทาทุ่ง กระต่ายป่า วัวแดง แย้ รวมถึงเป็นการเพิ่มจำนวนแหล่งอาหารให้กับสัตว์ผู้ล่า เช่น เสือโคร่ง เสือดาว หมาไน สุนัขจิ้งจอก เป็นต้น

การฟื้นฟูประชากรสัตว์ป่ากลับสู่ธรรมชาติต้องอาศัยการจัดการในหลายๆด้าน เช่น การตรวจสุขภาพและโรคติดต่อในสัตว์ก่อนปล่อยคืนสู่ป่า การสำรวจหาพื้นที่รองรับที่เหมาะสมสำหรับปล่อยสัตว์ การเตรียมพื้นที่รองรับรวมทั้งแหล่งน้ำแหล่งอาหาร และข้อมูลทางพันธุกรรมในประชากรนั้น เพื่อที่จะประเมินความสัมพันธ์ทางเครือญาติ และนำมาใช้เป็นข้อมูลสำหรับการ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จัดการผสมพันธุ์ ทั้งกับประชากรละมั่งในกรงเลี้ยง และประชากรที่ได้รับการฟื้นฟูสู่ธรรมชาติ เพื่อหลีกเลี่ยงการเกิดปัญหาเลือดชิด (inbreeding)

ปัจจุบันมีการใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล (molecular biotechnology) เพื่อศึกษาข้อมูลทางพันธุกรรม โดยนิยมศึกษาทั้งในโครโมโซมร่างกาย (autosome) และดีเอ็นเอจากไมโตคอนเดรีย (mitochondrial DNA) ซึ่งดีเอ็นเอจากไมโตคอนเดรียมีการถ่ายทอดจากเพศเมียไปสู่อีกรุ่นหนึ่งของประชากร (maternal inheritance) (Albert *et al.*, 1983) จึงทำให้สามารถศึกษาย้อนกลับยังต้นกำเนิดของเพศเมียหรือสายแม่ (maternal linage) ของสัตว์นั้นๆได้ ข้อมูลอีกส่วนหนึ่งที่มักนำมาใช้ร่วมกับข้อมูลจากดีเอ็นเอจากไมโตคอนเดรีย คือ โครโมโซมวาย (Y chromosome)

โครโมโซมวายมีการถ่ายทอดจากพ่อไปสู่ลูกชาย (paternal inheritance) ซึ่งใช้ในการศึกษาย้อนกลับไปยังต้นกำเนิดของเพศผู้หรือสายพ่อ (paternal linage) และเนื่องจากโครโมโซมวายเป็นโครโมโซมที่พบเฉพาะในสัตว์เพศผู้ จึงนำมาใช้ในการจำแนกเพศ (molecular sexing) ซึ่งวิธีการหนึ่งที่นิยมใช้ในการจำแนกเพศ คือการจำแนกเพศด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (polymerase chain reaction) หรือ PCR โดยใช้ตัวอย่างที่หลีกเลี่ยงการรบกวนสัตว์ (non-invasive sample) การจำแนกเพศทำให้รู้ข้อมูลสัดส่วนทางเพศของประชากร (sex-ratio) และแสดงให้เห็นถึงรูปแบบของการผสมพันธุ์ ความสามารถในการผสมพันธุ์ การขยายจำนวนของประชากร ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการติดตามการดำรงชีวิตภายหลังจากการฟื้นฟูประชากรละมั่งกลับสู่ธรรมชาติ

สำหรับประชากรละมั่งในกรงเลี้ยงในประเทศไทยนั้นมีการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้ข้อมูลของดีเอ็นเอจากไมโตคอนเดรีย (Dejchaisri, personal communicated) โดยสามารถแบ่งสายแม่ออกเป็น 11 สาย แต่สำหรับข้อมูลในส่วนโครโมโซมวายยังไม่มีผู้ทำการศึกษา ดังนั้นการงานวิจัยนี้จึงมีจุดประสงค์ที่จะศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของโครโมโซมวายทั้งในละมั่งชนิดย่อยไทยและพม่า และพัฒนาการจำแนกเพศด้วยวิธี PCR เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในการติดตามสัดส่วนทางเพศของประชากรละมั่งที่ได้รับการฟื้นฟูสู่ธรรมชาติต่อไปในอนาคต

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมบนโครโมโซมวายในละมั่ง

2. เพื่อพัฒนาไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการจำแนกเพศจากตัวอย่างมูลของละมั่งและเนื้อทรายด้วยวิธี PCR

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การตรวจเอกสาร

1. ละมั่ง (*Cervus eldii*)

ละมั่งเป็นสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมในชั้น (Class: Mammalia) อยู่ในอันดับสัตว์กีบ (Order: Artiodactyla) วงศ์กวาง (Family: Cervidae) และอยู่ในสกุล (Genus: Cervus) โดยมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Cervus eldii* โดยจากการศึกษาของ McClelland (1842) ได้จัดอนุกรมวิธานไว้ดังนี้

Class : Mammalia
Order : Artiodactyla
Family : Cervidae
Genus : Cervus
Species : eldii

ชื่อวิทยาศาสตร์ของละมั่ง คือ *Cervus eldii* ชื่อชนิดของละมั่งคือ *eldii* ต้องมีตัว i ต่อท้ายสองตัว (Corbet, 1992)

ละมั่งเป็นสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจำพวกแรกที่มีเขาบนหัว โดยจะมีเขา 1 คู่ เนื้อเขามีลักษณะตัน ไม่มีลักษณะของปลอกเขาและแกนเขา โดยเขาของละมั่งนั้นจะยึดติดกับกะโหลกชิ้นหน้าซึ่งพัฒนาเป็นก้านรองรับเขา และลำเขาจะมีลักษณะแตกกิ่งก้าน โดยปกติละมั่งจะมีการผลัดเขา ซึ่งเขาเก่าจะหลุดออกไปในขณะที่จะมีเขาใหม่งอกขึ้นทดแทนเป็นประจำทุกปี ซึ่งเขาจะมีขนาดใหญ่ขึ้นและแตกกิ่งมากขึ้นตามอายุของละมั่ง ซึ่งจะเห็นได้ว่าลักษณะแตกต่างจากโคและกระบือที่จะมีเนื้อเขากลวงและมีแกน เขาโคและกระบือจะไม่แตกกิ่งและผลัดเขา

ละมั่งนั้นถูกพบครั้งแรกในปี ค.ศ.1838 ที่หุบเขา เมืองมาณีปูร์ รัฐอัสสัม ประเทศอินเดีย โดย นายทหารอังกฤษ ชื่อ ร้อยโท Percy Eld จึงเป็นที่มาของชื่อภาษาอังกฤษของละมั่ง Eld's Deer และในอดีตนั้นละมั่งถูกจัดอยู่ในสกุลย่อย (Subgenus: *Rucervus*) เช่นเดียวกับเนื้อสมัน (Schomburgk's deer: *Cervus schomburgki*) โดยในปัจจุบันละมั่งถูกแบ่งออกเป็นสี่ชนิดย่อย (Subspecies) 4 ชนิดย่อยด้วยกัน ตามลักษณะภายนอกและการกระจายตามภูมิศาสตร์ที่แตกต่างกัน ได้แก่

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1.1 ชนิดย่อยมาณีปูร์ (Manipur Eld's deer: *Cervus eldii eldii* McClelland, 1842) โดยมีชื่อพื้นเมืองว่า ซันไก (Sangai) พบใน Keibul Lumjao National Park เมืองมาณีปูร์ รัฐอัสสัม ประเทศอินเดีย เขาจะมีขนาดเล็กเรียว ส่วนปลายเขาค่อนข้างกลมและแตกกิ่ง 2 กิ่ง โดยมีกิ่งรับหมา (brow tine) ยกตัวตั้งฉากสูงในระดับเดียวกับลำเขา (beam) และมีแผ่นหนังที่ส้นกีบช่วยการเดินบนดินเลนและพืชน้ำ

1.2 ชนิดย่อยพม่า หรือชนิดย่อยทามิน (Burmese Eld's deer or Thamin: *Cervus eldii thamin* Thomas, 1918) ปลายเขามีลักษณะกลมแบน มีการแตกกิ่งหรือปุ่มขนาดเล็กกว่าชนิดย่อยมาณีปูร์ และมีกิ่งรับหมาต่ำกว่าและปลายเขามีสีน้ำตาลคล้ำกว่าชนิดย่อยไทย มีชื่อพื้นเมืองว่า ทามิง หรือ ทามิน (Thameng หรือ Thamin) พบในบริเวณที่ราบลุ่มแม่น้ำอิระวดี ประเทศพม่า และผืนป่าแถบตะวันตกของไทย ในอดีตนั้น Thomas ตั้งชื่อไว้ 2 ชื่อ คือ ละมั่งที่พบทางตอนล่าง แถบเมืองพะโค หรือหงสาวดีให้ชื่อว่า *Cervus eldii thamin* และละมั่งที่พบทางตอนเหนือแถบเหมืองทับทิมของประเทศพม่าได้รับการตั้งชื่อว่า *Cervus eldii brucei* ซึ่งภายหลังถูกรวมไว้ เป็นชนิดย่อย *Cervus eldii thamin*

1.3 ชนิดย่อยไทย (Siamese Eld's deer: *Cervus eldii siamensis* Lydekker, 1915) ชื่อพื้นเมืองภาษาไทย คือ ละมั่ง หรือ ละองละมั่ง หรือ องมั่ง ในภาษาลาว ระเมียง (Rameang) ในภาษาเขมร กา-ตง (Ca-tong) ในภาษาเวียดนาม และ ยันจี (Yungee) ในภาษาของชาวมอญ ละมั่งไทยมีขนปกคลุมตัวเป็น สีส้มสด ด้านบนของส่วนเขามีปุ่มกิ่งแหลม (snag) บริเวณระหว่างรอยต่อระหว่างกิ่งรับหมากับส่วนลำเขา ส่วนปลายเขาแบนเรื่อยไปจรดปลายเขา ใกล้ส่วนปลายเขาแตกกิ่งย่อยจำนวนมาก หรือเป็นกิ่งย่อยเล็กเรียว เป็นชนิดย่อยที่สวยงามกว่าชนิดชนิดย่อยอื่นๆ ในประเทศไทย เคยพบทางภาคกลาง เช่น บริเวณจังหวัดราชบุรี สุพรรณบุรี ลพบุรี ภาคตะวันออก ที่จังหวัดปราจีนบุรี และสระแก้ว ภาคอีสาน เช่น จังหวัดเลย ชัยภูมิ นครราชสีมา บุรีรัมย์ สุรินทร์ ศรีสะเกต และภาคเหนือพบที่ จังหวัด พะเยา ลำปาง และน่าน นอกจากนี้ยังพบละมั่งชนิดย่อยนี้ได้ใน ป่าเต็งรังบริเวณที่ราบลุ่มตอนกลาง ในประเทศลาว กัมพูชา และเวียดนาม

1.4 ชนิดย่อยไหหลำ (Hainan Eld's deer: *Cervus eldii hainanus* Thomas, 1918) มีชื่อพื้นเมืองว่า โปลู (Po-lu : Slope or mountain deer) ตามภาษาจีน ในอดีตสามารถพบละมั่งชนิดนี้ได้ทั่วเกาะไหหลำ ซึ่งไม่เคยพบซากดึกดำบรรพ์ใดๆ บนแผ่นดินใหญ่ของจีน ลำตัวมีขนาดเล็ก ตัวผู้จะมีเขาที่ค่อนข้างเล็ก และไม่มีกิ่งย่อยขนาดเล็ก สีขนสีน้ำตาลอมเหลืองจาง ตามลำตัวไม่มีจุดขาว ซึ่ง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ประเทศจีนจัดให้ละมั่งชนิดย่อยนี้คงใช้ชื่อต่อไป ในขณะที่เอกสารจากการศึกษาส่วนมากจัดให้ละมั่งชนิดนี้เป็นสายพันธุ์ย่อยของชนิดย่อยไทย (Balakrishnan *et al.*, 2003)

อย่างไรก็ตามจากการศึกษาพันธุกรรมในส่วนดีเอ็นเอจากไมโตคอนเดรีย พบว่าละมั่งชนิดย่อยไหหลำนั้นมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับละมั่งชนิดย่อยไทย และละมั่งชนิดย่อยมาณีปูร์มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับชนิดย่อยพม่ามากกว่าชนิดย่อยไทย และพบว่าละมั่งชนิดย่อยมาณีปูร์ และละมั่งชนิดย่อยไหหลำ ไม่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมเนื่องจากฟื้นฟูจากขนาดประชากรที่มีจำนวนน้อย (Balakrishnan *et al.*, 2003)

2. ลักษณะทางนิเวศวิทยา

ละมั่งจะชอบอาศัยตามป่าเต็งรัง ป่าโปร่งหรือป่าทุ่ง ที่อยู่ใกล้หนองน้ำ มักไม่ชอบอาศัยในป่าทึบเนื่องจากลักษณะโครงสร้างของเขาที่ค่อนข้างแตกแขนง และยื่น ซึ่งจะทำให้ไปเกี่ยวกับเถาวัลย์ หนาม และหนีจากผู้ล่าได้ลำบาก อันอาจจะเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ไม่ค่อย พบตามป่ารกทึบโดยเฉพาะป่าทางตอนใต้และประเทศมาเลเซีย ซึ่งสภาพป่าส่วนใหญ่เป็นป่าดิบซึ่งไม่เหมาะสมกับการอยู่อาศัย (กรมป่าไม้, 2539) ซึ่งการปรับตัวเช่นนี้สามารถพบได้ในละมั่งในประเทศอินเดียที่มีการปรับสภาพพื้นกีบเพื่อให้เคลื่อนที่ได้ดีในพื้นที่ลุ่มน้ำ

ละมั่งเป็นสัตว์ที่มีการกินอาหารแบบแทะเล็ม (grazing) คล้ายกับพวกโคและกระบือ นอกจากนี้ละมั่งยังชอบกินลูกไม้ต่างๆ ตามพื้นทุ่งโล่งหรือป่าโปร่ง ซึ่งจากการสำรวจพืชอาหารที่ใช้เลี้ยงละมั่ง พบว่าพืชที่สามารถพบได้ในป่ามีทั้งสิ้น 36 ชนิด ได้แก่ ยอดแก่และยอดอ่อนของพันธุ์ไม้ป่า เช่น มะกอกป่า ขี้เหล็ก กระบก ใบไผ่ชนิดต่างๆ พืชตระกูลถั่วชนิดต่างๆ หญ้าขน หญ้าคา ผลมะกอกป่า ผลมะข้ามป้อม เป็นต้น ส่วนพืชที่สามารหาได้ทั่วไป เช่น ผักตบชวา มันเทศ ใบตำลึง ผลไม้บางชนิด สามารถนำมาใช้ในการเลี้ยงละมั่งได้เช่นกัน โดยอุปนิสัยการกินของละมั่งนั้นมีการศึกษาในหลายชนิดย่อย เช่น ชนิดย่อยมาณีปูร์ (Singsit, 2003) รายงานว่าละมั่งมักจะออกมาเล็มหญ้าในตอนเช้าตรู่จนถึงสายและจะหลบพักตามพุ่มหญ้าสูงๆ และจะออกมาเล็มหญ้าอีกทีในตอนเย็น และนอนพักบริเวณพื้นที่เนินเล็กๆ ในขณะที่ละมั่งชนิดย่อยพม่ามักจะชอบกินหญ้าอ่อนๆ และพืชเกษตรบางชนิด และกินผลไม้ที่หาได้ในพื้นที่ ในบางฤดูกาลมักพบว่าละมั่งตัวเมียมักออกมาหากินในป่าเสื่อมโทรมใกล้กับบริเวณเกษตรกรรม มากกว่าตัวผู้ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าตัวเมียต้องการลดความเสี่ยงจากการถูกล่า หรือต้องการสารอาหารที่มีมากกว่าเพื่อการผลิตน้ำนมและการเลี้ยงลูก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ลักษณะทางประชากรของละมั่ง จะอาศัยอยู่รวมกันเป็นฝูงขนาดประมาณ 50-60 ตัว เพื่อหากินหญ้าระบัดในหน้าแล้ง (Lekagul and McNeely, 1988) ในประเทศกัมพูชาพบว่า ขนาดฝูงเฉลี่ย 4.24 ตัว ขณะที่ละมั่งบนเกาะไหหลำ ประเทศจีน มีอัตราส่วนของเพศผู้ต่อเพศเมีย 1:3-4 ฤดูฝนมักจะอยู่กันตามลำพัง 1-2 ตัว และมีการผลัดเขาในช่วงเดือนกรกฎาคม ละมั่งจะตั้งท้องนาน 240 วัน และให้ลูกครั้งละ1 ตัวในช่วงเดือนพฤศจิกายนจนถึงเดือนกุมภาพันธ์ โดยลูกละมั่งเมื่อมีอายุ 2 ปีจะถึงวัยเจริญพันธุ์และพร้อมที่จะสืบพันธุ์ต่อไป (กรมป่าไม้, 2539) ศัตรูตามธรรมชาติของละมั่ง คือ เสือโคร่ง เสือดาว และหมาไน แต่อย่างไรก็ตามสาเหตุสำคัญที่ทำให้ประชากรละมั่งในธรรมชาติหมดไป คือการรุกรานจากมนุษย์ โดยการล่าเพื่อเอาหนังและเขา รวมถึงการแผ้วถางป่าเพื่อเพิ่มพื้นที่การเกษตร และที่อยู่อาศัย ทำให้ประชากรละมั่งลดจำนวนลง

สำหรับประชากรละมั่งในประเทศไทย ในปัจจุบันนั้นแบ่งออกเป็นสองชนิดย่อยด้วยกัน โดยละมั่งชนิดย่อยไทยนั้นมีประชากรอยู่ 2 แห่ง ได้แก่ สวนสัตว์ดุสิต องค์การสวนสัตว์ในพระบรมราชูปถัมภ์ และสถานีเพาะเลี้ยงสัตว์ป่าบางละมุง จังหวัดชลบุรี โดยมีประชากรรวมกันประมาณ 20 ตัว (Bhumpakphan et al., 2003) ในขณะที่ประชากรละมั่งชนิดย่อยพม่า มีการเพาะเลี้ยงในหลายๆ แห่ง เช่น สวนสัตว์เปิดเขาเขียว จังหวัดชลบุรี และตามสวนสัตว์เอกชนบางแห่ง ที่เหลือจะถูกเพาะเลี้ยงตามสถานีเพาะเลี้ยงสัตว์ป่าของกรมอุทยานแห่งชาติสัตว์ป่าและพันธุ์พืชบางแห่ง ในการประชุมเชิงปฏิบัติการเรื่องการอนุรักษ์และฟื้นฟูประชากรละมั่งที่เกิดขึ้นเมื่อวันที่ 10-12 พฤศจิกายน 2547 สรุปได้ว่า ขณะนี้มีประชากรละมั่งชนิดย่อยพม่า 1,100 ตัว ชนิดย่อยมาณีปูร์ 180 ตัว ชนิดย่อยไทย 23 ตัว และชนิดย่อยไหหลำ 280 ตัว (Siriarunrat, 2003)

3. การปล่อยสัตว์ป่าคืนสู่ธรรมชาติ (reintroduction)

การปล่อยสัตว์ป่าคืนสู่ธรรมชาตินั้น หมายถึงการฟื้นคืนประชากรสัตว์ป่าที่เคยอยู่ในพื้นที่ธรรมชาตินั้นมาก่อนแต่ปัจจุบันได้สูญพันธุ์ไปจากพื้นที่นั้นๆ ไม่ว่าสาเหตุจะเกิดจากธรรมชาติ หรือโดยมนุษย์ ซึ่งก่อนที่จะฟื้นคืนประชากรสัตว์ป่าเหล่านั้นกับสู่ธรรมชาติจำเป็นจะต้องมีการเพาะเลี้ยงขยายพันธุ์เพื่อที่จะเพิ่มจำนวนตามสวนสัตว์ หรือสถานีเพาะเลี้ยงให้ได้จำนวนที่มากพอก่อนที่จะทำการปล่อยตามขั้นตอนของ (IUCN/SSC Re-introduction Specialist Group, 1995) ซึ่งมีขั้นตอนหลักๆสามขั้นตอน ได้แก่ ขั้นตอนก่อนการปล่อย ขั้นตอนระหว่างปล่อย และขั้นตอนภายหลัง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ปล่อย ในขั้นตอนก่อนการปล่อยจะต้องมีการประเมินความเสี่ยงก่อนการปล่อย การหาพื้นที่และแหล่งอาหารที่เหมาะสม รวมถึงการจัดการด้านสุขภาพและการจัดการพันธุกรรม ซึ่งข้อมูลต่างๆจะมีผลในการประเมินความสามารถในการคงอยู่ของประชากรที่ปล่อยสู่ธรรมชาติ ซึ่งสำหรับประเทศไทยนั้น ได้มีการปล่อยละมั่งกลับสู่ธรรมชาติในพื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูเขียว (IUCN, 2008) เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าซับลังกา และเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอ (พีรศักดิ์และคณะ, 2552)

4. พันธุศาสตร์ในการอนุรักษ์ (conservative genetic)

พันธุศาสตร์ในการอนุรักษ์ เป็นการประยุกต์ใช้ข้อมูลทางพันธุกรรมในการจัดการเพื่อการดำรงอยู่ของสิ่งมีชีวิตชนิดใดชนิดหนึ่ง ซึ่งข้อมูลทางพันธุกรรมเป็นข้อมูลที่สำคัญ และใช้เป็นข้อมูลประกอบในการศึกษาในหลายๆด้านของประชากรสัตว์ป่า ทั้งในด้านนิเวศวิทยา พฤติกรรม และความสัมพันธ์ทางเครือญาติ และความสัมพันธ์ด้านภูมิประเทศ ซึ่งข้อมูลทางด้านพันธุกรรมเหล่านี้มีการนำไปใช้ในหลายๆด้าน เช่น เพื่อคัดเลือกสัตว์สำหรับนำไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ การผสมข้ามสายพันธุ์สัตว์ รวมไปถึงการถ่ายทอดยีน ชนิดนั้นๆจากรุ่นหนึ่งไปยังอีกรุ่นหนึ่ง และในการอนุรักษ์สัตว์ป่านั้นงานในด้านต่างๆเหล่านี้ถูกนำมาใช้ผสมผสานกันเพื่อเพิ่มจำนวนประชากรสัตว์ป่า ความหลากหลายทางพันธุกรรม และลดการเกิดภาวะเลือดชิดในหมู่ประชากรสัตว์ป่า

ในปัจจุบันความรู้ทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพระดับโมเลกุลก้าวหน้าอย่างรวดเร็ว หลายๆประเทศนำความรู้ดังกล่าวมาประยุกต์ใช้ในการสำรวจประชากรและความหลากหลายทางพันธุกรรมในสัตว์ป่าเพื่อใช้เป็นข้อมูลในการอนุรักษ์สัตว์ป่า ซึ่งข้อมูลต่างๆที่นำมาใช้ ดังกล่าว เช่น บอกลักษณะของ heterozygositie ระยะห่างของพันธุกรรม (genetic distance) ประโยชน์ในการศึกษาวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต (evolution) การจัดอนุกรมวิธาน (systematic) และใช้ในการจำแนกเพศเพื่อประเมินหาอัตราส่วนทางเพศประชากร

การใช้ประโยชน์จากข้อมูลทางพันธุกรรม เช่น การใช้ข้อมูลทางพันธุกรรมเพื่อศึกษาถึงลำดับของการวิวัฒนาการ การถ่ายทอดพันธุกรรมจากรุ่นหนึ่งไปสู่อีกรุ่นหนึ่ง และความหลากหลายทางพันธุกรรม ยกตัวอย่าง เช่น พันธุกรรมจากดีเอ็นเอจากไมโตคอนเดรีย (mitochondrial DNA) โดยใช้เป็นข้อมูลในการศึกษาการถ่ายทอดพันธุกรรมเนื่องจากดีเอ็นเอจากไมโตคอนเดรียนั้นมีจำนวน copy มากกว่าใน nuclear DNA และเนื่องจากดีเอ็นเอจากไมโตคอนเดรียนั้นมีการถ่ายทอด

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จากแม่ไปสู่ลูก (maternal inheritance) (Albert *et al*., 1983) จึงใช้เป็นข้อมูลในการศึกษาต้นกำเนิดในสายแม่ (maternal linage)ได้ แต่การใช้ข้อมูลจากดีเอ็นเอจากไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอเพียงอย่างเดียวในการศึกษานั้น เป็นเพียงการศึกษาพันธุกรรมที่ได้รับจากสายแม่เพียงสายเดียว จึงจำเป็นต้องศึกษาข้อมูลทางพันธุกรรมจากส่วนอื่นๆร่วมด้วย (Zhang *et al*., 2005) ซึ่งข้อมูลทางพันธุกรรมอีกส่วนที่สามารถนำมาเปรียบเทียบกับข้อมูลจากดีเอ็นเอจากไมโตคอนเดรีย คือ ข้อมูลทางพันธุกรรมจากโครโมโซมวาย ซึ่งจะมีการถ่ายทอดจากพ่อไปยังลูกสัตว์เพศผู้ (paternal linage)

5. โครโมโซมวาย

ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมโครโมโซมวาย เป็นส่วนที่มียีน อยู่น้อยชนิด โดยยีนเหล่านั้นจะทำหน้าที่เกี่ยวกับการกำหนดเพศ (sex determination) การสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ และการพัฒนาลักษณะที่แสดงออกของเพศผู้ ซึ่งโครโมโซมวายเป็นโครโมโซมที่พบได้เฉพาะเพศผู้ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมทุกชนิด และมีการถ่ายทอดจากพ่อไปสู่ลูกสัตว์เพศผู้ ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมมีระบบการกำหนดเพศ ด้วยระบบ X-Y sex determining system กล่าวคือในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจะมีโครโมโซมเพศสองชิ้นคือโครโมโซมเอ็กซ์ (X-chromosome) และโครโมโซมวาย (Y-chromosome) โดยในสัตว์เพศผู้จะมีโครโมโซมเพศเป็นโครโมโซมเอ็กซ์และวาย (XY) ส่วนสัตว์เพศเมียจะมีโครโมโซมเพศเป็นเอ็กซ์และเอ็กซ์ (XX)

ในระยะแรกของการวิวัฒนาการของโครโมโซมเพศนั้น โครโมโซมเพศทั้งสองแท่ง มีลักษณะเป็นคู่สมกัน (homologous) แต่มีการเคลื่อนย้ายและแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนมาจากโครโมโซมแท่งอื่นบ้างหรือย้ายไปยังแท่งอื่น (transposition และ translocation) รวมถึงบางส่วนมาจากโครโมโซมร่างกาย ซึ่งในการเกิดวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดจะมีการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนที่แตกต่างกันออกไป และบางชิ้นส่วนมีการสูญหายไปตามแต่ละรุ่นของประชากรในการวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต ยกตัวอย่างเช่นยีน *UBE1Y* (Ubiquitin-Activating Enzyme E1, Y-Linked) ซึ่งเป็นยีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ในสัตว์ที่มีกระเป๋าหน้าท้องและสัตว์ฟันแทะแต่ไม่พบยีนนี้ในสัตว์ตระกูลลิง ซึ่งการที่ในสัตว์ตระกูลลิง อาจเกิดการสูญหายยีนนี้ไปเนื่องจากมียีนอื่นจากโครโมโซมร่างกายทำงานแทนได้ (Mitchell, 1998) ในคนพบว่าบนโครโมโซมเพศผู้มีการเปลี่ยนแปลงจนเหลือเพียงแค่ 4 ยีนจากยีนตั้งต้น 1,000 ยีนของตำแหน่ง ที่ conserved ไว้บนโครโมโซมเอ็กซ์ และ20 ยีนจาก 500 ยีนที่เพิ่มเข้ามาในโครโมโซมเอ็กซ์ (Grave, 1995)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

โครโมโซมวายเป็นโครโมโซมเพียงแท่งเดียวที่มีตำแหน่งบนโครโมโซมที่ไม่มีการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนของโครโมโซมในกระบวนการ recombination ในระยะ meiosis โดยส่วนที่ไม่ได้เกิดการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนของโครโมโซม ดังกล่าวเรียกว่า Male specific region of Y-Chromosome (MSY) ซึ่งในคนมีขนาดเป็น 95 % ของโครโมโซมวายทั้งแท่ง อีก 5 % ที่เหลือเป็นส่วนที่เรียกว่า pseudoautosomal region (PAR) ซึ่งอยู่ที่ตำแหน่งปลายของโครโมโซมวาย การที่โครโมโซมวายมีส่วนที่ไม่เกิดการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนโครโมโซม และมีการถ่ายทอดจากพ่อสู่ลูกสัตว์เพศผู้โดยตรง ทำให้เป็นที่สนใจในการศึกษาในด้านการพันธุศาสตร์ประชากร โดยใช้ในการติดตามความสัมพันธ์ของการถ่ายทอดยีนจากพื้นที่ไปยังอีกพื้นที่หนึ่ง (gene flow) ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการกับพื้นที่ของประชากรที่ทำการศึกษา (phylogeography) (Sundqvist *et al.,* 2001; Roca *et al*., 2007; Yannic *et al*., 2008; Mohamad *et al.*, 2009) การจำแนกชนิดสัตว์ (speciation) (Johnson *et al.* 2006; Pidancier *et al.* 2006; Nishida *et al.* 2007; Nijman *et al.* 2008; Burrell *et al.* 2009) รวมทั้งการสืบหาต้นตอของการเกิดสัตว์ลูกผสม (hydridization) (Verkaar *et al*., 2003; Vila *et al*., 2003; Wallner *et al*., 2003) ซึ่งข้อมูลจากโครโมโซมวายจะเปิดเผยที่มาที่ไปของบรรพบุรุษของประชากรเพศผู้

การศึกษาในโครโมโซมวายส่วนมากทำการศึกษาในมนุษย์ (Polony *et al*., 1997; Malaspina *et* al., 1998; Quintana-Murci *et* al., 1999; Shen *et al*., 2000) แต่สำหรับสัตว์ป่าในเมืองไทยยังมีการศึกษาน้อย เนื่องจากในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมส่วนมากนิยมศึกษาในส่วนของดีเอ็นเอจากไมโตคอนเดรีย ซึ่งได้รับการถ่ายทอดจากแม่สู่ลูก หรือในส่วนของโครโมโซมร่างกายมากกว่า จากการศึกษาของ Hellborg and Ellegren (2003) ได้ทำการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บนโครโมโซมวายในสัตว์หลายชนิด และทำการออกแบบไพรเมอร์ จากการ alignment ลำดับเบสบนโครโมโซมวาย เปรียบเทียบในคนและหนู โดยไพรเมอร์ถูกออกแบบให้มีตำแหน่งจำเพาะกับตำแหน่งของ exon ที่ขนาบข้าง intron ของยีนต่างๆบนโครโมโซมวาย รวมทั้งทดสอบกับสัตว์หลายชนิด การพัฒนาไพรเมอร์เหล่านี้ทำให้มีการศึกษาโครโมโซมวายในสัตว์หลายๆ ชนิดมากขึ้น

จากการศึกษาความหลากหลายบนโครโมโซมวายในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหลายชนิดพบว่าไม่มีความแตกต่างในระดับของชนิดย่อย (intraspecies) แต่พบความแตกต่างในระดับสายพันธุ์ (interspecific) ยกตัวอย่างเช่น แกะ (Meadows *et al*., 2004; Meadows and Kijas, 2008) ม้า (Lindgren *et al*., 2004) ลิงชิมแพนซี (Stone *et al.,* 2002) หมาป่า (Hellborg and Ellegren, 2004) โค

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

(Hellborg and Ellegren, 2004) และในสัตว์ตระกูลแมว (Luo *et al*., 2007) แต่สำหรับการศึกษาในกระบือ (Yindee, personal communicated) พบว่ามีความหลากหลาย และสามารถใช้ในการจัดจำแนกกระบือปลัก (swamp buffalo) เป็นกลุ่มตามภูมิภาคต่างๆในประเทศไทยได้ โดยทำการศึกษาในส่วนของยีน *SRY* (Sex-determination region Y) และ *ZFY* (zinc-finger protein, Y-linked) ซึ่งใช้ไพรเมอร์ตามการศึกษาของ Nijman *et al*. (2008)

เนื่องจากโครโมโซมวายเป็นโครโมโซมที่จำเพาะต่อสัตว์เพศผู้ ดังนั้นจึงนำมาใช้ประโยชน์ในการจำแนกเพศ โดยวิธีการจำแนกเพศที่นิยมกันมาก คือ การจำแนกเพศด้วยวิธี PCR เพื่อใช้ในการจำแนกเพศเซลล์อสุจิ (sperm sexing) หรือคัพภะ (embryo sexing) เพื่อการผลิตสัตว์ในอุตสาหกรรมการผลิตสัตว์ (Lobel *et al*., 1993; Chandler *et al*., 1998; Paul *et al*., 2003) ใช้ร่วมกับเทคโนโลยีด้านการสืบพันธุ์ (assisted reproductive technologies) หรือ ARTs เพื่อใช้ในการอนุรักษ์สัตว์ป่า ใช้จำแนกเพศในสัตว์ที่จำแนกเพศได้ยากจากลักษณะที่ปรากฏภายนอก และใช้ในการประเมินหาอัตราส่วนทางเพศในประชากรสัตว์ป่า

ซึ่งอัตราส่วนทางเพศถือเป็นข้อมูลสำคัญในการอนุรักษ์สัตว์ป่า เพื่อวิเคราะห์การดำรงอยู่และการวิวัฒนาการของประชากรสัตว์ป่า โดยแสดงให้เห็นถึงรูปแบบของการผสมพันธุ์ ความสามารถในการผสมพันธุ์ การขยายจำนวนของประชากร ซึ่งข้อมูลเหล่านี้เป็นประโยชน์ในการดำรงอยู่ของประชากรนั้นๆสำหรับการจัดการต่อไปในอนาคต

ยีนบนโครโมโซมวายที่นิยมใช้ในการจำแนกเพศ ได้แก่ ยีน *SRY* (Dallas *et al*., 2000; Matsubara *et al*., 2001; Drobnic, 2006; Emiko *et al*., 2006) ซึ่งยีนนี้มีความสำคัญต่อการเจริญและพัฒนาเป็นเพศผู้ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหลายๆชนิด และพบได้บนโครโมโซมวายเท่านั้น ดังนั้นเมื่อทำปฏิกิริยา PCR จะเกิดแถบผลผลิต PCR เฉพาะในตัวอย่างสัตว์เพศผู้ แต่ในการจำแนกเพศโดยใช้ยีนนี้เพียงยีนเดียวอาจทำให้ผลการจำแนกเพศผิดพลาดในกรณีที่ปฏิกิริยาที่เกิดจากไพรเมอร์ที่ออกแบบจากยีนนี้ไม่สำเร็จ ไม่ได้หมายความว่าตัวอย่างนั้นเป็นเพศเมีย แต่อาจจะเกิดจากคุณภาพดีเอ็นเอต้นแบบไม่ดี หรือปฏิกิริยา PCR ไม่สมบูรณ์ได้เช่นกัน ดังนั้นจึงนิยมใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากยีนนี้กับการทำ PCR จากยีนในส่วนอื่นๆประกอบเป็นตัวควบคุมความสมบูรณ์ของปฏิกิริยา PCR ที่เกิดขึ้น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อีกหนึ่งวิธีที่นิยม เป็นการใช้ไพรเมอร์เพียงหนึ่งคู่ที่จำเพาะทั้งโครโมโซมเอ็กซ์ และวาย ซึ่งจะมีตำแหน่งสมกันบนโครโมโซมทั้งสองแท่ง (X/Y homology group) แต่จะให้ขนาดของผลผลิต PCR ที่แตกต่างกัน เนื่องจาก intron ของยีนเหล่านี้บนโครโมโซมเพศทั้งสองแท่งมีขนาดที่แตกต่างกัน โดยยีนที่นิยมใช้จำแนกเพศ ได้แก่ ยีน *ZFX/ZFY* (zinc-finger protein, X/Y-linked) (Poloumienko *et al*., 2004; Morin *et al*., 2005) และ ยีน *AMELX/Y* (amelogenin, X/Y-linked) (Ennis and Galagher, 1994; Pfeiffer *et al*., 2005; Pajarez *et al*., 2007; Mace *et al*., 2008; Gurgul *et al*., 2009) เมื่อนำไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนเหล่านี้มาใช้จะปรากฏแถบผลผลิต PCR สองแถบโดยมีขนาดที่แตกต่างกันในตัวอย่างเพศผู้ และปรากฏแถบผลผลิต PCR เพียงแถบเดียวในตัวอย่างเพศเมีย อย่างไรก็ตามในสัตว์บางชนิดมีความแตกต่างดังกล่าวน้อยมากความแตกต่างของแถบผลผลิต PCR ไม่ชัดเจนจึงทำให้สามารถแปรผลได้ยาก

สัตว์ตระกูลกวางมีการพัฒนาไพรเมอร์หลายชุดเพื่อใช้ในการจำแนกเพศ (Yamauchi *et* al.,2000; Pfeiffer *et al*., 2005; Emiko *et* al., 2006; Brinkman and Hundertmark, 2008) โดยในการศึกษานี้เลือกใช้ชุดไพรเมอร์จากการศึกษาของ Yamauchi *et al*. (2000)

6. ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (Polymerase chain reaction) หรือ PCR

ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (polymerase chain reaction) หรือ PCR เป็นวิธีที่สามารถเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) จากต้นแบบเพียงหนึ่งหรือสามชุด เป็นจำนวนหลายล้านชุดได้ ปัจจุบัน PCR มีการพัฒนาไปใช้ในหลายรูปแบบ ซึ่งในการศึกษานี้มีการใช้สองรูปแบบด้วยกัน คือ singleplex PCR หรือการทำ PCR โดยใช้ไพรเมอร์เพียงหนึ่งคู่ในหนึ่งปฏิกิริยา และวิธี multiplex PCR หรือการใช้ไพรเมอร์มากกว่าหนึ่งคู่ในการทำ PCR

6.1 Singleplex PCR

เป็นวิธีการเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอเฉพาะส่วนอย่างจำเพาะ โดยปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นในหลอดทดลอง หรือเป็นการจำลองการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ (DNA replication) ในร่างกายนั่นเอง โดยเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส (DNA polymerase) จะสร้างสายดีเอ็นเอต้นแบบ โดยต่อสายดีเอ็นเอจากไพรเมอร์ โดยไพรเมอร์ทั้งสองเส้นจะ hybridize หรือ annealing กับดีเอ็นเอเส้นตรงข้าม เนื่องจาก complementary กัน และถ้ามีเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรสอยู่ จะเกิดการสร้างสายดีเอ็นเอ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ต่อจากปลาย 3’ ของไพรเมอร์ในทิศทาง 5’ ไป 3’ การสร้างสายดีเอ็นเอสามารถทำซ้ำได้อีกโดยทำให้ร้อนที่ 90-95 °C สายดีเอ็นเอต้นแบบจะแยกออกเป็นสายเดี่ยว (denaturation) เมื่ออุณหภูมิลดลงถึงอุณหภูมิที่เหมาะสม ไพรเมอร์จะสามารถ hybridize กับดีเอ็นเอต้นแบบสายเดี่ยว ทั้งเส้นเก่าและเส้นที่เพิ่งจะสร้างใหม่ จากนั้น DNA polymerase จะเริ่มทำการสร้างดีเอ็นเอเส้นใหม่ ซึ่งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่จะเพิ่มขึ้นเป็นทวีคูณ ในปัจจุบันกระบวนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอทำได้อย่างอัตโนมัติ โดยใช้เครื่อง Thermal cycle ซึ่งปฏิกิริยา PCR ประกอบไปด้วยส่วนประกอบต่างๆ คือ ดีเอ็นเอต้นแบบ, primer, dNTP, buffer และ DNA polymerase (ทวีศักดิ์, 2541)

6.2 Multiplex PCR (Edwards and Gibbs, 2010)

คือปฏิกิริยา PCR ที่สามารถเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอได้หลายตำแหน่งจากดีเอ็นเอต้นแบบด้วยชุดของไพรเมอร์ที่ถูกออกแบบมาอย่างเหมาะสมภายในหนึ่งปฏิกิริยา เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการทำ PCR ธรรมดานั้น PCR ทั่วไปมักจะประสบปัญหา false-negative และ false-positive จากปัญหาการปนเปื้อนหรือตัวอย่างที่นำมาใช้มีคุณภาพของดีเอ็นเอที่ไม่ดีพอ ซึ่งการทำ multiplex PCR ด้วยชุดของไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนในหลายๆส่วน จะช่วยลดปัญหาความคลาดเคลื่อนเหล่านี้ได้ เนื่องจากการใช้ไพรเมอร์หลายชุดจะเป็นตัวควบคุมคุณภาพของดีเอ็นเอต้นแบบอย่างซึ่งกันและกัน และยังช่วยประหยัดสารเคมีรวมถึงเวลาที่ใช้ในการทำงาน การพัฒนาวิธี multiplex PCR นั้นเดิมทีเริ่มมาจากการทำ singleplex PCR และพัฒนาโดยใช้ชุดของไพรเมอร์สองชุดทำปฏิกิริยาร่วมกันในหลอดเดียวกัน การออกแบบไพรเมอร์เพื่อใช้ในการทำ multiplex PCR เป็นสิ่งสำคัญ เพราะหากไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้ไม่จำเพาะต่อตำแหน่งที่ต้องการ หรือการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นโครงสร้างทุติยภูมิและการสมกันของไพรเมอร์ อาจจะไปเพิ่มชิ้นของดีเอ็นเอในส่วนอื่นที่ไม่ต้องการ หรือจะไปลดปริมาณชิ้นดีเอ็นเอที่ควรจะได้จากการทำปฏิกิริยาที่ถูกต้อง โดยสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาขึ้นอยู่กับไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้

7. การแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis)

อิเล็กโทรโฟรีซิสเป็นเทคนิคที่ใช้แยกโมเลกุลของสารที่มีประจุออกจากกันโดยใช้กระแสไฟฟ้าในการแยก โดยให้สารที่มีประจุนั้นเคลื่อนที่ผ่านตัวกลางในสารละลาย สารที่มีประจุต่างกันก็จะเคลื่อนที่ไปกันในทิศทางที่ตรงกันข้ามกัน ซึ่งโมเลกุลของดีเอ็นเอประกอบด้วยหมู่ฟอสเฟตเป็นจำนวนมาก สารละลายดีเอ็นเอจึงมีประจุเป็นลบใน pH ที่เป็นกลาง และเนื่องจากหมู่

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ฟอสเฟตเป็นองค์ประกอบหลักของนิวคลีโอไทด์ ดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กจึงมีหมู่ฟอสเฟตน้อยกว่าดีเอ็นเอที่มีโมเลกุลใหญ่กว่า ดังนั้นจะเห็นได้ว่าประจุต่อมวลโมเลกุลของดีเอ็นเอทุกขนาดมีค่าเท่ากัน ทำให้ความเร็วในการเคลื่อนที่ของโมเลกุลดีเอ็นเอบนตัวกลางจึงขึ้นอยู่กับขนาดเป็นหลัก นอกจากประจุแล้วการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอยังขึ้นอยู่กับขนาดของโมเลกุล รูปร่างของดีเอ็นเอ (DNA configuration) แรงเคลื่อนไฟฟ้า (voltage) เปอร์เซ็นต์ และชนิดของเจล รวมถึงสารละลายตัวกลางที่ใช้ด้วย

อะกาโรสเจล (agarose gel) เป็นโพลีเมอร์ของ D-galactose สลับกับ 3,6-anhydrogalactose แยกได้จากวุ้น (agar) เนื่องจากอะกาโรสเจลจับตัวกับสารต่างๆได้น้อยมาก จึงนิยมใช้ในการทำอิเล็กโทรโฟริซิส การแยกโมเลกุลของดีเอ็นเอส่วนมากจะนิยมใช้อะกาโรสเจลเป็นส่วนใหญ่ เพราะมีช่วงที่ใช้ได้มากกว่า สามารถทำการเตรียมได้ง่ายและไม่เป็นอันตรายมากนัก โดยส่วนมากนิยมทำในแนวราบ (horizontal gel) (สุรินทร์, 2545)

8. การหาลำดับเบส (DNA sequencing)

เทคนิคในการหาลำดับเบสของดีเอ็นเอมี 2 วิธี คือการหาลำดับเบสโดยการติดฉลากที่ปลายดีเอ็นเอ และใช้สารเคมีทำลายนิวคลีโอไทด์ ในตำแหน่งที่มีความจำเพาะต่อชนิดของเบส (sequencing of end-labelled DNA by base-specific chemical clevage) โดยอาศัยหลักการใช้สารเคมีปรับเปลี่ยนเบสของดีเอ็นเอ เช่นการเติม methyl group ในตำแหน่งที่จำเพาะต่อเบสบางตำแหน่ง ซึ่งเบสจะถูกปรับเปลี่ยนหรือถูกทำลายไปจนเหลือเพียง deoxyribose ซึ่งจะถูกทำลายต่อไปจนเกิดการขาดของสายดีเอ็นเอ ในตำแหน่งของเบสดังกล่าว ทั้งนี้เราสามารถติดตามดีเอ็นเอด้วยการติดสารกัมมันตรังสี เช่น ฟอสฟอรัส -32 (^{32}P) ซึ่งขนาดของดีเอ็นเอสามารถแยกได้โดยการใช้ไฟฟ้ากระแสตรงใน polyacrylamide gel และลำดับเบสสามารถอ่านได้จากแถบที่ปรากฏบนแผ่นฟิล์มเอกซเรย์

ในขณะที่อีกวิธีจะเป็นการหาลำดับเบสของดีเอ็นเอโดยใช้เอนไซม์เพื่อสร้างดีเอ็นเอสายใหม่ จากดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA sequencing by enzymatic synthesis) อาศัยหลักการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่จากดีเอ็นเอต้นแบบสายเดี่ยวโดยการทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase และนิวคลีโอไทด์ที่ติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสี ซึ่งการสิ้นสุดการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่จะเกิดขึ้นในตำแหน่งของ dideoxy nucleotide จึงเรียกวิธีการนี้ว่า dideoxy chain termination สำหรับปัจจุบันวิธีที่ใช้อยู่

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

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

9. การหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (construction of phylogenetic tree) (Nei, 1996)

ปัจจุบันการศึกษาวิวัฒนาการ โดยอาศัยความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากลำดับนิวคลีโอไทด์หรือจากลำดับโปรตีน ถือเป็นวิธีการสำคัญสำหรับศึกษาวิวัฒนาการในสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ ตั้งแต่แบคทีเรียไปจนถึงมนุษย์ ซึ่งนำความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์หรือโปรตีนในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดมาใช้ในการจัดจำแนก ความแตกต่างในระดับโมเลกุลนี้ทำให้นักวิจัยสามารถศึกษาลงไปในเชิงลึกตั้งแต่ระดับสิ่งมีชีวิตในกลุ่มเดียวกัน วงศ์เดียวกัน ชนิดย่อยเดียวกัน จนถึงความแตกต่างในระดับบุคคล

การสร้างต้นไม้ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการหรือทางพันธุกรรม (phylogenetic tree) โดยใช้หลักทางสถิติ เริ่มต้นมาจากการใช้ข้อมูลความแตกต่างจากลักษณะที่แสดงออกภายนอกของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ (morphological character) ตลอดจนความแตกต่างกันของความถี่ของยีน (gene frequency) ในการศึกษาพันธุศาสตร์ประชากร โดยหลักการสร้างต้นไม้พันธุกรรม ประกอบไปด้วยหลักการหลักๆ สองหลักการ โดยหลักการแรก คือ การประเมิน รูปแบบการแตกกิ่งสาขาของต้นไม้ (topology) และข้อที่สองคือ การประเมินและเปรียบเทียบความยาวของกิ่งก้านที่แยกออกไป ซึ่งความยาวของกิ่งก้านที่แตกออกมานั้นสามารถหาได้จากการใช้สถิติเข้าร่วมวิเคราะห์ ซึ่งวิธีการประเมินรูปแบบการแตกกิ่ง ความยาวของกิ่งก้าน จนสร้างออกมาเป็นต้นไม้ที่สมบูรณ์มีวิธีหลักๆ 3 วิธี คือ distance method likelihood method และ parsimony method

distance methods เป็นวิธีการสร้างต้นไม้โดยทำการคำนวณเปรียบเทียบในทุกๆลำดับนิวคลีโอไทด์ หรือโปรตีน โดยอาศัยหลักการของวิธี least square และ minimum evolution ซึ่งเป็นการประเมินจำนวนความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์หรือโปรตีนในแต่ละตำแหน่งของข้อมูล

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

maximum likelihood (ML) เป็นการสร้างต้นไม้โดยกำหนดสมมติฐาน ในที่นี้เปรียบเสมือนการสมมุติโมเดล (model) ของต้นไม้ตามการศึกษาที่แตกต่างกัน ตามผู้ใช้กำหนด และทำการจัดสร้างต้นไม้จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์หรือลำดับโปรตีนโดยพิจารณาจาก ต้นไม้ที่มีความน่าจะเป็นที่ตรงกับโมเดลที่เราเลือกไว้มากที่สุด

maximum parsimony (MP) เป็นวิธีการสร้างต้นไม้โดยทำการสร้างต้นไม้ที่มีการแตกกิ่งในทุกๆรูปแบบที่เกิดขึ้นได้จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์หรือโปรตีนที่ทำการศึกษา และมีการให้คะแนนต้นไม้แต่ละแบบโดยพิจารณาจากความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์หรือโปรตีนที่ทำการเปรียบเทียบ หากมีความแตกต่างมากคะแนนของต้นไม้นั้นจะสูง ซึ่งวิธีนี้จะทำการเลือกต้นไม้ที่มีคะแนนน้อยที่สุดนั่นคือเลือกการเปรียบเทียบข้อมูลเพื่อให้เกิดความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์หรือโปรตีนที่น้อยที่สุดนั่นเอง

แต่ละวิธีมีหลักการใช้งานที่แตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับธรรมชาติของข้อมูลที่ทำการศึกษาซึ่งผู้ใช้การจำเป็นที่จะต้องเลือกวิธีที่เหมาะสมกับการใช้งานกับข้อมูลของผู้ทำการศึกษาเอง

สำหรับการทดสอบความน่าเชื่อถือของต้นไม้ที่สร้างขึ้น วิธี bootstrap test เป็นวิธีหนึ่งที่เป็นวิธีมาตรฐานในการทดสอบความน่าเชื่อถือ วิธีนี้เป็นการสุ่มข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์หรือโปรตีน และทำการสร้างต้นไม้ขึ้นมาใหม่โดยทำซ้ำหลายๆรอบและแสดงค่าความน่าจะเป็นในการเกิดรูปแบบของต้นไม้นั้นๆออกมาเมื่อเทียบกับจำนวนรอบในการทำซ้ำที่ผู้ศึกษาทำการกำหนด โดยหากค่า bootstrap มีค่าสูง (มากกว่า 95) ถือว่าต้นไม้ที่ถูกสร้างขึ้นมานั้นมาความน่าเชื่อถือสูง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. หลอดเก็บตัวอย่างเลือดชนิดป้องกันการแข็งตัวของเลือด (EDTA tube)
2. หลอดเก็บตัวอย่างมูลที่บรรจุสารละลาย D-solution
3. เครื่องปั่นแยกตะกอน Centrifugation, DENVILLE 260D (DENVILLE Scientific. Inc, USA)
4. เครื่องแห้งตะกอน Dry bath incubation (Major Science Inc, Taiwan)
5. เครื่องถ่ายภาพเจล Gel documentation (Alphadigidoc™, EEC)
6. Gel electrophoresis Gelmate 200 (TOYOBO®, Japan)
7. เครื่องกำเนิดแสง U.V. Electronic U.V. Transilluminator (Alphadigidoc™, EEC)
8. เครื่องปฏิกิริยา PCR, PTC-200 (Peltier Thermal Cycler machine, USA)
9. เครื่องคอมพิวเตอร์
10. โปรแกรมวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ MEGA version 4.1 (Tamura, 1993)
11. โปรแกรมวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ Bioedit version 7.0.9.0. (Hall, 1997)
12. โปรแกรมวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ DnaSP version 5.10 (Rozas, 1995)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิธีการ

1. การเก็บตัวอย่าง

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้แบ่งออกเป็นสองส่วน ได้แก่ ตัวอย่างเลือดเพื่อใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมบนโครโมโซมวาย และส่วนที่สองคือ มูลละมั่งเพื่อใช้ในการพัฒนาชุดของไพรเมอร์เพื่อใช้ในการจำแนกเพศจากมูลละมั่ง

1.1 การเก็บตัวอย่างเลือด

ทำการเจาะเก็บตัวอย่างเลือดจากละมั่งชนิดย่อยพม่า โดยพิจารณาจากข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรมในส่วนของไมโดคอนเดรียดีเอ็นเอ (Dejchaisri, personal communicated) ซึ่งแบ่งตัวอย่างออกได้ 11 สายแม่ และเลือกเก็บตัวอย่างจาก 11 สายแม่ที่แตกต่างกันดังกล่าว และจากต่างสถานีเพาะเลี้ยงสัตว์ป่า และสวนสัตว์ เป็นจำนวนทั้งสิ้น 13 ตัวอย่าง จาก สถานีเพาะเลี้ยงสัตว์ป่า 4 แห่ง สวนสัตว์ 3 แห่ง และโครงการพัฒนาการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งในละมั่ง 1 แห่ง ดังนี้

1.1.1 สถานีเพาะเลี้ยงสัตว์ป่าห้วยขาแข้ง จังหวัดอุทัยธานี

1.1.2 สถานีเพาะเลี้ยงสัตว์ป่าห้วยทราย จังหวัดเพชรบุรี

1.1.3 สถานีเพาะเลี้ยงสัตว์ป่าเขาประทับช้าง จังหวัดราชบุรี

1.1.4 สถานีเพาะเลี้ยงสัตว์ป่ากระบกคู่ จังวัดสระแก้ว

1.1.5 สวนสัตว์เปิดเขาเขียว จังหวัดชลบุรี

1.1.6 สวนสัตว์เชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่

1.1.7 สวนสัตว์นครราชสีมา จังหวัดนครราชสีมา

1.1.8 โครงการพัฒนาการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งในละมั่ง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กำแพงแสน จังหวัดนครปฐม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สำหรับตัวอย่างเลือดละมั่งชนิดย่อยไทย จากที่ได้กล่าวมาข้างต้นว่าประชากรละมั่งชนิดย่อยไทย ในประเทศไทยมีอยู่สองแห่งด้วยกัน คือ สวนสัตว์ดุสิต องค์การสวนสัตว์ในพระบรมราชูปถัมภ์ และจากสถานีเพาะเลี้ยงสัตว์ป่าบางละมุง จังหวัดชลบุรี ซึ่งจากการซักประวัติ พบว่าละมั่งเพศผู้จากสองแห่งนี้มีที่มาที่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงเจาะเลือดละมั่งจากสวนสัตว์ดุสิต 3 ตัวอย่าง และจากสถานีเพาะเลี้ยงสัตว์ป่าบางละมุง 1 ตัวอย่าง รวมทั้งสิ้น 4 ตัวอย่าง

ในการศึกษานี้ได้มีการเจาะเลือดเนื้อทราย (*Axis porcinus*) เพื่อศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บนโครโมโซมวาย และนำมาเปรียบเทียบกับข้อมูลที่ได้จากละมั่ง เพื่อใช้ในการออกแบบไพรเมอร์สำหรับใช้ในการจำแนกเพศโดยมีจุดประสงค์ที่จะใช้ในสัตว์สองชนิดนี้

ทำการเจาะเลือดจาก เส้นเลือดดำบริเวณคอ (Jugular vein) ด้วยวิธีที่ปราศจากเชื้อ (Sterile technique) เลือดที่เจาะได้เก็บไว้ในหลอด EDTA เพื่อป้องกันการแข็งตัวของเลือด จากนั้นตัวอย่างเลือดส่วนหนึ่งจะไปวิเคราะห์ค่าทางโลหิตวิทยาและชีวเคมี และอีกส่วนจะถูกเก็บไว้ในสารละลาย D-solution (ภาคผนวก ก) ประมาณ 300 µl ผสมให้เข้ากัน และเก็บไว้ที่ -20 °C เพื่อรอการสกัดดีเอ็นเอต่อไป

1.2 การเก็บตัวอย่างมูล

ตัวอย่างมูลละมั่งจะทำการเก็บจากกรงเลี้ยงจากโครงการพัฒนาการผสมเทียมละมั่งโดยน้ำเชื้อแช่แข็ง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จังหวัดนครปฐม และจากสถานีเพาะเลี้ยงสัตว์ป่าภูเขียว จังหวัดชัยภูมิจำนวน 6 ตัวอย่างโดยเป็นมูลจากละมั่งเพศผู้ 1 ตัวอย่างและเป็นละมั่งเพศเมีย 5 ตัวอย่าง

นอกจากนี้ในการศึกษานี้ได้ทำการเก็บมูลเนื้อทราย จากกรงเลี้ยงในโครงการพัฒนาการผสมเทียมละมั่งโดยน้ำเชื้อแช่แข็ง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จังหวัดนครปฐม จำนวน 2 ตัวอย่างโดยตัวอย่างมูลเป็นเพศผู้ 1 ตัวอย่างและเพศเมีย 1 ตัวอย่าง จากกรงเลี้ยงในสถานีเพาะเลี้ยงสัตว์ป่าภูเขียว 4 ตัวอย่างโดยเป็นเพศผู้ 1 ตัวอย่างและเพศเมีย 3 ตัวอย่าง รวมทั้งสิ้น 6 ตัวอย่าง และทำการเก็บมูลสดจากเนื้อทรายที่ปล่อยคืนสู่ธรรมชาติไป 48 ตัวอย่าง โดยเก็บมูล 3-4 ก้อนแช่ในน้ำยาเก็บมูล DETs Buffer (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 20 มล. (Frantzen *et al*., 1998)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. การสกัดดีเอ็นเอ

2.1 การสกัดดีเอ็นเอจากเลือดใช้วิธี Phenol-chloroform

โดยใช้ตัวอย่างเลือดที่อยู่ในหลอด EDTA 100 µl ผสมกับสารละลาย D-solution 300 µl เขย่าจนเลือดผสมกับสารละลายประมาณหนึ่งนาที จากนั้นทำการเติมคลอโรฟอร์ม (chloroform) 150 µl และ ฟีนอล (phenol) (pH 7.9) 150 µl ในอัตราส่วน 1:1 เขย่าให้เข้ากันนาน10 นาที แล้วนำไปปั่นตกตะกอนที่ 13,000 G นาน 5 นาที ดูดเฉพาะส่วนใสด้านบนใส่ในหลอดใหม่ และเติมคลอโรฟอร์ม และ ฟีนอล (pH 7.9) อีกครั้ง เขย่าให้เข้ากันนาน 10 นาที ปั่นให้ตกตะกอนที่ 13,000 G นาน 5 นาที ดูดเฉพาะส่วนใสใส่หลอดใหม่ จากนั้นทำการเติม Absolute ethanol เป็น 2 เท่าของปริมาณส่วนใสที่ดูดได้ ผสมให้เข้ากันและนำไปเก็บไว้ที่ -80 °C นาน 20-30 นาที และนำไปปั่นให้ตกตะกอนที่ 13,000 G นาน 10 นาที เทส่วนใสด้านบนทิ้ง และทำการล้างตะกอนที่ได้ด้วย75% ethanol 700 µl 2-3 ครั้ง ปั่นให้ตกตะกอนที่ 13,000 G นาน 5 นาที เทส่วนใสทิ้งและปล่อยให้แห้ง เมื่อตะกอนแห้งดีแล้ว ทำการละลายด้วย TE buffer 15 µl (ภาคผนวก ก) และเก็บดีเอ็นเอที่ได้ไว้ที่ -20 °C ก่อนที่จะนำไปวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป

2.2 การสกัดดีเอ็นเอจากมูล

การสกัดดีเอ็นเอจากมูลนั้นประยุกต์จากวิธีการสกัดดีเอ็นเอจากมูล โดยดูดของเหลวจากหลอดที่บรรจุตัวอย่างมูล 1.5 ml ใส่ลงในหลอด 2 ml จากนั้นทำการปั่นให้ตกตะกอนที่ 13,000 G นาน 15 นาที เทสารละลายส่วนบนทิ้ง และเติมสารละลาย L1 (Lysis buffer) (ภาคผนวก ก) ให้ได้ปริมาตร 1.5 ml vortex ให้เข้ากันและนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 56 °C ข้ามคืน จากนั้นนามาปั่นที่ 5,000 G นาน 10 วินาที ทำการดูดสารละลายส่วนบนประมาณ 750 µl ย้ายใส่หลอดขนาด 2 ml ใหม่ที่มีการเติม silica 50 ul (ภาคผนวก ก) และ L1 buffer 250 µl รอไว้แล้ว vortex ให้เข้ากันและเขย่าทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง นำไปปั่นที่ 13,000 G นาน 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนด้วย L2 buffer (ภาคผนวก ก) 1 ml และปั่นให้ตกตะกอนที่ 10,000 G นาน 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง และทำการล้างด้วย L2 อีกครั้ง และล้างตะกอนด้วย 70% ethanol 1 ml vortexให้เข้ากันและปั่นที่ 10,000 G นาน 1 นาที สองรอบเช่นเดียวกัน ทิ้งส่วนใส และทิ้งตะกอนให้แห้ง ก่อนใช้งานทำการเติม TE buffer 30-60 µl เพื่อเป็นการละลายดีเอ็นเอนำไปปั่นอีกหนึ่งครั้ง และเก็บดีเอ็นเอที่ละลายแล้วไว้ที่ -20 °C เพื่อนำไปใช้งานในขั้นตอนต่อไป

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3. การออกแบบไพรเมอร์

การออกแบบไพรเมอร์แบ่งออกเป็นสองชุดด้วยกัน โดยชุดของไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษาความหลากหลายบนโครโมโซมวาย อ้างอิงจากการศึกษาของ Nijman *et al.* (2008) และ Hellborg and Ellegren (2003) ซึ่งทำการออกแบบไพรเมอร์ ซึ่งมีตำแหน่งจำเพาะต่อตำแหน่ง exon ของยีนที่อยู่บนโครโมโซมวายในสัตว์หลายๆชนิดดังแสดงตำแหน่งที่จำเพาะของไพรเมอร์บนโครโมโซมวายไว้ในภาพที่ 1 ทำการศึกษาในยีน *DBY*, *SRY* และ *ZFY* โดยใช้ไพรเมอร์ทั้งสิ้น 8 คู่ โดยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการจับของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอต้นแบบ (annealing temperature) และขนาดของผลผลิต PCR ที่คาดว่าจะได้ ดังแสดงในตารางที่ 1

สำหรับการจำแนกเพศจากมูลนั้น ในการศึกษานี้ได้ทดสอบไพรเมอร์ซึ่งจำเพาะต่อยีน amelogenin ซึ่งมีรายงานว่าสามารถจำแนกเพศในกวางซิก้าได้ (Yamauchi *et al*., 2000) (SE47 และ SE48) ซึ่งแสดงรายละเอียดไว้ในตารางที่ 2

ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อโครโมโซมวายอีกคู่ (SEX1W และ SEX2W) ออกแบบจาก ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *DBY* ในละมั่งและเนื้อทรายที่ได้จากการศึกษานี้ และเปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่รายงานไว้ในกวางแดง (*Cervus elaphus*) (EU219377) โดยแสดงตำแหน่งของไพรเมอร์ที่ออกแบบใหม่ รวมถึงตำแหน่งที่เหมือนและแตกต่างกันเมื่อทำการเปรียบเทียบบางส่วนแสดงนี้ไว้ในภาพที่ 2 และ 3

ไพรเมอร์ DRA1W และ DRA2W จำเพาะต่อยีน MHC class II (Major histocompatibility complex, class II, DR alpha) ซึ่งเป็นยีนที่มีความสัมพันธ์กับความด้านทานโรคในสัตว์ โดยมีบางตำแหน่งที่พบแตกต่างในระดับชนิดย่อย (subspecies) และบางตำแหน่งมีลักษณะ conserved ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหลายชนิด โดยเฉพาะในสัตว์เคี้ยวเอื้อง (Sena *et al*., 2002) ซึ่งไพรเมอร์นี้จะใช้เป็นตัวควบคุมความสมบูรณ์ของปฏิกิริยา PCR โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ อุณหภูมิที่เหมาะสม และขนาดที่คาดว่าจะได้โดยประมาณแสดงไว้ในตารางที่ 2 ความเข้มข้นของสารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยาแสดงไว้ดังตารางผนวกที่ 1 และ2

4. การเพิ่มชิ้นดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยา PCR

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ในปฏิกิริยา PCR จะประกอบไปด้วยส่วนของ mixture ซึ่งประกอบไปด้วย deionized water 67.5 µl, 10x PCR buffer 10 µl, $MgCl_2$ 8 µl, 10mm dNTP 2 µl, forward และ reverse primer ความเข้มข้น 1 µM อย่างละ 1 µl และ Taq DNA polymerase 0.5 µl (Fermentas, USA) รวมทั้งสิ้น 90 µl และอีกส่วนคือดีเอ็นเอที่สกัดเก็บไว้ โดยผสม mixture กับ ดีเอ็นเอในอัตราส่วน mixture : DNA (9:1) ดังแสดงในตารางภาคผนวก ข1

ใช้เครื่องมือในการเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเออัตโนมัติ PTC-200 (Peltier Thermal Cycler machine, USA) โดยขั้นตอนในการปฏิบัติงานจะแตกต่างออกไปตามชุดของไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษาโดยรายละเอียดของการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมบนโครโมโซมวายแสดงไว้ดังตารางผนวก ข1 และรายละเอียดสำหรับการพัฒนาการจำแนกเพศจากมูลแสดงไว้ดังตารางผนวก ข2

5. การตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส

นำผลผลิต PCR (PCR product) ที่ทำผ่านเพิ่มจำนวนจากปฏิกิริยา PCR ตรวจสอบด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis (ภาคผนวก ก) โดยผสมผลผลิต PCR 4 µl กับ สีสำหรับผสมผลผลิต PCR เพื่อทำการตรวจสอบขนาดของผลผลิต PCR 4 µl และใส่ลงในหลุมบน agarose gel จากนั้นใช้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 30 นาที และนำไปย้อมใน ethidium bromide นาน 5 นาที นำขึ้นมาล้างด้วยน้ำสะอาดอีก 5 นาที แล้วนำมาอ่านผลด้วยเครื่อง gel documentation หรือ เครื่อง U.V. transilluminator โดยใช้ 100 bp ladder เป็น marker ทำการประเมินขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการ จากนั้นทำการตัดชิ้นดีเอ็นเอดังกล่าว

ทำดีเอ็นเอที่ได้ให้บริสุทธิ์โดยประยุกต์การใช้ silica ในการทำให้ชิ้นดีเอ็นเอบริสุทธิ์ เริ่มจากการตัดแถบดีเอ็นเอที่ต้องการจาก agarose gel บนเครื่องฉายแสง U.V. และใส่ชิ้น gel ที่ตัดได้ไว้ในหลอดขนาด 1.5 ml หลอดใหม่ที่เตรียมไว้ โดยควรทำการเปลี่ยนใบมีดที่ใช้ตัดใหม่ทุกครั้งที่ทำการตัด band ของดีเอ็นเอที่ได้อันใหม่เพื่อไม่ให้มีดีเอ็นเอปะปนกันในแต่ละตัวอย่าง และจะทำให้ผลการหาลำดับเบสคลาดเคลื่อน เมื่อทำการตัดเสร็จแล้วทำการเติมสารละลาย L1 ลงในหลอดที่บรรจุชิ้น gel ที่ตัดไว้แล้วปริมาณ 300 µl ทำการ vortex ให้เข้ากันและทิ้งไว้ใน heat box อุณหภูมิ 55 $^{\circ}C$ 2-3 นาทีสลับกับ vortex จนเนื้อ gel ที่ตัดไว้ละลายหมด

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เมื่อเนื้อ gel ละลายหมดแล้ว ทำการเติม silica 15-30 µl ตามความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่คาดว่าจะได้จากการทำให้บริสุทธิ์ นำไป เขย่าบนเครื่องเขย่านานครึ่งถึงหนึ่งชั่วโมง นำไปปั่นที่ 10,000 G นาน 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง จากนั้นทำการล้างตะกอนของ silica ด้วยสารละลาย L2 500 µl vortex ให้เข้ากัน และนำไปปั่นที่ 10,000 G 1 นาที โดยทำการล้างด้วยสารละลาย L2 สองครั้งและเทส่วนใสทิ้ง จากนั้นทำการล้างด้วย 70% ethanol 500 µl vortex ให้เข้ากัน และนำไปปั่นที่ 10,000 G นาน 1 นาที สองครั้งเช่นเดียวกันกับการล้างด้วยสารละลาย L2 เทส่วนใสทิ้ง และทิ้งให้ตะกอนแห้ง

เมื่อตะกอนแห้งดีแล้วทำการเติมสารละลาย TE ปริมาณ 20-50 µl (ตามความเข้มข้นของดีเอ็นเอ) เพื่อละลายดีเอ็นเอออกจาก silica ทำการ vortex ให้เข้ากันและ incubate ไว้ที่อุณหภูมิ 55 °C เพื่อให้ดีเอ็นเอละลายได้ดี 2-5 นาที และนำไปปั่นที่ 10,000 G นาน 2 นาที จากนั้นทำการดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่ไว้ (พึงระวังในการดูดส่วนใสไม่ควรมี silica ติดมาเพราะจะส่งผลต่อการหาลำดับเบส) เก็บไว้ที่ -20 °C รอการใช้งานต่อไป

6. การหาลำดับเบส (DNA sequencing)

ชิ้นดีเอ็นเอที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วจะเก็บไว้ในหลอดและส่งไปหาลำดับเบสโดยบริษัท 1st BASE Laboratories, Malaysia.

7. การเปรียบเทียบลำดับเบส (Alignment)

เมื่อได้ลำดับนิวคลีโอไทด์มา นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาทำการเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ใน Genbank (http://ncbi.nlm.nih.gov/) เพื่อตรวจสอบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มานั้น เป็นละมั่งจริง และใช้โปรแกรม Bioedt (http://www.mbio.ncsu.edu/Bioedit/bioedit.html) ในการเปรียบเทียบลำดับเบส เพื่อหาความแตกต่างและจัดกลุ่มให้กับจากละมั่ง โดยวิเคราะห์ในส่วนของยีน *DBY*, *SRY* และ *ZFY*

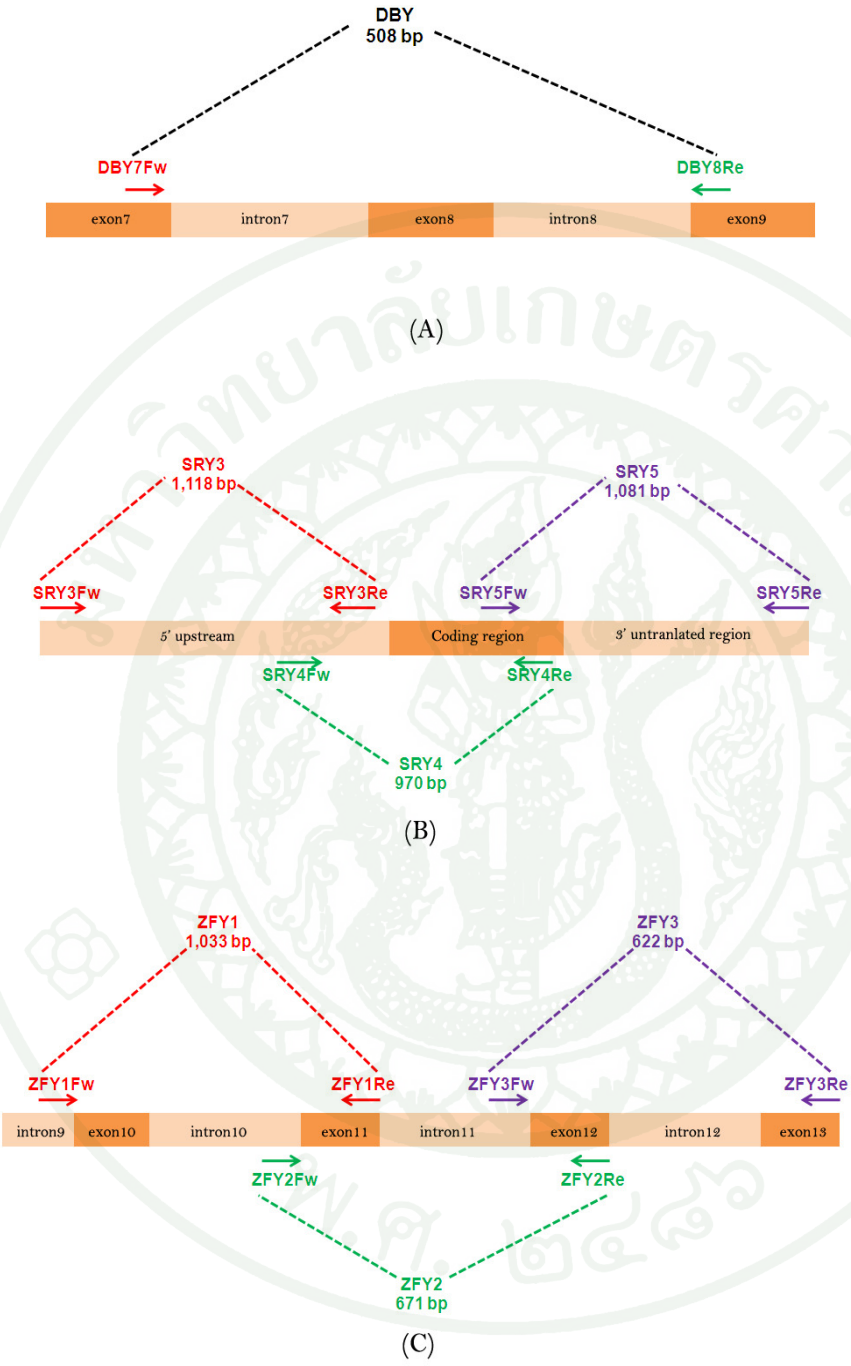
8. การหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของละมั่ง (phylogenetic tree)

ลำดับเบสทั้งหมดจะถูกนำมาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการทางพันธุกรรม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ด้วยโปรแกรม MEGA version 4.1 โดยใช้วิธี Neighbor-joining (NJ) และใช้ Maximum composite likelihood model ในการวิเคราะห์ ร่วมกับการทดสอบความน่าเชื่อถือของ tree ด้วย Bootstrap 10,000 รอบ และใช้โปรแกรม DnaSP 5.10 (Rozas, 1995) ในการหาค่า genetic distance

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 1 ภาพแสดงตำแหน่งของไพรเมอร์ ณ ตำแหน่งของยีนต่างๆบนโครโมโซมวาย โดย (A) แสดงตำแหน่งบนยีน *DBY*; (B) แสดงตำแหน่งบนยีน *SRY*; (C) แสดงตำแหน่งบนยีน *ZFY*

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 1 ตารางแสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการจับของไพรเมอร์ (annealing temperature) และขนาดของผลผลิต PCR ที่คาดว่าจะได้ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษา

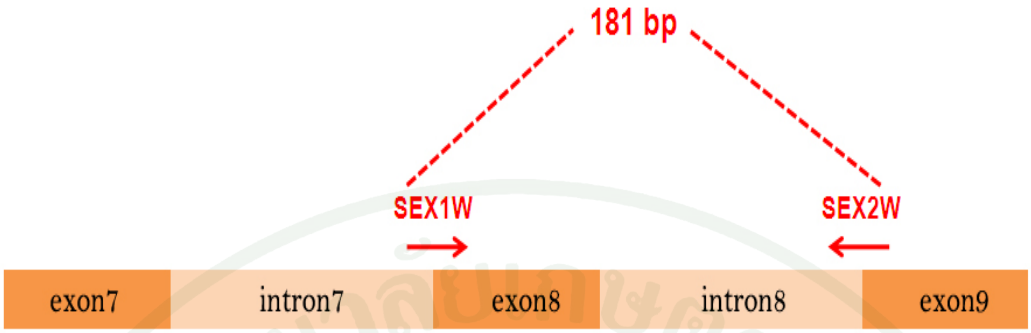
Name	Forward primer	Reverse primer	Condition Annealing (Ta)	Size (bp)
DBY7	GGTCCAGGAGARGCTTTGAA	CAGCCATTCTCTTGTTGGG	55 °C	508
DBY8	CCCCAACAAGAGAATGGCT	CAGCACCACCATAKACTACA	55 °C	508
ZFY1	CAGGTGAGGGCACATGAG	ATCACATTCGATGGCCTT	55 °C	1,033
ZFY2	ATATGCTTGAAGAGACGACAAC	AGTCAGAAGACAAATGTCACA	55 °C	671
ZFY3	TTCTAATTTGAAGACGCATGTG	CAACTTCTTTATGGTGTCGTG	55 °C	622
SRY3	AGCCTTTGAAGTTTCTACTGTC	CCCCAATACCTCCCCTCAATAC	55 °C	1,118
SRY4	GTCTGCTGCACCTTCATC	CTTATTGTGGCCCAGGCTTGTC	55 °C	970
SRY5	CCGGGCTATAAATATCGACCTC	GATGAAACCTTGGGTCTCACAG	55 °C	1,081

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 2 ตารางแสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการจับของไพรเมอร์ (annealing temperature) และขนาดของผลผลิต PCR ที่คาดว่าจะได้ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการจำแนกเพศจากมูล

Primer name	Sequences 5'-3'	Condition Annealing (Ta)	Size (bp)	Reference
SE47	CAGCCAAACCTCCCTCTGC	58 °C	220	Yamauchi, 2000
SE48	CCCGCTTGGTCTTGTCTGTTGC	58 °C	220	Yamauchi, 2000
DRA1W	CCCCCTTTCTTGTCTTTTCAGAG	55 °C	302	Sena, 2002
DRA2W	CAATTCCCAAGTCTAGGAGGACTG	55 °C	302	Sena, 2002
SEX1W	CTCTCCTTGGTTTTAGCCCCA	55 °C	181	This study
SEX2W	ACACTACACAAGGACGAACTC	55 °C	181	This study

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 2 ภาพแสดงตำแหน่งและขนาดของผลผลิต PCR ที่คาดว่าจะได้ของไพรเมอร์ SEX1W และ SEX2W ซึ่งออกแบบมาให้จำเพาะต่อยีน*DBY*

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพที่ 3 ภาพแสดงการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *DBY* บางส่วนระหว่างละมั่งชนิดย่อยพม่า ละมั่งชนิดย่อยไทย เนื้อทราย และกวางแดง (EU219377) และตำแหน่งของไพรเมอร์ SEX1W และ SEX2W ที่ออกแบบในการศึกษานี้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผลและวิจารณ์

1. ความหลากหลายบนโครโมโซมเพศผู้ในละมั่งชนิดย่อยไทยและชนิดย่อยพม่า

จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บนดีเอ็นเอจากยีนที่อยู่บนโครโมโซมเพศผู้ของละมั่ง ซึ่งประกอบไปด้วย ยีน *DBY* ในส่วนของ exon7 บางส่วน, intron7, eoxn8, intron8 และ exon9 บางส่วน ความยาวทั้งสิ้น 508 คู่เบส โดยปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาดดังกล่าวในตัวอย่างเพศผู้ และไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอในตัวอย่างเพศเมีย ดังแสดงไว้ในภาพที่ 4

ยีน *SRY* ปรากฏแถบดีเอ็นเอต่อไพรเมอร์ SRY3Fw และ SRY3Re ขนาด 1,118 คู่เบส ไพรเมอร์ SRY4Fw และ SRY4Re ขนาด 970 คู่เบส และไพรเมอร์ SRY5Fw และ SRY5Re ขนาด 1,081 คู่เบส โดยปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาดดังกล่าวในตัวอย่างเพศผู้ และไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอในตัวอย่างเพศเมีย ดังแสดงไว้ในภาพที่ 4

ยีน *ZFY* ปรากฏแถบดีเอ็นเอต่อไพรเมอร์ ZFY1Fw และ ZFY1Re ขนาด 1,033 คู่เบส ไพรเมอร์ ZFY2Fw และ ZFY2Re ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 671 คู่เบส และไพรเมอร์ ZFY3Fw และ ZFY3Re ขนาด 622 คู่เบส โดยปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาดดังกล่าวในตัวอย่างเพศผู้ และไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอในตัวอย่างเพศเมียเช่นเดียวกับยีน *DBY* และ *SRY* ดังแสดงไว้ในภาพที่ 4

และเมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ (alignment) ด้วยโปรแกรม Bioedit version 7.0 โดยเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในกลุ่มประชากรละมั่งชนิดย่อยพม่าด้วยกันเอง และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในกลุ่มละมั่งชนิดย่อยไทยด้วยกันเอง พบว่าไม่พบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในกลุ่มละมั่งชนิดย่อยพม่าด้วยกันเอง และในละมั่งชนิดย่อยไทยด้วยกันเอง การที่ไม่พบความแตกต่างบนโครโมโซมวายภายในกลุ่มประชากรละมั่งชนิดย่อยเดียวกัน

ผลที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาอื่นๆซึ่งรายงานว่าไม่พบความแตกต่างในระดับชนิดย่อยเดียวกัน (intraspecies) เช่น ลิงซิมแพนซี (Stone *et al.,* 2002) สุนัขป่า (Hellborg and Ellegren, 2004) แกะ (Meadows *et al*., 2004; Meadows and Kijas, 2005) ม้า (Lindgren *et al*., 2004) สัตว์ตระกูลแมว (Luo *et al*., 2007) และสัตว์ตระกูลวัว (Nijman *et al*., 2008) ซึ่งสาเหตุที่ทำให้ไม่พบความหลากหลายในโครโมโซมวายนั้นเกิดได้จาก ในขั้นตอนการวิวัฒนาการของโครโมโซมวาย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เนื่องจากโครโมโซมวายมีลักษณะเป็น heterozygous ดังนั้นการเกิด mutation จะส่งผลอย่างยิ่งต่อการสูญหายไปหรือคงอยู่ ขึ้นอยู่กับว่าโครโมโซมวายมีการ mutation ที่ส่งผลดีต่อการดำรงอยู่ของสัตว์ตัวนั้นหรือไม่ หากการ mutation ไม่ส่งผลดีต่อการดำรงชีวิตก็จะทำให้โครโมโซมนั้นหายไปจากธรรมชาติ (sweep selection และ background selection) และเซลล์อสุจิเป็นเซลล์ที่จำเป็นต้องพลังงานในการเคลื่อนที่ ซึ่งไมโตคอนเดรียมีส่วนในการกำเนิดพลังงานดังกล่าว ในกรณีที่มีความผิดปกติเกิดขึ้นในดีเอ็นเอจากไมโตคอนเดรียจะส่งผลให้เซลล์อสุจิของสัตว์ตัวนั้นไม่สามารถผสมกับเซลล์ไข่ได้ ทำให้โครโมโซมจากสัตว์ตัวนั้นไม่ได้ถ่ายทอดและสูญหายไปในที่สุด (Gemmell and Sin, 2002)

อีกสิ่งหนึ่งที่ทำให้โครโมโซมวายมีความหลากหลายต่ำคือ การที่ละมั่งเป็นสัตว์ที่มีระบบการผสมพันธุ์แบบ polygynous โดยละมั่งเพศผู้เพียงหนึ่งตัวสามารถผสมกับเพศเมียได้มากกว่าหนึ่งตัว ตามธรรมชาติละมั่งหนึ่งตัวจะผสมกับตัวเมียได้ 4-5 ตัว และตัวผู้หนึ่งตัวผสมกับตัวเมียได้ 14 ตัวจากการศึกษาในกรงเลี้ยง (บูรณพิมพ์, วิทยานิพนธ์2551) และในกรณีที่ประชากรแยกจากกันทำให้โอกาสที่จะมีการแลกเปลี่ยนโครโมโซมวายน้อยลงไปอีก

microsatellite marker สำหรับโครโมโซมวายจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งสำหรับใช้ในการศึกษาความหลากหลายบนโครโมโซมแท่งนี้ ซึ่งมีการศึกษาและพัฒนาการใช้ในคน (White *et al*., 1999; Ayub *et al*., 2000; Grignani *et al*., 2000; Gusmão *et al*., 2001; Hou *et al*., 2001; Iida *et al*., 2001; Mohyuddin *et al*., 2001) สำหรับการศึกษาในสัตว์ตระกูลวัวพบว่ามีความหลากหลายเมื่อใช้ microsatellite marker ในการศึกษาโครโมโซมวายใน วัว กระทิง กระบือปลัก และจามรี (Hanotte *et al*., 1997; Edward *et al*., 2000) แต่ไม่พบความหลากหลายในควายป่า (Nguyen *et al*., 2007) ดังนั้น microsatellite marker ที่จำเพาะต่อโครโมโซมวายอาจเป็นอีกทางเลือกหนึ่งเพื่อนำมาทดสอบและศึกษาความหลากหลายในละมั่ง

เมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์โดยเปรียบเทียบระหว่างละมั่งชนิดย่อยพม่าและละมั่งชนิดย่อยไทย บนยีน *DBY*, *SRY* และ *ZFY* ความยาวทั้งสิ้น 5,150 คู่เบส ด้วยโปรแกรม Bioedit version 7.0 พบว่ามีความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ จำนวนทั้งสิ้น 8 ตำแหน่ง และทำการเปรียบเทียบด้วยวิธี BLASTn (http://ncbi.nlm.nih.gov/) มีค่าความเหมือนและแตกต่างดังนี้ Score = 9241 bits (10248), Expect = 0.0, Identities = 5141/5150 (99%), Gaps = 3/5150 (0%)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ยีน *DBY* แตกต่างที่ตำแหน่ง C/T นิวคลีโอไทด์ ลำดับที่ 447 ยีน *SRY* แตกต่างที่ตำแหน่ง T/G นิวคลีโอไทด์ลำดับที่ 753 ในส่วนของ 5' promoter ยีน *SRY* ตำแหน่ง A/C นิวคลีโอไทด์ ลำดับที่ 2,071 และ 2 deletion นิวคลีโอไทด์ลำดับที่ 1,972 และ 1,973 ในส่วนของ 3' ของ coding region สำหรับส่วน coding region ของยีน *SRY* ไม่พบความแตกต่างระหว่างละมั่งชนิดย่อยทั้งสองชนิด ยีน *ZFY* แตกต่างที่ตำแหน่ง T/C ในลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 106, G/A ลำดับที่ 284, G/A ลำดับที่ 331 และ A/G ลำดับที่ 1,513 โดยความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าว อ้างอิงจากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนบนโครโมโซมวายซึ่งแสดงไว้ในภาพภาคผนวกที่ 1-5 และแสดงความแตกต่างไว้ในตารางที่ 4

ลำดับนิวคลีโอไทด์ทำการวิเคราะห์หาค่าระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) ระหว่างละมั่งชนิดย่อยพม่าและละมั่งชนิดย่อยไทย จากการศึกษานี้ โดยการวิเคราะห์แบบ Pairwise distance ด้วยโปรแกรม MEGA 4 version 4.1 แต่อย่างไรก็ตามเนื่องจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บนโครโมโซมเพศผู้ในสัตว์ป่าวงศ์กวางมีการศึกษาไม่มากนัก โดยเฉพาะสัตว์ป่าในประเทศไทยจึงทำให้หาข้อมูลมาเปรียบเทียบได้ยาก ในการเปรียบเทียบครั้งนี้จึงศึกษาในส่วนของ ยีน *DBY* ซึ่งทำการปรับแต่งลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อการใช้งาน โดยมีความยาว 120 คู่เบส และส่วน coding region ของยีน *SRY* ความยาว 690 คู่เบส โดยเปรียบเทียบข้อมูลดังกล่าวใน ละมั่งชนิดย่อยทั้งสองชนิด (this study), เนื้อทราย (*Axis porcinus*) (*DBY*, this study) (*SRY*, Acession number : AY244496) และกวางแดง (*Cervus elaphus*) (*DBY*, Acession number : EU219376) (*SRY*, Acession number : DQ888695) โดยใช้โค (*DBY*, *SRY*, Acession number : AC231520) เป็นสัตว์นอกกลุ่ม (out-group) ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวเมื่อนำมาตัดบางส่วนออกเพื่อเหมาะสมการใช้งานในโปรแกรมดังกล่าว จะเห็นได้ว่าละมั่งชนิดย่อยไทยและชนิดย่อยพม่ามีระยะห่างทางพันธุกรรมใกล้เคียงกันมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อทราย และกวางแดง โดยโคซึ่งเป็นสัตว์นอกกลุ่มจะมีระยะห่างออกไปจากชัดเจน ดังแสดงในตารางที่ 3

เมื่อทำการวิเคราะห์ต้นไม้พันธุกรรม (Phylogenetic tree) โดยวิธี Neighbor-joining (NJ) และใช้ Maximum composite likelihood model ในการวิเคราะห์ ร่วมกับการทดสอบความน่าเชื่อถือของ tree ด้วย Bootstrap 10,000 รอบ โดยทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบในยีน *DBY* และส่วน coding region ของยีน *SRY* รวมทั้งใช้ข้อมูลจากทั้งสองส่วนร่วมกัน โดยในการสร้างต้นไม้พันธุกรรมจากยีน *DBY* เพียงส่วนเดียวจะจัดกลุ่มให้ละมั่งชนิดย่อยพม่า ละมั่งชนิดย่อยไทย และกวางแดงอยู่กลุ่มเดียวกันและละมั่งชนิดย่อยไทยมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับละมั่งชนิดย่อยพม่า มากกว่า กวางแดงใน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ขณะที่เนื้อทรายอยู่ในกลุ่มที่แยกออกไปอยู่กลุ่มเดียวกับโค ซึ่งในการศึกษานี้เราคาดว่าเนื้อทรายควรจะถูกจัดกลุ่มเดียวกับละมั่งเนื่องจากเป็นสัตว์ในวงศ์กวางเหมือนกัน เมื่อทำการสร้างต้นไม้พันธุกรรมโดยใช้ส่วน coding region ของยีน *SRY* พบว่าละมั่งชนิดย่อยไทยและละมั่งชนิดย่อยพม่ากลุ่มเดียวกัน ส่วนกวางแดงและเนื้อทรายอยู่กลุ่มเดียวกัน โดยกวางทั้ง 4 ชนิดจะอยู่กลุ่มใหญ่เดียวกัน (สัตว์ตระกูลกวาง) อีกที และแยกออกจากโคชัดเจน และเมื่อนำข้อมูลจากทั้งสองยีนมาทำการสร้างต้นไม้พันธุกรรม พบว่าละมั่งชนิดย่อยไทยและละมั่งชนิดย่อยพม่าถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันและมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับกวางแดงมากกว่าเนื้อทราย โดยวัวจะมีความสัมพันธ์ห่างออกไปอย่างชัดเจน จะเห็นได้ว่าการใช้ยีนบนโครโมโซมวายเพียงยีนเดียวจากตัวอย่างข้างต้น จะเห็นได้ว่าต้นไม้พันธุกรรมที่ได้มีความสัมพันธ์ที่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงควรนำข้อมูลมารวมกันเพื่อแปรผล โดยต้นไม้ทางพันธุกรรมดังกล่าวแสดงไว้ในภาพที่ 5, 6 และ 7

จะเห็นได้ว่าลำดับนิวคลีโอไทด์บนโครโมโซมวายระหว่างละมั่งชนิดย่อยพม่าและละมั่งชนิดย่อยไทยมีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน แสดงให้เห็นว่าละมั่งสองชนิดย่อยนี้แยกจากกัน สอดคล้องกับการศึกษาในดีเอ็นเอจากไมโตคอนเดรีย (Balakrishnan *et al*., 2003) ซึ่งรายงานว่าละมั่งชนิดย่อยสองชนิดนี้ควรจัดกลุ่มให้ต่างชนิดย่อยกัน และสามารถใช้ความแตกต่างดังกล่าวเป็นหลักฐานหรือเครื่องหมายทางพันธุกรรม (genetic marker) ในการศึกษาวิวัฒนาการในสายพ่อของละมั่ง ซึ่งสามารถใช้ข้อมูลจากโครโมโซมวายในการศึกษาวิวัฒนาการในสายพ่อในสัตว์หลายชนิด เช่น ในสัตว์ตระกูลวัว (Nijman *et al*., 2008) แพะแกะ (Pidancier *et al*., 2006) สัตว์ตระกูลแมว (Johnson *et al*., 2006) สัตว์ตระกูลลิง (Tosi *et al*., 2003; Ting *et al*., 2008; Burrell *et al*., 2009) และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมในทะเล (Hatch *et al*., 2006; Nishida *et al*., 2007)

แม้ว่าละมั่งชนิดย่อยพม่า และชนิดย่อยไทยจะมีความแตกต่างทางพันธุกรรมอย่างชัดเจนทั้งในสายพ่อและสายแม่ แต่แนวความคิดในการผสมพันธุ์ข้ามชนิดย่อย (interbreed) ระหว่างสองชนิดย่อยนี้เป็นทางเลือกหนึ่งที่จะช่วยเพิ่มความหลากหลาย ลดภาวะเลือดชิด (inbreed depression) และทำให้ประชากรละมั่งคงอยู่ได้ในระยะยาว ตามรายงานในหลายการศึกษา (Hedrick, 1995; Madsen *et al*., 1999) อย่างไรก็ตามควรพิจารณาเรื่องความต้านทานโรคของประชากร หรือการนำพาโรคใหม่ๆ จะประชากรหนึ่งไปสู่อีกประชากรหนึ่งในสิ่งแวดล้อมใหม่ (Snyder *et al*., 1996)

จากการศึกษาเปรียบเทียบ karyotype ระหว่างละมั่งชนิดย่อยพม่าและละมั่งชนิดย่อยไทย พบว่าทั้งสองชนิดย่อย ไม่มีความแตกต่างกัน โดยมีโครโมโซมทั้งสิ้น 58 แท่ง (Tanomtong *et al*.,

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2008) ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีโอกาสที่ละมั่งชนิดย่อยสองชนิดนี้สามารถผสมข้ามพันธุ์กันได้ นอกจากนี้มีรายงานการเกิดลูกผสมระหว่างละมั่งสองชนิดย่อยนี้ในกรงเลี้ยง โดยที่ลูกผสมตัวนี้ไม่เป็นหมัน (Decoux, 1994) ด้วยเหตุนี้เองจึงมีแนวความคิดที่จะผสมข้ามระหว่างละมั่งสองชนิดย่อยนี้เพื่อลดภาวะเลือดชิดในละมั่งชนิดย่อยไทยในสวนสัตว์ (Mauget *et al*., 2001) ในกรณีที่ประชากรละมั่งชนิดย่อยไทย ทั้งในกรงเลี้ยงและในธรรมชาติมีแนวโน้มลดจำนวนลง และเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะเลือดชิดในที่สุด แต่อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาของ Balakrishnan (2003) ได้โต้แย้งการผสมข้ามชนิดย่อย ด้วยเหตุผล ดังนี้ 1. ประชากรละมั่งชนิดย่อยพม่าและไทยมีความแตกต่างทางพันธุกรรมอย่างชัดเจน 2. ละมั่งทั้งสองชนิดนี้ยังคงมีประชากรบางส่วนอยู่ในป่า 3. ยังไม่มีการศึกษาสถานะทางพันธุกรรมในประชากรที่อยู่ในป่า

จากการศึกษาความหลากหลายในโครโมโซมวายแสดงความสัมพันธ์ทางสายพ่อในการศึกษาครั้งนี้ เป็นข้อมูลที่สนับสนุนว่าละมั่งสองชนิดย่อยนี้ควรอนุรักษ์ไว้เป็นชนิดย่อยสองชนิด ประกอบกับในการศึกษานี้ทำการศึกษาเฉพาะตัวอย่างในกรงเลี้ยงในประเทศไทยเท่านั้น สำหรับประชากรละมั่งชนิดย่อยพม่ามีประชากรอยู่ในป่าแถบประเทศพม่า และละมั่งชนิดย่อยไทยยังมีประชากรอยู่ในประเทศกัมพูชา เวียดนาม และลาว ซึ่งยังไม่มีการศึกษาความหลากหลายในประชากรเหล่านี้ ซึ่งอาจจะพบแหล่งพันธุกรรมแหล่งใหม่เพื่อมาเพิ่มความหลากหลายให้กับประชากรในประเทศไทย การศึกษานี้จึงคัดค้านการผสมข้ามชนิดย่อยจนกว่าจะมีการศึกษาเพิ่มเติมดังที่ได้กล่าวมา

2. การพัฒนาชุดของไพรเมอร์สำหรับใช้ในการจำแนกเพศจากมูลละมั่งและเนื้อทราย

2.1 ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน amelogenin (SE47 และ SE48)

สำหรับไพรเมอร์ SE47 และ SE48 เมื่อทดสอบกับตัวอย่างเลือดละมั่งและเนื้อทราย โดยใช้ใช้เลือดโคเป็นตัวควบคุม โดยทดสอบทั้งในเพศผู้และเพศเมีย จะเห็นได้ว่าในละมั่งและเนื้อทรายทั้งเพศผู้และเพศเมียปรากฏแถบผลผลิต PCR เพียงแถบเดียว ขนาดประมาณ 220 คู่เบส เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างโค โดยโคเพศผู้จะปรากฏแถบผลผลิต PCR 2 แถบขนาด 270 คู่เบสและ 220 คู่เบส และเพศเมียจะปรากฏแถบผลผลิต PCR ขนาด 270 คู่เบสเพียงแถบเดียว ดังแสดงไว้ในรูปที่ 8

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

แม้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน amelogenin จะสามารถจำแนกเพศในโค (Ennis and Galagher, 1994) แกะ (Pfeiffer *et al*., 2005) กวาง (Yamauchi *et al*., 2000; Gurgul *et al*., 2009) สัตว์เคี้ยวเอื้อง (Pajares *et al*., 2007) และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมทางทะเล (Mace *et al*., 2008) ได้ ซึ่งความแตกต่างดังกล่าวเกิดในส่วน intron ของยีน amelogenin จากโครโมโซมทั้งสองแท่ง แต่จากการศึกษานี้พบว่าไม่สามารถใช้จำแนกเพศในละมั่งและเนื้อทรายได้ แสดงให้เห็นว่า intron ของยีนนี้มีขนาดที่ไม่แตกต่างกันในละมั่งและเนื้อทราย แม้แต่ในคนเองมีความแตกต่างของผลิตผล PCR ของยีนนี้เพียง 6 คู่เบส สำหรับการแยกเพศจึงต้องใช้เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ยุ่งยาก นอกจากนี้ปัจจุบันมีรายงานพบว่ามีการสูญหาย (deletion) ของยีน *AMELY* ในคนบางกลุ่มประชากร ทำให้เกิดการผิดพลาดในการตรวจยืนยันเพศในคน และเป็นปัญหาในการนำมาใช้ในงานด้านนิติวิทยาศาสตร์ (Kumagai *et al*., 2008) อย่างไรก็ตามในสัตว์ยังไม่มีรายงานการสูญหายของยีน *AMELY* ดังกล่าว

2.2 ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากยีน *DBY* (SEX1W และ SEX2W)

เมื่อทดสอบไพรเมอร์ SEX1W และ SEX2W กับตัวอย่างเลือดที่ทราบเพศทั้งในละมั่งและเนื้อทราย ให้ผลบวกกับไพรเมอร์นี้ในตัวอย่างเพศผู้ โดยปรากฏผลผลิต PCR ขนาด 181 คู่เบสในตัวอย่างดีเอ็นเอเพศผู้ทั้งในละมั่งและเนื้อทราย และไม่ปรากฏแถบผลผลิต PCR ดังกล่าวในตัวอย่างละมั่งและเนื้อทรายเพศเมีย ดังแสดงในภาพที่ 8

แม้ว่าการทำ PCR โดยใช้ชุดของไพรเมอร์สองชุดร่วมกัน (multiplex PCR) จะช่วยประหยัดเวลาและสารเคมีในการใช้งาน แต่จำเป็นต้องผ่านการพัฒนาและปรับเปลี่ยนปฏิกิริยาเพื่อให้เหมาะสมกับการใช้งานด้วยวิธีดังกล่าว การนำไปใช้ หรือไม่สามารถใช้งานได้ในกรณีที่ดีเอ็นเอต้นแบบนั้นมีปริมาณหรือคุณภาพน้อย ดังนั้นการทำ PCR โดยแยกชุดของไพรเมอร์ (singleplex PCR) จึงมีความง่ายและเหมาะสม (Taberlet *et al*., 1999) อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาเพิ่มเติมกับตัวอย่างมูลที่ทราบเพศเพื่อหาอัตราความแม่นยำต่อการนำไปใช้ เพื่อประโยชน์ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและสำรวจสัดส่วนทางเพศต่อไปในอนาคต

2.3 ไพรเมอร์ DRA1W และ DRA2W

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เมื่อทำการทดสอบตัวอย่างดีเอ็นเอในละมั่งและเนื้อทรายทั้งเพศผู้และเพศเมียด้วยไพรเมอร์ DRA1W และ DRA2W ปรากกฏแถบผลผลิต PCR ขนาด 302 คู่เบสทั้งในเพศผู้และเพศเมียในทุกตัวอย่างเลือดที่ทดสอบ ดังแสดงไว้ในภาพที่ 8 อย่างไรก็ตามในกรณีที่นำไพรเมอร์ DRA1W และDRA2W ใส่รวมกับไพรเมอร์ SEX1W และ SEX2W ในการทดสอบ PCR หลอดเดียวกัน (multiplex PCR) สามารถใช้ทดสอบได้ในเนื้อทรายเท่านั้น ดังแสดงไว้ในภาพที่ 8

การตรวจแยกเพศในละมั่งและเนื้อทรายจากตัวอย่างมูลนั้นจะเป็นวิธีการที่ไม่รบกวนสัตว์ป่า จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบสามารถใช้ตรวจสอบแยกเพศได้ทั้งในละมั่งและเนื้อทรายให้ผลดีเช่นเดียวกับกรณีการตรวจแยกเพศจากตัวอย่างเลือด ดังแสดงไว้ในภาพที่ 9 และจากการจำแนกเพศมูลละมั่งที่ทราบเพศ 6 ตัวอย่างและเนื้อทรายที่ทราบเพศ 6 ตัวอย่างได้ทั้งหมดคิดเป็นอัตราสำเร็จ 100%

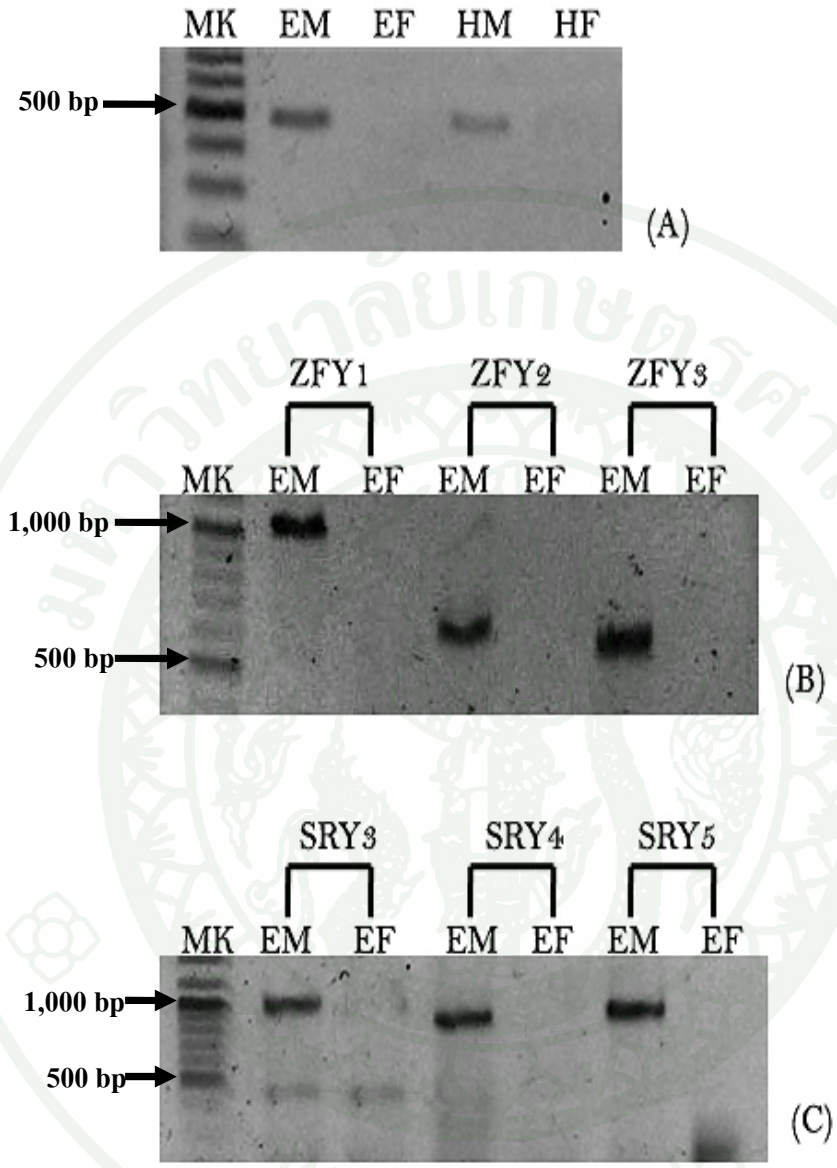
การทดสอบกับตัวอย่างมูลเนื้อทรายที่ไม่ทราบเพศจากเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าจำนวน 48 ตัวอย่างพบว่าให้ผลบวกต่อไพรเมอร์ DRA1W และ DRA2W จำนวน 41 ตัวอย่าง คิดเป็นอัตราสำเร็จ 85% และใน 41 ตัวอย่างนี้ปรากฏผลบวกต่อไพรเมอร์ SEX1W และ SEX2W เป็นจำนวน 27 ตัวอย่าง ซึ่งสามารถแปรผลได้ว่าจากตัวอย่าง 41 ตัวอย่างนี้เป็นเนื้อทรายเพศผู้ 27 ตัวอย่างและเป็นเพศเมีย 14 ตัวอย่าง จากผลบวกที่ปรากฏต่อไพรเมอร์ DRA1W, DRA2W และ SEX1W,SEX2W มี 3 ตัวอย่างที่ปรากฏแถบผลผลิต PCR ที่มีความเข้มข้นจาง แต่เห็นได้ว่ามี 3 ตัวอย่างที่ความเข้มของแถบผลผลิต PCR ที่ได้จากไพรเมอร์ SEX1W และ SEX2W มีลักษณะจางจะสัมพันธ์กับความเข้มของแถบผลผลิต PCR จากไพรเมอร์ DRA1W และ DRA2W ซึ่งจะมีลักษณะที่จางเช่นกัน แต่สำหรับการนำไพรเมอร์ทั้งสองชุดมาทำ PCR พร้อมกัน (multiplex PCR) พบว่าไม่สามารถใช้ในการแยกเพศได้ (ข้อมูลไม่ได้แสดง)

การใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนบนโครโมโซมวาย เพียงอย่างเดียวไม่สามารถบ่งชี้ถึงคุณภาพดีเอ็นเอได้ ดังนั้นการจำแนกเพศจากตัวอย่างมูลซึ่งมีคุณภาพดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแต่ละตัวอย่างอาจจะมีปริมาณและคุณภาพที่แตกต่างกัน จึงจำเป็นที่จะต้องใช้ไพรเมอร์อีกชุดหนึ่งที่ไม่จำเพาะต่อโครโมโซมวายเพื่อเป็นตัวรับรองคุณภาพดีเอ็นเอและความสำเร็จในการทำ PCR (Robertson and Gemmell, 2006) ซึ่งการใช้ไพรเมอร์ DRA1W และ DRA2W เพื่อประเมินคุณภาพดีเอ็นเอจะเป็นประโยชน์สำหรับการนำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากมูล เพื่อจะนำไปใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมเกี่ยวกับ microsatellite marker ผลผลิต PCR ของไพรเมอร์ DRA1W และ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

DRA2W มีขนาด 302 คู่เบส ซึ่งใหญ่กว่าผลผลิต PCR จาก microsatellite marker ซึ่งมีขนาดน้อยกว่า 250 คู่เบส เนื่องจากในกรณี DNA มีคุณภาพต่ำหรือมีปริมาณน้อยจะทำให้เกิดปัญหา allelic drop-out ทำให้การวิเคราะห์ผลผิดพลาด (Butler *et al*., 2003) ดังนั้นสำหรับตัวอย่างที่ให้ผลลบต่อไพรเมอร์ DRA1W และ DRA2W จึงไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ศึกษา microsatellite marker

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 4 แสดงแถบผลผลิต PCR ที่ปรากฏเมื่อทดสอบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อโครโมโซมเพศผู้กับดีเอ็นเอที่สกัดจากตัวอย่างเลือด โดย (A) แสดงแถบดีเอ็นเอในการศึกษายีน *DBY*; (B)แสดงแถบดีเอ็นเอในการศึกษายีน *ZFY*; (C) แสดงแถบดีเอ็นเอในการศึกษายีน *SRY*; โดย MK = 100 bp ladder marker; EM = ละมั่งเพศผู้; EF = ละมั่งเพศเมีย; HM = เนื้อทรายเพศผู้; HF = เนื้อทรายเพศเมีย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 3 Pairwise distance ของยีน *DBY* และ *SRY* ส่วน coding region โดย 1. ละมั่งชนิดย่อยพม่า (*Cervus eldii thamin*) (this study) 2. ละมั่งชนิดย่อยไทย (*Cervus eldii siamensis*) (this study) 3. เนื้อทราย (*Axis porcinus*) (*DBY*, this study) (*SRY*, Acession number: AY244496) 4. กวางแดง (*Cervus elaphus*) (*DBY*, Acession number: EU219376) (*SRY*, Acession number: DQ888695) และ 5. โค (*Bos taurus*) (*DBY*, *SRY*, Acession number: AC231520) เป็นสัตว์นอกกลุ่ม

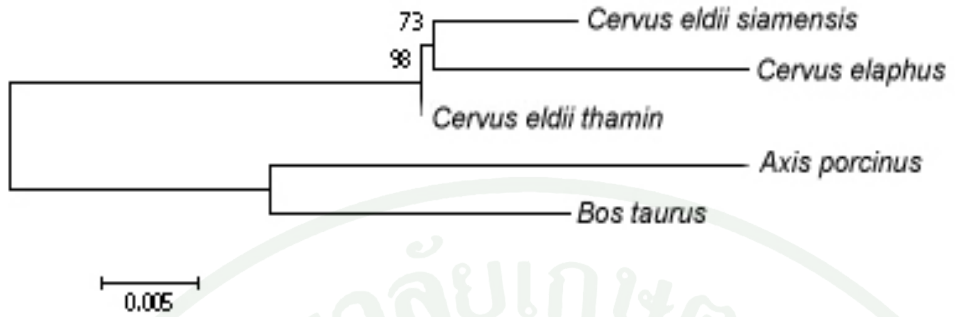
	1	2	3	4	5
1					
2	0.001				
3	0.018	0.019			
4	0.007	0.009	0.018		
5	0.092	0.093	0.093	0.095	

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 4 ตารางแสดงตำแหน่งเบสที่แตกต่างกันระหว่างละมั่งชนิดย่อยพม่า (*Cervus eldii thamin*) และละมั่งชนิดย่อยไทย (*Cervus eldii siamensis*) บน gene ในโครโมโซมวายที่ทำการศึกษา โดยตำแหน่งของลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิงจาก ภาพภาคผนวก ง

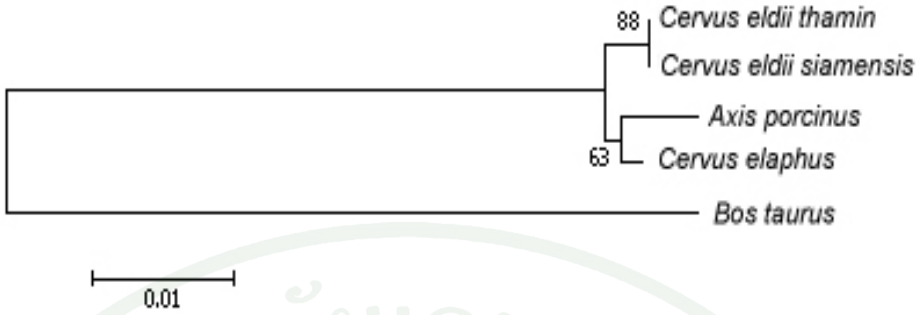
Gene	DBY (508 bp)	SRY (2,697 bp)	ZFY (1,945 bp)
Position	0	0 1 1 2	0 0 0 1
	4	7 9 9 0	1 2 3 5
	4	5 7 7 7	0 8 3 1
	7	3 2 3 1	6 4 1 3
Cervus eldii thamin	C	T A A A	- T G A
Cervus eldii siamensis	T	G - - C	T C A G

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



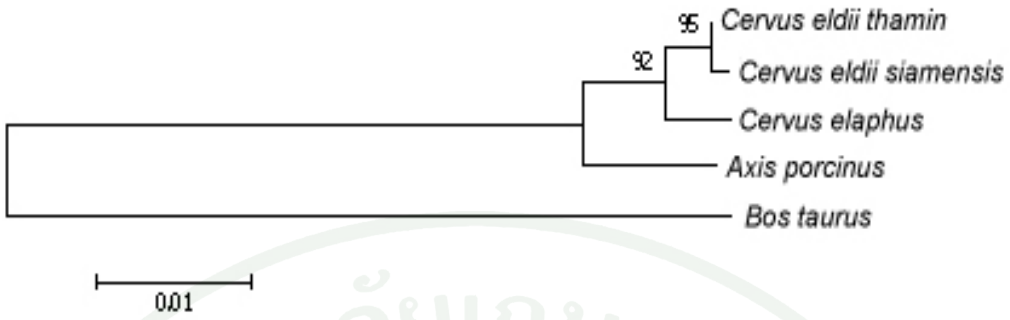
ภาพที่ 5 แสดง Phylogenetic tree ของ *DBY* gene ด้วยวิธี Neighbor-joining (NJ) และใช้ Maximum composite likelihood model ในการวิเคราะห์ ร่วมกับการทดสอบความน่าเชื่อถือของ tree ด้วย Bootstrap 10,000 รอบ เปรียบเทียบระหว่างละมั่งชนิดย่อยพม่า (*Cervus eldii thamin*) (this study) ละมั่งชนิดย่อยไทย (*Cervus eldii siamensis*) (this study) เนื้อทราย (*Axis porcinus*) (this study) และกวางแดง (*Cervus elaphus*) (Acession number: EU219376) โดยใช้วัว (*Bos taurus*) (Acession number: AC231520) เป็นสัตว์นอกกลุ่ม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



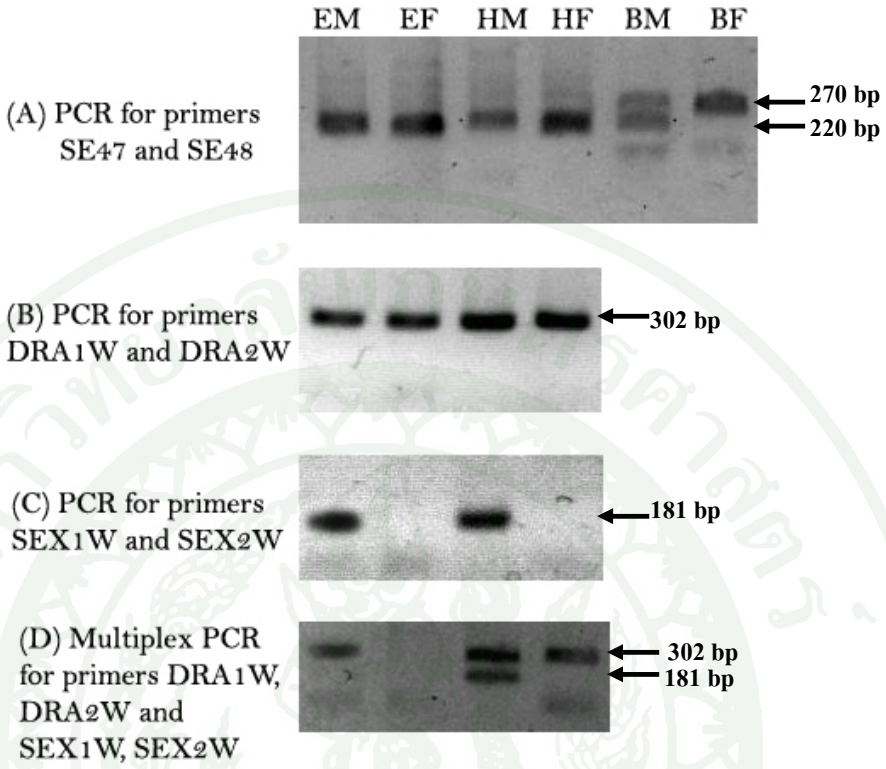
ภาพที่ 6 แสดง Phylogenetic tree ของ *SRY* gene ส่วน coding region ด้วยวิธี Neighbor-joining (NJ) และใช้ Maximum composite likelihood model ในการวิเคราะห์ ร่วมกับการทดสอบความน่าเชื่อถือของ tree ด้วย Bootstrap 10,000 รอบ เปรียบเทียบระหว่างละมั่งชนิดย่อยพม่า (*Cervus eldii thamin*) (this study) ละมั่งชนิดย่อยไทย (*Cervus eldii siamensis*) (this study) เนื้อทราย (*Axis porcinus*) (Acession number: AY244496) และกวางแดง (*Cervus elaphus*) (Acession number: DQ888695) โดยใช้วัว (*Bos taurus*) (Acession number: AC231520) เป็นสัตว์นอกกลุ่ม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



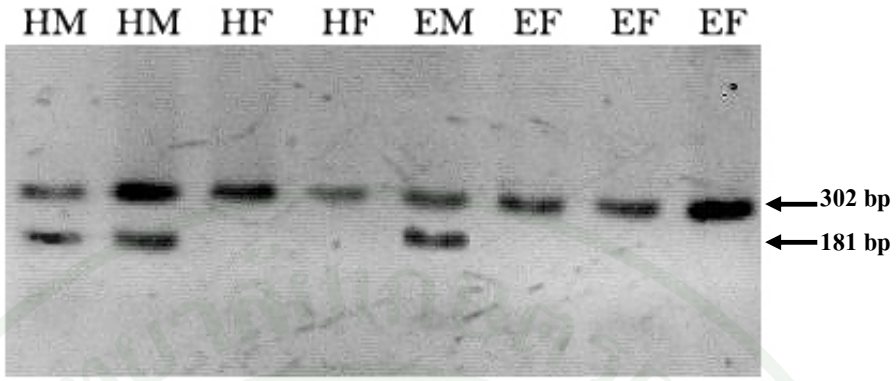
ภาพที่ 7 แสดง Phylogenetic tree ของ DBY gene และ SRY gene ส่วน coding region ด้วยวิธี Neighbor-joining (NJ) และใช้ Maximum composite likelihood model ในการวิเคราะห์ร่วมกับการทดสอบความน่าเชื่อถือของ tree ด้วย Bootstrap 10,000 รอบ เปรียบเทียบระหว่างละมั่งชนิดย่อยพม่า (*Cervus eldii thamin*) (this study) ละมั่งชนิดย่อยไทย (*Cervus eldii siamensis*) (this study)เนื้อทราย (*Axis porcinus*) (*DBY*, this study) (*SRY*, Acession number: AY244496) และกวางแดง (*Cervus elaphus*) (*DBY*, Acession number: EU219376) (*SRY*, Acession number: DQ888695) โดยใช้วัว (*Bos taurus*) (*DBY*, *SRY*, Acession number: AC231520) เป็นสัตว์นอกกลุ่ม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 8 แสดงผลผลิต PCR จากปฏิกิริยา PCR ที่ได้จากชุดของไพรเมอร์ที่ใช้ในการจำแนกเพศ เมื่อทำการทดสอบกับตัวอย่างเลือด โดย (A) ทดสอบด้วย ไพรเมอร์ SE47 และ SE48, (B) ทดสอบด้วยไพรเมอร์ DRA1W และ DRA2W (C) ทอสอบด้วยไพรเมอร์ SEX1W และ SEX2W, (D) ทดสอบด้วยไพรเมอร์ DRA1W, DRA2W และ SEX1W, SEX2W ด้วยวิธี Multiplex PCR โดย EM; ละมั่งเพศผู้, EF; ละมั่งเพศเมีย, HM; เนื้อทรายเพศผู้, HF; เนื้อทรายเพศเมีย, BM; โคเพศผู้ และ BF; โคเพศเมีย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 9 แสดงผลผลิต PCR ที่ได้จากการทำปฏิกิริยา singleplex PCR ด้วยชุดไพรเมอร์ DRA1W และ DRA2W แยกกับไพรเมอร์ SEX1W และ SEX2W จากตัวอย่างมูลละมั่งและเนื้อทราย โดย PCR product จากปฏิกิริยา PCR ทั้งสองจะถูกนำมา load ใส่ในหลุมเดียวกัน โดย HM; เนื้อทรายเพศผู้, HF; เนื้อทรายเพศเมีย, EM; ละมั่งเพศผู้ และ EF; ละมั่งเพศเมีย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

1. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมบนโครโมโซมวาย โดยทำการศึกษาในส่วนของ ยีน *DBY* ความยาว 508 คู่เบส ยีน *SRY* ความยาว 1,697 คู่เบส และยีน *ZFY* ความยาว 1,945 ความยาวทั้งสิ้น 5,150 คู่เบส โดยทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวในประชากรละมั่งเพศผู้ พบว่าเมื่อทำการเปรียบเทียบภายในกลุ่มประชากรละมั่งชนิดย่อยพม่า และภายในกลุ่มประชากรละมั่งชนิดย่อยไทย ไม่พบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์บนสายดีเอ็นเอ นั่นแสดงให้เห็นว่าไม่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมบนโครโมโซมเพศผู้ในประชากรละมั่งชนิดย่อยเดียวกัน ดังนั้นการศึกษาบนโครโมโซมวายไม่เหมาะที่จะใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมเพื่อการจัดการประชากรในสายพ่อ แต่เมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวระหว่างประชากรละมั่งชนิดย่อยพม่าและละมั่งชนิดย่อยไทย พบว่ามีความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสิ้น 8 ตำแหน่ง จึงนำลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวมาทำการหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ซึ่งจากผลที่ได้ทำให้เห็นได้ชัดว่าละมั่งทั้งสองชนิดย่อยแยกออกจากกันอย่างชัดเจน ซึ่งความแตกต่างนี้เองจะเป็นประโยชน์ในการศึกษาวิวัฒนาการหรือติดตามการสัตว์ลูกผสมเพศผู้

2. จากการพัฒนาชุดของไพรเมอร์สำหรับใช้ในการจำแนกเพศจากมูลด้วยวิธี PCR โดยทำการทดสอบกับไพรเมอร์ SE47 และ SE48 ซึ่งจำเพาะต่อยีน amelogenin และออกแบบไพรเมอร์จากยีน *DBY* ที่ได้จากการศึกษานี้ (SEX1W และ SEX2W) และใช้ไพรเมอร์ DRA1W และ DRA2W ซึ่งจำเพาะต่อโครโมโซมร่างกายเป็นตัวควบคุมคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้จากมูล โดยหากตัวอย่างมูลนั้นสามารถสกัดดีเอ็นเอได้คุณภาพดีเมื่อทำปฏิกิริยา PCR ด้วยไพรเมอร์คู่นี้จะต้องปรากฏแถบ PCR ในขนาด 302 คู่เบส นั่นแสดงให้เห็นว่าสามารถนำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างมูลนี้มีคุณภาพเพียงพอที่จะไปใช้ศึกษาในระดับโครโมโซมร่างกาย ตลอดถึงการใช้ microsatellite marker เพื่อศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมในประชากรต่อไปในอนาคต จากการศึกษานี้ได้ทดลองใช้ชุดของไพรเมอร์ดังกล่าว กับตัวอย่างเลือดและตัวอย่างมูลในละมั่งและเนื้อทรายซึ่งสามารถจำแนกเพศได้ทั้งจากตัวอย่างเลือดและมูลโดยปรากฏแถบผลผลิต PCR ขนาด 181 คู่เบสในตัวอย่างเพศผู้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ข้อเสนอแนะ

1. สำหรับการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในละมั่งนั้น แม้ว่าตัวอย่างจะสุ่มมาโดยพิจารณาจากแหล่งที่มาและข้อมูลพันธุกรรมทางสายแม่แล้วก็ตาม ละมั่งที่ทำการศึกษาล้วนเป็นประชากรละมั่งที่มีอยู่ในประเทศไทยและ ไม่ทราบที่มาที่ไปอย่างชัดเจนจึงไม่สามารถสรุปไปได้ว่าตัวอย่างละมั่งเพศผู้ที่นำมาศึกษานั้นมาจากต่างแหล่งที่มาอย่างแท้จริง ดังนั้นหากเป็นไปได้ควรจะมีการศึกษาจากตัวอย่างละมั่งชนิดย่อยพม่าที่มาจากประชากรในป่าฝั่งประเทศพม่า และละมั่งชนิดย่อยไทยในฝั่งประเทศกัมพูชา นอกจากนี้เพื่อการศึกษาถึงวิวัฒนาการอย่างสมบูรณ์ของละมั่ง จึงควรที่มีข้อมูลของละมั่งชนิดย่อยมาณีปูร์ และชนิดย่อยไหหลำมาเปรียบเทียบด้วย รวมทั้งศึกษาโดยใช้ Y chromosome microsatellite marker ซึ่งอาจจะมี polymorphism มากกว่า ในการหาความหลากหลายบนโครโมโซมเพศผู้ รวมทั้งศึกษาดีเอ็นเอจากไมโตคอนเดรียซึ่งจะเป็นข้อมูลการวิวัฒนาการในสายแม่เพื่อใช้มาประกอบกับข้อมูลทางสายพ่อเพื่อความสมบูรณ์ของการศึกษาวิวัฒนาการในละมั่ง

2. สำหรับการพัฒนาการจำแนกเพศจากมูลด้วยวิธี PCR ปัจจัยที่จะส่งผลต่อความสำเร็จในการทำ PCR คือ ในการสกัดดีเอ็นเอจากมูลนั้นสิ่งสำคัญสิ่งหนึ่ง คือตัวอย่างมูลที่เก็บมานั้น ควรจะต้องเป็นตัวอย่างมูลที่สด และจำนวนมูลที่เก็บใส่หลอดเก็บตัวอย่างนั้นควรเก็บมาในสัดส่วนที่พอเหมาะ ไม่ควรเก็บมามากเกินไปเนื่องจากอาจมีสารบางอย่างปนมากับดีเอ็นเอที่สกัดได้จากมูลและอาจไปยับยั้งปฏิกิริยา PCR และทำให้ผลที่ได้คลาดเคลื่อน รวมถึงควรระมัดระวังในการเก็บตัวอย่างไม่ให้มีการปลอมปนดีเอ็นเอจากมนุษย์ซึ่งอาจจะทำให้ผลการทดสอบคลาดเคลื่อนได้ ไพรเมอร์ที่ได้จากการศึกษานี้จะนำไปใช้ในการหาข้อมูลสัดส่วนทางเพศของประชากรละมั่งและเนื้อทราย เพื่อติดตามรูปแบบการผสมพันธุ์ตลอดจนการขยายจำนวนของประชากรในอนาคตได้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กรมป่าไม้. 2539. **สัตว์ป่าสงวนของไทย**. แปลนพริ้นติ้ง. กรุงเทพฯ.

จตุรงค์ พุทธพรทิพย์. 2541. DNA sequencing, น. 112-125. *ใน* นเรศร สุขเจริญ, อภิวัฒน์ มุทิรางกูร และ ยง ภู่สุวรรณ, บรรณาธิการ. **อณูชีววิทยาทางการแพทย์**. เท็กซ์ แอนด์ เจอร์นัล พับลิเคชั่น, กรุงเทพฯ.

ทวีศักดิ์ ตีระวัฒนพงษ์. 2541. Polymerase Chain Reaction, น. 82-111. *ใน* นเรศร สุขเจริญ, อภิวัฒน์ มุทิรางกูร และ ยง ภู่สุวรรณ, บรรณาธิการ. **อณูชีววิทยาทางการแพทย์**. เท็กซ์ แอนด์ เจอร์นัล พับลิเคชั่น, กรุงเทพฯ.

พีรศักดิ์ อมตอาชาชัย, สมเกียรติ ปูกา และ สมพร นกทอง. 2552. การนำเสนอผลการปฏิบัติการของเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอ. น.11-12. *ใน* **รายงานการประชุมประจำเดือนธันวาคม 2551 ครั้งที่ 12 สำนักบริหารพื้นที่อนุรักษ์ที่ 15**, เชียงราย.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545. **จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ : ปฏิบัติการอาร์เอพีดีและเอเอฟแอลพี. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์**, กรุงเทพฯ.

Anne, C.S., R.C. Griffiths, S.L. Zegura and M.F. Hammer. 2001. High levels of Y-chromosome nucleotide diversity in the genus Pan. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. 99 (1): 43-48.

Balakrishnan, C.N., L.M. Steven, G. Ajay, S. Lalji and D.S. Michael. 2003. Phylogeography and conservation genetics of Eld's deer (*Cervus eldi*). **Mol. Ecol**. 12 (1): 1-10.

Bhumpakphan, N., R. Sukmasuang and R. Chaiyarat. 2003. Thailand: The crossroad where two Eld's deer subspecies existed. In **Workshop on Eld's Deer Conservation and Restoration**. November 10-12, 2003, Thailand.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Boom, R., C.A.J. Sol, M.M.M. Salimans, C.L. Jansen, P.M.E. Wertheim-van Dillen and J. Noordaa. 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acid. **J. Clin. Microbiol**. 28 (3): 495-503.

Brinkman, T.J. and K.J. Hundertmark. 2009. Sex identification of northern ungulates using low quality and quantity DNA. **Conserv. Genet**. 10 (4): 1189-1193

Burrell, A.S., C.J. Jolly, A.J. Tosi and T.R. Disotell. 2009. Mitochondrial evidence for the hybrid origin of kipunji, Rungwecebus kipunji (Primates: Papionini). **Mol. Phylogenet. Evol**. 51 (2): 340-348.

Butler, J.M., Y. Shen and B.R. McCord. 2003. The development of reduced of STR amplicons as tools for analysis of degraded DNA. **J. Forensic Sci**. 48 (5): 1054-1064.

Cai, X., H. Chen, S. Wang, K. Xue and C. Lei. 2006. Polymorphisms of two Y chromosome microsatellites in Chinese cattle. **Genet. Sel. Evol**. 38 (5): 525-534.

Chandler, J.E., H.C. Steinholt-Chenevert, R.W. Adkinson and E.B. Moser. 1998. Sex ratio variation between ejaculates within sire evaluated by polymerase chain reaction, calving, and farrowing records. **J. Dairy. Sci**. 81 (7): 1855-1867.

Corbet, G.B. and J.E. Hill. 1992. **The mammal of Indomalayan region: a systematic review**. Bookcraft. United states.

Dallas, J.F., N.C. David, M. Freda, K. Klaus-Peter, K. Hans, B.P. Stuart and J.B. Phillip. 2000. Sex identification of Eurasian otter *Lutra lutra* by PCR typing of spraint. **Conserv. Genet**. 1 (2): 181-183.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Decoux, J.P. 1994. The living memory of the flying deer, Cervus eldii. In saving the natural diversity of Eld's deer. **Global Herdbook 1900-92 (ed. Decoux JP)**. 8-13. Museum national d' Histirie Naturelle, Paris.

Delbridge, M.L. and J.A.M. Graves. 1999. Mammalian Y chromosome evolution and the male-specific functions of Y chromosome-borne genes. **Rev. Reprod**. 4 (2): 101-109.

Drobnic, K. 2006. A new primer set in a SRY gene for sex identification. **International Congress Series Elsevier**. 1288: 268-270.

Emiko, F., K. Masaaki and Y. Midori. 2006. Determination of nucleotide sequence of *SRY* gene in sika deer (*Cervus nippon*). **Anim. Sci. J**. 77 (2): 250-252.

Ennis, S. and T.F. Galagher. 1994. A PCR-based sex determination assay in cattle based on bovine amelogenin locus. **Anim. Genet**. 25 (6): 425-427.

Frantzen, M.A.J., J.B. Silk, J.W.H. Ferguson, R.K. Wayne and M.H. Kohn. 1998. Empirical evaluation of preservation methods for faecal DNA. **Mol. Ecol**. 7 (10): 1423-1428.

Grave, J.A. 1995. The origin and function of the mammalian Y chromosome and Y-borne genes an evolving understanding. **Bioessays**. 17 (4): 311-320.

Go¨therstro¨m, A., C. Anderung, L. Hellborg, R. Elburg, C. Smith, G.B. Dan and H. Ellegren. 2005. Cattle domestication in the Near East was followed by hybridization with aurochs bulls in Europe. **Proc. R. Soc. B**. 272 (1581): 2345-2350.

Gurgul, A., R. Anna, S. Ewa. 2009. Characteristics of X- and Y-chromosome specific regions of amelogenin gene and a PCR-based method for sex identification in red deer (*Cervus elaphus*). **Mol. Biol. Rep**. doi:10.1007/s11033-009-9852-4.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Gutala, V.R., S. Bing, J. Li, S. Lalji, W. Ning, U. Peter and C. Ranajit. 2001. Y-chromosome SNP haplotypes suggest evidence of gene flow among caste, tribe, and the migrant Siddi populations of Andhra Pradesh, South India. **J. Eur. Hum. Genet**. 9 (9): 695-700.

Hatch, L.T., E.B. Dopman and R.G. Harrison. 2006. Phylogenetic relationships among the whales based on maternally and paternally inherited characters. **Mol. Phylogenet. Evol**. 41 (1): 12-27.

Hedrick, P.W. 1995. Gene flow and genetic restoration: the Florida panther as a case study. **Conserv. Biol**. 9 (5): 996-1007.

Hellborg, L. and H. Ellegren. 2003. Y chromosome conserved anchored tagged sequences (YCATS) for the analysis of mammalian male-specific DNA. **Mol. Ecol**. 12 (1): 283-291.

IUCN. 2008. ***Rucervus eldii***. The IUCN Red List of Threatened Species. http://www.iucnredlist.org/details/4265. March 9, 2009.

Johnson, W.E., E. Eizirik, J. Pecon-Slattery, W.J. Murphy, A. Antunes, E. Teeling and S.J. O'Brien. 2006. The late Miocene radiation of modern Felidae: a genetic assessment. **Science**. 311 (5757): 73-77.

Kumagai, R., Y. Sasaki, T. Tokuta, H. Biwasaka and Y. Aoki. 2008. DNA analysis of family members with deletion in Yp11.2 region containing amelogenin locus. **Leg. Med**. 10 (1): 39-42.

Lekagul, B. and J.A. Mcneely. 1988. **Mammals of Thailand 2nd ed**. Bangkok Kurusapa Ladproa press, Bangkok.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Lindgren, G., N. Backstrom, J. Swinburne, L. Hellborg, A. Einarsson, K. Sandberg, G. Cothran, C. Vila, M. Binns and H. Ellegren. 2004. Limited number of patrilines in horse domestication. **Nat. Genet**. 36 (4): 335–336.

Lobel, S. M., A.J. Pomponio and G.L. Mutter. 1993. The sex ratio of normal and manipulated human sperm quantitated by the polymerase chain reaction. **Fertil. Steril**. 59 (2): 387-392.

Lugon, M.N. and J. Hausser. 2002. Phylogeographical structure , postglacial recolonization and barrier to gene flow in distinctive Valais chromosome race of common shrew (*Sorex araneus*). **Mol. Ecol**. 11 (4): 785-794.

Luo, S.J., W. E. Johnson, V. A. David, M. Menotti-Raymond, R. Stanyon, Q. X. Cai, T. Beck, N. Yuhki, J. Pecon-Slattery, L. D.J. Smith and S.J. O'Brien. 2007. Development of Y chromosome intraspecific polymorphic markers in the Felidae. **J. Hered**. 98 (5): 400-413.

Mace, M. and C.R. Brigitte. 2008. A highly polymorphic insertion in the Y-chromosome amelogenin gene can be used for evolutionary biology, population genetics and sexing in *Cetacea* and *Artiodactyla*. **BMC. genet**. 9: 64. doi:10.1186/1471-2156-9-64.

Madsen, T., R. Shine, M. Olsson and H. Wittsell. 1999. Restoration of an inbred adder population. **Nature**. 402 (6757): 34-35.

Malaspina, P., F. Cruciani, B.M. Ciminelli, L. Terrenato, P. Santolamazza, A. Alonso, J. Banyko, R. Brdicka, O. Garcia, C. Gaudiano, G. Guanti, K.K. Kidd, J. Lavinha, M. Avila, P. Mandich, P. Moral, R. Qamar, S.Q. Mehdi, A. Ragusa, G. Stefanescu, M. Caraghin, C. Tyler-Smith, R. Scozzari and A. Novelletto. 1998. Network analyses of Y-chromosome types in Europe, northern Africa, and western Asia reveal specific patterns of geographic distribution. **Am. J. Hum. Genet**. 63 (3): 847-860.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Matsubara, K., Y. Ishibashi, S. Ohdachi and Y. Matsuda. 2001. A new primer set for sex identification in the genus *Sorex* (Soricidae, Insectivora). **Mol. Ecol. Notes**. 1 (2): 241-242.

Meadows, J. R.S., R.J. Hawken and J.W. Kijas. 2004. Nucleotide diversity on the ovine Y chromosome. **Anim. Genet**. 35 (5): 379–385.

Meadows, J.R.S. and J.W. Kijas. 2009. Re-sequencing regions of the ovine Y chromosome in domestic and wild sheep reveals novel paternal haplotypes. **Anim. Genet**. 40 (1): 119-123.

Mitchell, M.J., S.A. Wilcox, J.M. Watson, J.L. Lerner, D.R. Woods, J. Scheffler, J.P. Hearn, C.E. Bishop and J.A. Geaves. 1998. The origin and loss of ubiquitin activating enzyme gene on the mammalian Y chromosome. **Hum. Mol. Genet.** 7 (3): 429-434.

Mohamad, K., M. Olsson, H.T. van Tol, S. Mikko, B.H. Vlamings, G. Andersson, H. Rodrigquez-Martinez, B. Purwantrara, R.W. Paling, B. Colenbrander and J.A. Lenstra. 2009. On the origin of Indonesian cattle. **PloS. One**. 4 (5): e5490.

Morin, P.A, N. Aviva, T.R.C. Nadia, M.R. Kelly and L.M. Sarah. 2005. Interfamilail characterization of region of the *ZFX* and *ZFY* facilitates sex determination in cetaceans and other mammals. **Mol. Ecol**. 14 (10): 3275-3286.

Mauget, C., R. Mauget and F. Claro. 2001. History, evolution, and future of the captive population of *Cervus eldi* in the zoological park of Paris, France. **Global Herdbook of Eld's Deer (eds N. Manchard and C. Mauget)**. 26-34. Museum National Histoire Nauturelle, Paris.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Nei, M. 1996. Phylogenetic analysis in molecular evolutionary genetics. **Annu. Rev. Genet**. 30: 371-403.

Nishida, S., M. Goto, L.A. Pastene, N. Kanda and H. Koike. 2007. Phylogenetic relationship among cetaceans revealed by Y chromosome sequences. **Zoolog. Sci**. 24 (7): 723-732.

Nijman, I.J., D.J. Van Boxtel, L.M. Van Cann, E. Cuppen and J.A. Lentra. 2008. Phylogeny of Y chromosomes from bovine spicies. **Cladistic**. 24 (5): 723-726.

Pajares, G., A. Isabel, F. Ivan, P. Lucia, G. Felix and J.R. Luis. 2007. A sexing protocol for wild ruminants based on PCR amplification of amelogenin genes AMELX and AMELY (short communication). **Arch. Tierz. Dummerstorf**. 50 (5): 442-446.

Paul, J. B. 2003. **Proportional assessment of X and Y chromosome-bearing spermatozoa in bull and boar ejaculates using conventional and real-time PCR techniques**. Louisiana State University, Baton Rouge.

Peter, A.U. and K. Toomas. 2007. Population structure in tracing human migrations. **Annu. Rev. Genet**. 41: 539-564.

Pfeiffer, I. and B. Brenig. 2005. X- and Y-chromosome specific variants of the amelogenin gene allow sex determination in sheep (*Ovis aries*) and European red deer (*Cervus elaphus*). **BMC. Genet**. 6 (16): 1-4.

Pidancier, N., S. Jordan, G. Luikart and P. Taberlet. 2006. Evolutionary history of the genus Capra (Mammalia, Artiodactyla): discordance between mitochondrial DNA and Y chromosome phylogenies. **Mol. Phylogenet. Evol**. 40 (3): 739-749.

Poloumienko, A. 2004. Cloning and comparative analysis of the bovine, porcine and equine sex chromosome genes *ZFX* and *ZFY*. **NRC. Genome**. 47 (1): 74-83.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Poloni, E.S., O. Semino, G. Passarino, A.S. Santachiara-Benerecetti, I. Dupanloup, A. Langaney and L. Excoffier. 1997. Human genetic affinities for Y chromosome P49a,f/TaqI haplotypes show strong correspondence with linguistics. **Am. J. Hum. Genet**. 61 (5): 1015-1035.

Putze, M. and N. Sabine and F. Jörns. 2007. Y-chromosomal markers for the European brown hare (*Lepus europaeus*, Pallas 1778). **Eur. J. Wild. Res**. 53 (4): 257-264.

Quintana-Murci, L., O. Semino, E. Minch, G. Passarimo, A. Brega and A.S. Santachiara-Benerecetti. 1999. Further characteristics of proto-European Y chromosome. **Eur. J. Hum. Genet**. 7 (5): 603-608.

Randy, W. D. and L.H. Rodney. 2005. Molecular toolbox : Genetic techniques in wildlife ecology and management. **J. Wild. Manag**. 69 (4): 1362-1384.

Robertson, B.C. and N.J. Gemmell. 2006. PCR-based sexing in conservation biology: Wrong answers from an accurate methodology?. **Conserv. Genet**. 7 (2): 267-271.

Roca, A.L., N. Georgiadis and S.J. O'Brien. 2007. Cyto-nuclear genomic dissociation and the african elephant species question. **Quat. Int**. 169-179: 4-16.

Roldan, M.G., J.J. Garde, G. Espeso, S. Ledda, F. Berlinguer, A. del Olmo, AJ. Soler, L. Arregui, C. Crespo and R. Gonzalez. 2006. Inbreeding and reproduction in endangered ungulates: preservation of genetic variation through the organization of genetic resource banks. **Reprod. Dom. Anim**. 41 (Suppl. 2): 82–92.

Sambrook, K., E.F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. **Molecular cloning a laboratory manual 2nd ed**. Cold Spring Habor Laboratory Press, USA.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Sena, L., M.P.C. Schneider, B. Brenig, R.L. Honerycutt, L. Womack and L.C. Skow. 2003. Polymorphisms in MHC-DRA and –DRB alleles of water buffalo (*Bubalus bubalis*) reveal different features from cattle DR alleles. **Anim. Genet**. 34 (1): 1-10.

Shen, P., W. Frank, A.U. Peter, C. Franco, W.H. Yang, A. Roxas, R. Sung, A.A. Lin, R.W. Hyman, D. Vollrath, R.W. Davis, L.L. Cavalli-Sforza, and P.J. Oefner. 2000. Population genetic implications from sequence variation in four Y chromosome genes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. 97 (13): 7354-7359.

Singsit, S. 2003. Brow antlered deer (*Cervus eldii eldi*) in Keibul Lamjao National park, Manipur, India. In **Workshop on Eld's deer conservation and restoration**. November 10-12, 2003, Thailand.

Siriarunrat, B. 2003. Status and genetics of captive Eld's deer. In **Workshop on Eld's deer conservation and restoration**. November 10-12, 2003, Thailand.

Snyder, N.H., S.R. Derrickson and S.R. Bessinger. 1996. Limitation of captive breeding in endangered species recovery. **Conserv. Biol**. 10 (2): 338-348.

Stone, A.C., R.C. Griffiths, S.L. Zegura and M.F. Hammer. 2002. High levels of Y-chromosome nucleotide diversity in the genus Pan. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. 99 (1): 43-48.

Sundqvist, A.K., H. Ellegren, M. Olivier And C. Vila. 2001. Y chromosome haplotyping in Scandinavian wolves (*Canis lupus*) based on microsatellite markers. **Mol. Ecol**. 10 (8): 1959-1966.

Taberlet, P., L.P. Waits and G. Luikart. 1999. Non-invasive genetic sampling: look before you leap. **Trends Ecol. Evol**. 14 (8): 323-327.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Tanomtong, A., N. Kong-ngarm, P. Supanuam and M. Monthatong. 2008. Cytogenetic study on Thai brow-antlered deer, *Cervus eldii siamensis* and Thamin brow-antlered deer, *Cervus eldii thamin* (Artiodactyla, Cervidae) by conventional staining method. **Songklanakarin J. Sci. Technol**. 30 (2): 171-177.

Ting, N., A.J. Tosi, Y. Li, Y.P. Shang and T.R. Disotell. 2008. Phylogenetic incongruence between nuclear and mitochondrial markers in Asian colobines and the evolution of the langurs and leaf monkeys. **Mol. Phylogenet. Evol**. 46 (2): 466-474.

Tosi, A.J., J.C Morales and D.J. Melnick. 2000. Comparison of Y chromosome and mtDNA phylogenies leads to unique inferences of macaque evolutionary history. **Mol. Phylogenet. Evol**. 17 (2): 133-144.

Tosi, A.J., J.C Morales and D.J. Melnick. 2003. Paternal, maternal and biparental molecular markers provide unique windows onto the evolutionary history of macaque monkeys. **Evol. Int. J. Org**. 57 (6): 1419-1435.

Van hooft, W.F., A.F. Groen and H.H. Prins. 2002. Phylogeography of the african buffalo based on mitochondrial and Y-chromosome loci: pleistocene origin and population expansion of cape buffalo subspicies. **Mol. Ecol**. 11 (2): 267-279.

Verkaar, H.V., C. Roden, L.R. Mendoza, M.W. Barwegen, T. Susilawati, I.J. Nijman and J.A. Lenstra. 2003. Paternally inherited markers in bovine hybrid populations. **Heredity**. 91 (6): 565-569.

Vila, C., C. Walker, A.K. Sundqvist, O. Flagstad, Z. Andersone, A. Casulli, I. Kojola, H. Valdmann, J. Halverson and H. Ellegren. 2003. Combined use of maternal, paternal and biparental genetic markers for the identification of wolf-dog hybrids. **Heredity**. 90 (1): 17-24.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Wallner, B., G. Brem, M. Muller and R. Achmann. 2003. Fixed nucleotides differences on Y-chromosome indicate clear divergence between *Equus przewalskii* and *Equus caballus*. **Anim. Genet**. 34 (6): 453-456.

Wurmb-Schwark, N.V., H. Bosinski and S. Ritz-Timme. 2006. What do the X and Y chromosomes tell us about sex and gender in forensic case analysis?. **J. Forensic Leg. Med**. 14 (1): 27-30.

Yamauchi, K., S. Hamasaki, K. Miyasaki, T. Kikusui, Y. Takeuchi and Y. Mori. 2000. Sex determining based on fecal DNA analysis of the amelogenin gene in Sika deer (*Cervus Nippon*). **J. Vet. Med. Sci**. 62 (6): 669-671.

Yannic, P., P. Basset and J. Hausser. 2008. Phylogeography and recolonization of the Swiss Alps by the Valais shrew (*Sorex antinorii*), inferred with autosomal and sex-specific marker. **Mol. Ecol**. 17 (18): 4118-4133.

Zhang, Q., Y. Ji, Z. Zeng, Y. Song and D. Zhang. 2005. Polymorphic microsatellite DNA markers for the vulnerable Hainan Eld 's deer *Cervus eldi hainanus* in China. **Acta Zool. Sinica**. 51 (3): 530-534.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก ก

สารเคมี

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1. D-solution

- 4M guanidine thiocyanate (GuSCN)
- 25 mM Sodium citrate (pH 7.0)
- 0.5% Sarcosyl

2. TE buffer

- 10 mM Tris-HCl (pH 8.0)
- 1 mM EDTA

3. 50X TA buffer

- Tris base 121 g
- Glacial acetic acid 28.55 ml
- ปรับ pH เป็น 8.0 ด้วย NaOH
- เติมน้ำให้ครบ 500 ml, autoclave

4. 1.5%agarose

- Agarose gel 1.5 g
-1X TA 100 ml

5. Loading dye

- 25%Bromphenol blue
- 30%glycerol

6. Lysis buffer (L1)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

- ละลาย GuSCN 120 g ในสารละลาย 0.1 M Tris-HCl (pH 6.4) ปริมาณ 100 ml
- อุ่นสารละลายที่ที่ 60 °C เพื่อให้ GuSCN ละลายได้ดี
- เติม 0.2 M EDTA (pH 8.0) 22 ml
- เติม Triton X-100 2.6 ml
- เก็บที่อุณหภูมิห้องไม่ให้โดนแสง

7. Lysis buffer (L2)

- ละลาย GuSCN 120 g ใน สารละลาย 0.1 M Tris-HCl (pH 6.4) 100 ml
- อุ่นที่ 60 °C เพื่อให้ GuSCN ละลายเข้ากันดี

8. Silica

- นำ silicon dioxide (CAS number: 60676-86-0, SIGMA-ALDRICH) 60 g ละลายในน้ำ 200 ml vortex จนเป็นสารแขวนลอย เติมน้ำเพิ่มให้ได้ปริมาตร 500 ml ทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้องหนึ่งคืน
- ดูดสารแขวนลอยส่วนบน 430 µl ทิ้งไป
- เติมน้ำลงไปให้ได้ปริมาตร 500 ml vortex ให้เข้ากัน และปล่อยให้ตกตะกอนที่อุณหภูมิห้อง 5 ชั่วโมง
- ดูด สารละลายส่วนบนทิ้งไป 440 µl
- เติม 32% HCl ปริมาตร 600 µl เพื่อปรับค่า pH ให้เป็น 2.0
- เก็บที่อุณหภูมิห้อง

9. DETs buffer

- 20% DMSO
- 250mM EDTA
- 100mM Tris-HCl (pH 7.5)
- สารละลายอิ่มตัวของเกลือ NaCl

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก ข

วิธีการทดลอง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ส่วนประกอบในการทำ PCR

ตารางผนวกที่ ข1 ตารางแสดงองค์ประกอบของสารละลายในปฏิกิริยา PCR ในการศึกษาความหลากหลายบนโครโมโซมวาย

ส่วนประกอบ	ปริมาณ (µl)	ความเข้มข้นสุดท้าย
น้ำที่ผ่านการ autoclave	6.75	-
10X NH_3SO_4 buffer	1	-
50mM $MgCl_2$	0.8	1-4 mM
10mM dNTP	0.2	0.2 mM
Primer Forward	0.1	0.1-1 µM
Primer Reverse	0.1	0.1-1 µM
Taq DNA polymerase	0.005	1.25 u
DNA template	1	10 pg – 1 µg

แสดงองค์ประกอบของสารละลายในการทำ PCR ในการศึกษาความหลากหลายบนโครโมโซมเพศผู้ต่อ 1 ปฏิกิริยา (10 µl)

ตารางผนวกที่ ข2 ตารางแสดงองค์ประกอบของสารละลายในปฏิกิริยา PCR ในการพัฒนาการจำแนกเพศจากมูล

ส่วนประกอบ	ปริมาณ (µl)	ความเข้มข้นสุดท้าย
2X QIAGEN Multiplex Mixture	5	1X
10X primer mix	1	0.2 uM
5X Q-solution	1	0.5X
RNase-free water	2	Up to 10 µl
Template DNA	1	1 µg DNA/50 µl

แสดงองค์ประกอบของสารละลายในการทำ PCR ในการพัฒนาการจำแนกเพศละมั่งและเนื้อทรายจากกองมูล ต่อ 1 ปฏิกิริยา (10 µl) (QIAGEN® Multiplex PCR)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก ค

สัญลักษณ์ที่ใช้แทนลำดับเบส

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค1 ตารางแสดงสัญลักษณ์ที่ใช้แทนลำดับเบส

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

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

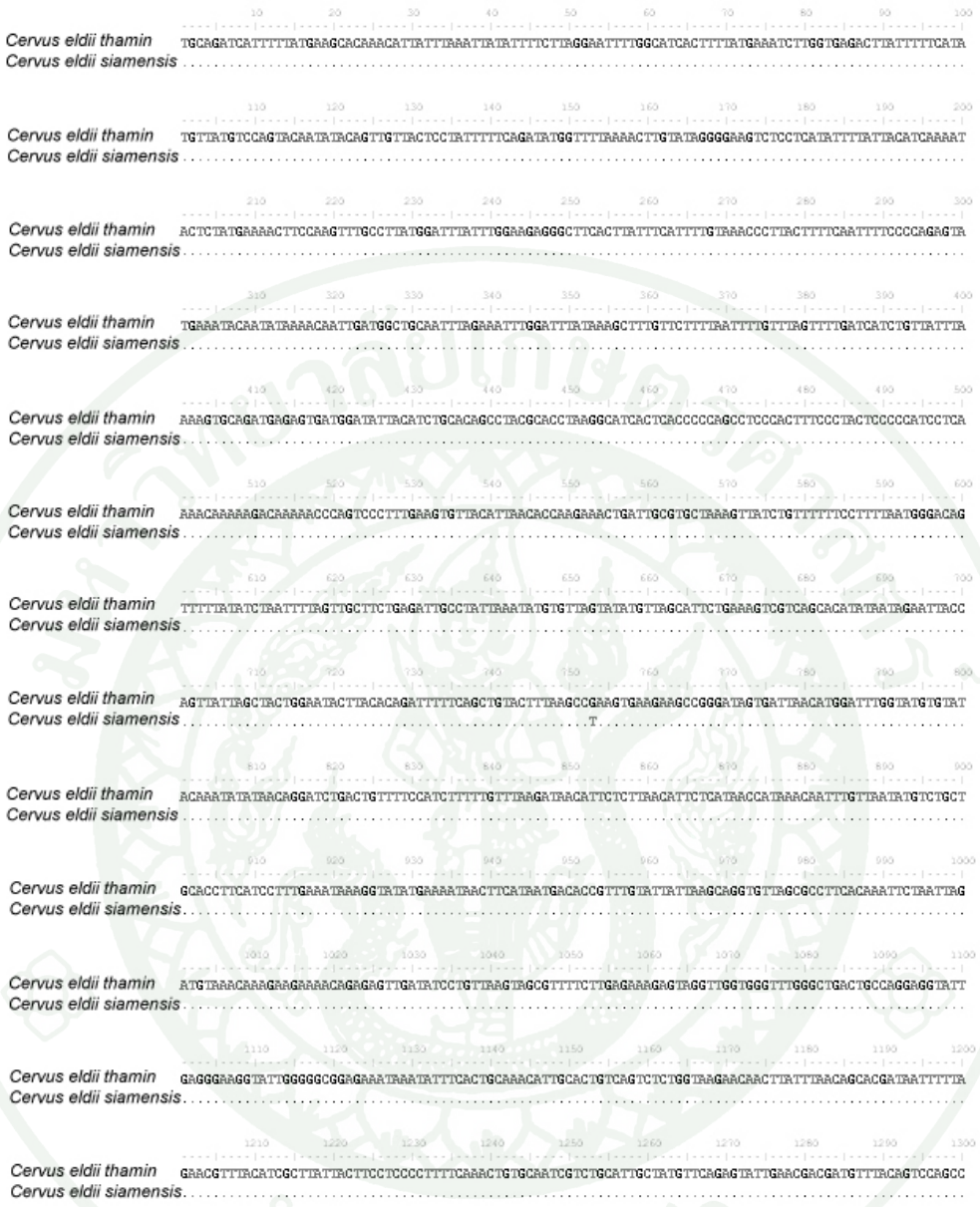
ภาคผนวก ง

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนต่างๆบนโครโมโซมวาย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

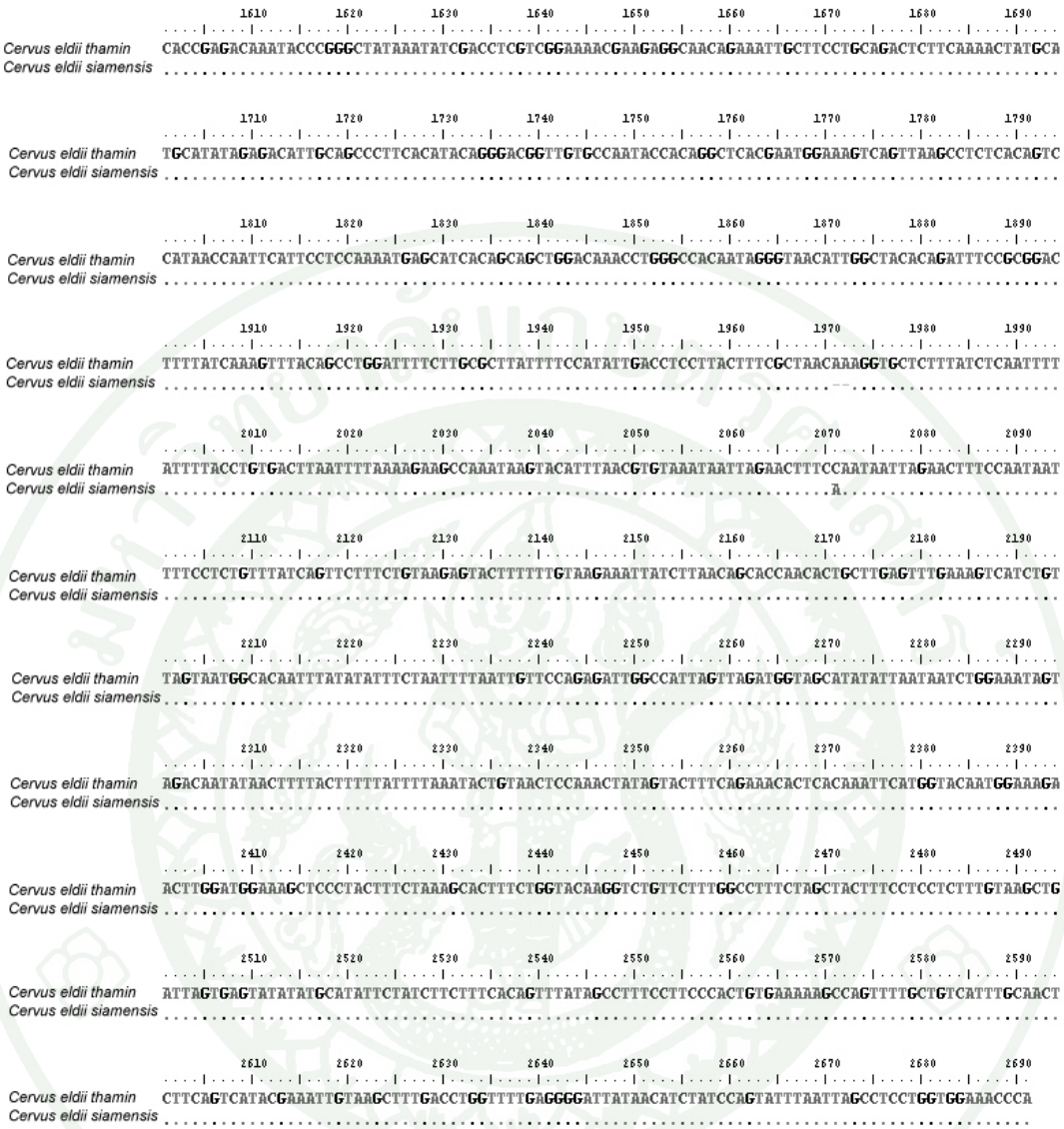
ภาพผนวกที่ ง1 ภาพแสดงข้อมูลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างละมั่งชนิดย่อยพม่า (*Cervus eldii thamin*) และละมั่งชนิดย่อยไทย (*Cervus eldii siamensis*) ในส่วนของยีน *DBY*

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพผนวกที่ ง2 ภาพแสดงข้อมูลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างละมั่งชนิดย่อยพม่า (*Cervus eldii thamin*) และละมั่งชนิดย่อยไทย (*Cervus eldii siamensis*) ในส่วนของยีน*SRY*

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพผนวกที่ ง2 (ต่อ)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพผนวกที่ ง3 ภาพแสดงข้อมูลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างละมั่งชนิดย่อยพม่า (*Cervus eldii thamin*) และละมั่งชนิดย่อยไทย (*Cervus eldii siamensis*) ในส่วนของยีน *ZFY*

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพผนวกที่ ง3 (ต่อ)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นายมานะกร สุขมาก
วัน เดือน ปี ที่เกิด	วันที่ 16 พฤศจิกายน 2526
สถานที่เกิด	ราชบุรี
ประวัติการศึกษา	สัตวแพทยศาสตรบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	-

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์