ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)

ปริญญา

เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร | โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา

สาขา | **ภาควิชา**

เรื่อง ความหลากหลายทางพันธุกรรมในตำแหน่ง Cytochrome b และ Control Region บนไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอในหมาใน (*Cuon alpinus*)

Genetic Diversity of Cytochrome b and Control Region on Mitochondrial DNA in Dhole (*Cuon alpinus*)

นามผู้วิจัย นางสาวจารุวี ค่ายมั่น

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก .....

(อาจารย์สิทธวีร์ ทองทิพย์ศิริเดช, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....

(รองศาสตราจารย์วรวิทย์ วัชชวัลคุ, D.M.S.)

ประธานสาขาวิชา .....

(รองศาสตราจารย์พงศ์เทพ อัครธนกุล, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

.....

(รองศาสตราจารย์กัญจนา ธีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

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

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

ความหลากหลายทางพันธุกรรมในตำแหน่ง Cytochrome b และ Control Region บนไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอในหมาใน (*Cuon alpinus*)

Genetic Diversity of Cytochrome b and Control Region on Mitochondrial DNA in Dhole (*Cuon alpinus*)

โดย

นางสาวจารุวี ค่ายมั่น

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)
พ.ศ. 2554

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จารุวี ค่ายมั่น 2554: ความหลากหลายทางพันธุกรรมในตำแหน่ง Cytochrome b และ Control Region บนไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอในหมาใน (*Cuon alpinus*) ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร) สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: อาจารย์สิทธวีร์ ทองทิพย์ศิริเดช, Ph.D. 82 หน้า

หมาในจัดเป็นหมาป่าขนาดปานกลาง มีประชากรทั่วโลกประมาณ 2,500 ตัว ปัจจุบันถูกจัดอยู่ในระดับใกล้สูญพันธุ์ (Endangered species) โดยสหภาพนานาชาติเพื่อการอนุรักษ์ธรรมชาติและทรัพยากรธรรมชาติ (International Union for the Conservation of Nature and Natural Resources [IUCN] Species Survival Commission, 2009) สำหรับในประเทศไทยนั้นจำนวนประชากรหมาในมีแนวโน้มลดลง เนื่องจากพื้นที่อาศัยถูกทำลาย พื้นป่าถูกตัด แยกออกเป็นหย่อม ๆ ส่วนกรงเลี้ยงนั้นมีจำนวนหมาในเพียง 8 ตัว ทำให้หมาในทั้งในพื้นที่ป่าและในกรงเลี้ยงมีโอกาสในการแลกเปลี่ยนพันธุกรรมระหว่างฝูงลดลง ทำให้เกิดปัญหาประชากรรุ่นลูกไม่แข็งแรงจากการผสมเลือดชิดและความหลากหลายทางพันธุกรรมลดลงส่งผลให้มีความเสี่ยงสูงต่อการสูญพันธุ์ ข้อมูลทางพันธุกรรมเป็นปัจจัยสำคัญในการอนุรักษ์สัตว์ป่า แต่สำหรับในประเทศไทยนั้นข้อมูลเกี่ยวกับความหลากหลายทางพันธุกรรมของสัตว์ป่าที่ใกล้สูญพันธุ์รวมถึงหมาในด้วยนั้นยังมีอยู่น้อย ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในบางส่วนของ cytochrome b ความยาว 407 คู่เบสและ control region ความยาว 246 คู่เบส บนไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของหมาในจากตัวอย่างมูลที่ได้จากเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาอ่างฤาไน จังหวัดฉะเชิงเทราและหมาในในกรงเลี้ยง จังหวัดเชียงใหม่ โดยทำการเปรียบเทียบกับลำดับเบสในส่วนไมโตคอนเดรียของหมาในที่มีรายงานใน GenBank accession number NC013445 และเปรียบเทียบกับรายงานของ Iyengar *et al*. (2005) ผลการศึกษาลำดับเบสที่ได้จากตัวอย่างมูลพบว่าสามารถแบ่งรูปแบบของลำดับเบสในส่วน cytochrome b ได้เป็น 2 haplotypes (1 และ 2) และ ส่วน control region แบ่งได้เป็น 3 haplotypes (R, T และ U)โดยสองในสามเป็นกลุ่มใหม่ คือ haplotype T จากมูล 23 ตัวอย่างที่ได้จากเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาอ่างฤาไนและ haplotype U จากมูลหมาใน 4 ตัวอย่างที่ได้จากกรงเลี้ยงในจังหวัดเชียงใหม่ ซึ่งข้อมูลเกี่ยวกับความหลากหลายทางพันธุกรรมของหมาในสามารถนำไปใช้ในการจัดการการผสมพันธุ์ เพื่อเลือกกลุ่มผสมที่เหมาะสม และเพื่อจัดการในการอนุรักษ์ต่อไป

_____ _____ ___ / ___ / ___

ลายมือชื่อนิสิต ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Jaruwee Kayman 2011: Genetic Diversity of Cytochrome b and Control Region on Mitochondrial DNA in Dhole (*Cuon alpinus*). Master of Science (Agricultural Biotechnology), Major Field: Agricultural Biotechnology, Interdisciplinary Graduate Program. Thesis Advisor: Mr. Sitthawee Thongtipsiridech, Ph.D. 82 pages.

Dhole (*Cuon alpinus*) is a medium-sized canine. International Union for the Conservation of Nature and Natural Resources [IUCN] Species Survival Commission (2009) reported about two-thousand and five-hundred dholes lived worldwide and the dhole is listed as an endangered species. In Thailand, population of wild dhole is decreasing due to the impacts of illegal hunting and increasing rate of habitat fragmentation. Furthermore, captive dholes have small populations and little chance of mating. These reasons might be effect to increase genetic diversity lossing and inbreeding opportunity. Mitochondrial DNA diversity, which indicates the variation of maternal lineage is one of important tool for wildlife conservation. At present, no report on genetic information of dholes in Thailand. Then, the objective of this study was to analyze the sequence variation of the partial cytochrome b and control region sequence on mitochondrial DNA (fragment length 407 and 246 base pairs, respectively) in faecal samples from wild dholes in Khao Ang Ruenai Wildlife Sanctuary (KARWS) and captive dholes in Chaing Mai Province, Thailand. The obtained sequences were compared with complete mitochondrial DNA genome in GenBank accession number NC013445 and the previously reported by Iyengar *et al*. (2005). The results revealed two haplotypes (1 and 2) of 407 bp on cytochrome b and three haplotypes (R, U and T) of 246 bp on control region among all thirty-one faecal samples. Two of the three haplotypes based on this control region are new haplotype. The new haplotype from twenty-three faecal samples from KARWS is identified grouping in haplotype T. The new haplotype U was found from four faecals samples from captive dholes. This datas will be used to fulfill dhole conservation program in Thailand.

_____ _____ ___ / ___ / ___

Student's signature Thesis Advisor's signature

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ อ. น.สพ.ดร.สิทธวีร์ ทองทิพย์ศิริเดช ประธานกรรมการที่ปรึกษา และรองศาสตราจารย์ ดร.วรวิทย์ วัชชวัลคุ กรรมการที่ปรึกษาร่วมที่กรุณาให้คำปรึกษาในด้านการศึกษา งานวิจัย การตรวจสอบและแก้ไขการเขียนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนกระทั่งสำเร็จลุล่วง

ขอขอบพระคุณ ครอบครัวค่ายมั่นและครอบครัวช้างแก้วที่ให้การสนับสนุนในทุกด้าน ขอขอบพระคุณ คุณสไว วังหงษา นักวิชาการป่าไม้ชำนาญการพิเศษ เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาอ่างฤาไน จังหวัดฉะเชิงเทรา กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพันธุ์พืช องค์การสวนสัตว์ในพระบรมราชูปถัมภ์ที่อนุเคราะห์ตัวอย่างในการศึกษาครั้งนี้และขอขอบพระคุณคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม ที่เอื้อเฟื้อสถานที่สำหรับการทำงานในห้องปฏิบัติการ

ขอขอบพระคุณ น.สพ.ดร.มาโนญช์ ยินดี น.สพ.อนุรุทธ์ อังศุสิงห์และนายสัตวแพทย์ประจำสวนสัตว์เชียงใหม่ รวมทั้งเจ้าหน้าที่ดูแลสัตว์ทุกท่านที่ช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างมูลในการศึกษาครั้งนี้ ขอบคุณเพื่อนร่วมงานในห้องปฏิบัติการที่ให้คำแนะนำในงานปฏิบัติการและเจ้าหน้าที่ประจำศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตรที่ให้ความช่วยเหลือเกี่ยวกับงานด้านเอกสาร

ขอขอบพระคุณ Kate Jenks นักศึกษาปริญญาเอก Massachusetts-Amherst University, ประเทศสหรัฐอเมริกา สำหรับข้อมูลหมาในในพื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาอ่างฤาไนและขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.จิตรตรา เพียภูเขียว อาจารย์ประจำภาควิชาพฤกษศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในการให้คำแนะนำและช่วยเหลือในการใช้โปรแกรม PAUP เพื่อวิเคราะห์ลำดับเบส

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ (AG-BIO/PERDO-CHE)

จารุวี ค่ายมั่น

มกราคม 2554

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(6)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	4
การตรวจเอกสาร	5
อุปกรณ์และวิธีการ	29
ผลและวิจารณ์	41
สรุปและข้อเสนอแนะ	60
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	63
ภาคผนวก	68
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	82

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ตารางแสดงยีนและโปรตีนทั้ง 13 ชนิดที่ถอดรหัสจากไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ	17
2	ตารางแสดงความแตกต่างระหว่าง Nuclear genetic code กับ Mitochondrial genetic code	19
3	ตารางแสดงลำดับเบส อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการจับของไพรเมอร์ (annealing temperature) และขนาดของผลผลิต PCR ที่คาดว่าจะได้ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษา	40
4	ตารางแสดงตำแหน่งเบสที่แตกต่างกันในบางส่วนของ cytochrome b ขนาดความยาว 407 bp บนไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ จากตัวอย่างมูลหมาใน 31 ตัวอย่าง	54
5	ตารางแสดงตำแหน่งเบสที่แตกต่างกันในบางส่วนของ control region ขนาดความยาว 246 bp บนไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ จากตัวอย่างมูลหมาใน 31 ตัวอย่าง	55
6	ตารางแสดงข้อมูลหมาในทั้ง 8 ตัวในกรงเลี้ยงและ haplotype ที่พบในการศึกษานี้	56
7	ตารางแสดงค่า Pairwise distance ของลำดับเบสในบางส่วนของ control region บนไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอของหมาใน (*Cuon alpinus*) โดย 1. หมาใน (Accession number NC013445) 2. Haplotype R (Accession number AY682716 and in this study) 3. Haplotype U (in this study) 4. Haplotye T (in this study)	57

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่		หน้า
ข1	ตารางแสดงตำแหน่งพิกัดของตัวอย่างมูลที่พบในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาอ่างฤาไน จังหวัดฉะเชิงเทราและวัน เดือน ปีที่ทำการเก็บตัวอย่าง	73
ข2	ตารางแสดงตำแหน่งพิกัดของกล้องดักถ่ายภาพสัตว์ที่สามารถถ่ายภาพหมาในในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาอ่างฤาไนได้และวัน เดือน ปีที่ภาพถ่ายถูกบันทึก	74
ค1	ตารางแสดงองค์ประกอบของสารละลายในปฏิกิริยา PCR ในการศึกษาความหลากหลายลำดับเบสบนไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ	77
ง1	ตารางแสดงสัญลักษณ์ที่ใช้แทนลำดับเบส	79

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ภาพแสดงหมาใน (*Cuon alpinus*) ในกรงเลี้ยงของสวนสัตว์เชียงใหม่ไนท์ซาฟารี	5
2	ภาพแสดงการกระจายของหมาในทั้ง 11 ชนิดย่อย ตำแหน่งการกระจายของตัวอย่างหมาในและแสดงการกระจายของ haplotype ที่พบทั้งหมด 19 กลุ่ม จากการศึกษาของ Iyengar *et al*. (2005)	9
3	ภาพแสดงโครงสร้างจีโนมไมโตคอนเดรีย	16
4	ภาพแสดงแผนที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาอ่างฤาไน จังหวัดฉะเชิงเทรา ขอบเขตพื้นที่ศึกษาและตำแหน่งที่ทำการเก็บตัวอย่างมูลหมาในเพื่อสกัดดีเอ็นเอ	31
5	ภาพแสดงแผนที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาอ่างฤาไน จังหวัดฉะเชิงเทรา ขอบเขตพื้นที่ศึกษาและตำแหน่งที่ถ่ายภาพหมาในด้วยกล้องดักถ่ายภาพสัตว์	32
6	ภาพแสดงตำแหน่งของไพรเมอร์ ณ ตำแหน่งบางส่วนของ tRNA-Glu กับ cytochrome b และ tRNA-Pro กับ control region บนไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ และขนาดของผลผลิตที่คาดว่าจะได้ของไพรเมอร์คู่ CB0 กับ CB2 และคู่ D-loopFw กับ D-loopRe	37
7	ภาพแสดงลำดับเบสในบางส่วนของ tRNA-Glu และ cytochrome b บนไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอและตำแหน่งไพรเมอร์ CB0 และ CB2 ที่ออกแบบในการศึกษานี้	38
8	ภาพแสดงลำดับเบสในบางส่วนของ tRNA-Pro และ control region บนไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ และตำแหน่งไพรเมอร์ D-loopFw และ D-loopReที่ออกแบบในการศึกษานี้	39
9	แสดงแถบผลผลิต PCR ที่ปรากฏเมื่อทดสอบด้วยไพรเมอร์คู่ CB0 และ CB2 ที่จำเพาะต่อส่วนของ tRNA-Glu และ cytochrome b บนไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ	47
10	แสดงแถบผลผลิต PCR ที่ปรากฏเมื่อทดสอบด้วยไพรเมอร์คู่ D-loopFw และ D-loopRe ที่จำเพาะต่อบางส่วนของ tRNA-Pro และ control region บนไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ	48

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
11	แสดงการนำลำดับเบสที่ได้หลังจากการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR ได้ผลผลิตในขนาดที่ต้องการและทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ แล้วมา BLAST ใน GenBank เพื่อตรวจสอบว่าลำดับเบสที่ได้เป็นหมาในจริงหรือไม่	49
12	แสดงผลของการนำลำดับเบสในส่วนของ cytochrome b ความยาวประมาณ 440 bp มา BLAST ใน GenBank และตรวจสอบได้ผลว่าเป็นหมาในจริง	50
13	แสดงผลของการนำลำดับเบสในส่วนของ control region ความยาวประมาณ 340 bp มา BLAST ใน GenBank และตรวจสอบได้ผลว่าเป็นหมาในจริง	51
14	แสดงการเปรียบเทียบลำดับเบสในบางส่วนของ cytochrome b ความยาว 407 bp เพื่อทำการจัดกลุ่ม (haplotype) ของตัวอย่างมูลหมาใน 31 ตัวอย่าง	52
15	แสดงการเปรียบเทียบลำดับเบสในบางส่วนของ control region ความยาว 246 bp เพื่อทำการจัดกลุ่ม (haplotype) ของตัวอย่างมูลหมาใน 31 ตัวอย่าง	53
16	แสดง Phylogenetic tree บางส่วนของ cytochrome b และ control region บนไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ ด้วยวิธี Maximum Parsimony (MP) และ Maximum Likelihood (ML) ร่วมกับการทดสอบความน่าเชื่อถือของ tree ด้วย Bootstrap 1,000 รอบ	58
17	แสดงเครือข่าย (Median-joining network) ของหมาใน จากการศึกษาในบางส่วนของ control region บนไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอความยาว 246 bp	59

ภาพผนวกที่

จ1	แสดงข้อมูลการ alignment ของลำดับเบสในส่วน cytochrome b ความยาว 1,140 bp ของหมาใน (*Cuon alpinus*), สุนัขบ้าน (*Canis lupus familiaris*) และสุนัขจิ้งจอก (*Canis aureus*)	81

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

ATP	=	adenosine triphosphate.
ATPase	=	adenosine triphosphate synthase.
CO	=	cytochrome oxidase.
CR	=	control region.
CYTB	=	cytochrome b.
DNA	=	deoxyribonucleic acid.
D-loop	=	displacement loop.
HVS	=	hypervariable region.
ML	=	maximum likelihood.
MP	=	maximum parsimony.
MtDNA	=	mitochondrial deoxyribonucleic acid.
Mt rRNA	=	mitochondrial ribosomal ribonucleic acid.
Mt tRNA	=	mitochondrial transfer ribonucleic acid.
ND	=	NADH-ubiquinone reductase.
NJ	=	neighbor joining.
PCR	=	polymerase chain reaction.
UPGMA	=	unweighted pair group method with arithmetic mean.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ความหลากหลายทางพันธุกรรมในตำแหน่ง Cytochrome b และ Control Region บนไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอในหมาใน (*Cuon alpinus*)

Genetic Diversity of Cytochrome b and Control Region on Mitochondrial DNA in Dhole (*Cuon alpinus*)

คำนำ

หมาใน (Dhole, Asiatic Wild Dog, Red dog, Indian Wild Dog; *Cuon alpinus*) เป็นหมาป่าขนาดกลางชนิดหนึ่ง พบได้ในทวีปเอเชียโดยพบกระจายจากประเทศปากีสถาน สาธารณรัฐอินเดีย ประเทศเนปาล ธิเบต ไซบีเรีย สาธารณรัฐประชาชนจีน เกาหลี มองโกเลีย สาธารณรัฐสหภาพแห่งพม่า สาธารณรัฐสังคมนิยมเวียดนาม ไทย สาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว กัมพูชา มาเลเซีย ลงไปจนถึงสุมาตรา และเกาะชวาของอินโดนีเซีย หมาในทั่วโลกถูกแบ่งตามสีขนและความยาวขนซึ่งสามารถแบ่งได้ทั้งหมด 11 ชนิดย่อย (subspecies) หมาในที่พบในประเทศไทยจัดอยู่ในชนิดย่อย *Cuon alpinus infuscus* (Durbin *et al*., 2004) หมาในถือว่าเป็นสัตว์ผู้ล่าที่สำคัญอีกชนิดหนึ่งในการควบคุมประชากรของสัตว์ป่าขนาดเล็กและขนาดกลางของระบบนิเวศ หมาในพบได้ทั่วทุกภาคของประเทศไทย ปัจจุบันเหลืออยู่แต่เฉพาะในพื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าและอุทยานแห่งชาติเพียงบางแห่งเท่านั้น สาเหตุเนื่องจากป่าที่อยู่อาศัยถูกทำลาย และเหยื่อจำพวกเก้ง กวางลดจำนวนลงอย่างรวดเร็วจนไม่เพียงพอต่อการเป็นอาหารแก่ฝูงหมาใน นอกจากนี้ในบางพื้นที่ยังมีการล่าหมาในอีกด้วย ทำให้ประชากรหมาในลดลงอย่างรวดเร็ว สถานภาพปัจจุบันหมาในจัดอยู่ในระดับใกล้สูญพันธุ์โดยสหภาพนานาชาติเพื่อการอนุรักษ์ธรรมชาติและทรัพยากรธรรมชาติ (International Union for the Conservation of Nature and Natural Resources [IUCN] Species Survival Commission, 2009) และในประเทศไทยหมาในจัดเป็นสัตว์ป่าคุ้มครอง ตามพระราชบัญญัติสงวนและคุ้มครองสัตว์ป่า พุทธศักราช 2535 (จารุวรรณ, 2553)

ปัญหาจำนวนประชากรที่ลดลง พื้นที่อยู่อาศัยถูกทำลาย พื้นที่ป่าในประเทศไทยประสบปัญหาถูกตัด และแยกออกเป็นหย่อม ทำให้โอกาสในการแลกเปลี่ยนพันธุกรรมระหว่างฝูงลดลง เกิดปัญหาประชากรรุ่นลูกไม่แข็งแรงจากการผสมเลือดชิด (Inbreeding) และความหลากหลายทาง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พันธุกรรม (genetic diversity) ลดลง เช่นเดียวกับหมาในในกรงเลี้ยงที่มีประชากรกลุ่มเล็กไม่มีโอกาสเลือกคู่ผสมพันธุ์เพื่อเพิ่มความหลากหลายทางพันธุกรรม

ข้อมูลทางพันธุกรรมสามารถใช้ในการประเมินความสัมพันธ์ทางเครือญาติ และนำมาใช้เป็นข้อมูลสำหรับการจัดการผสมพันธุ์ เพื่อหลีกเลี่ยงการเกิดปัญหาเลือดชิด (inbreeding) ปัจจุบันมีการใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล (molecular biotechnology) เพื่อศึกษาข้อมูลทางพันธุกรรม โดยนิยมศึกษาทั้งในโครโมโซมร่างกาย (autosome) และจากไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ (mitochondrial DNA) ซึ่งดีเอ็นเอจากไมโตคอนเดรียนั้นมีการถ่ายทอดผ่านเฉพาะบรรพบุรุษสายแม่สู่ลูกเท่านั้น (maternal inheritance) จึงทำให้สามารถโยงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (evolutionary relationship) ระหว่างรูปแบบที่แตกต่างกันของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของแต่ละบุคคล (Brown, 1980) หรือสัตว์แต่ละตัว แสดงผลเป็นโครงสร้างต้นไม้วิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ทำให้สืบย้อนกลับขึ้นไปถึงบรรพบุรุษสายแม่ (maternal linage) ของสัตว์นั้นๆได้ (พัชรีย์, 2549)

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของหมาในในประเทศไทยเคยมีรายงานโดย Iyengar *et al*. (2005) ซึ่งเป็นการศึกษาจากตัวอย่างมูลในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูเขียว จังหวัดชัยภูมิ จำนวน 5 ตัวอย่าง ทำการศึกษาในบางส่วนของ cytochrome b และ control region หรือ D-loop บนสายไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ เพื่อจะทำการจัดกลุ่ม (haplotype) ของหมาใน จากการศึกษาในบางส่วนของ cytochrome b ขนาดความยาว 321 คู่เบส (bp) หมาในของประเทศไทยถูกจัดเป็น haplotype 2 ในทั้งหมด 2 กลุ่ม (haplotype 1 และ 2) ส่วนการศึกษาในบางส่วนของ control region นั้นสามารถแบ่งหมาในของไทย ได้ 2 haplotypes คือ haplotype E และ G ในทั้งหมด 19 กลุ่ม (haplotype A-S) ตามความแตกต่างของลำดับเบสในส่วนของ control region ขนาดความยาว 246 bp และจากการทำโครงสร้างต้นไม้วิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) นั้นหมาในของไทยจากเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูเขียวถูกจัดอยู่ใน clade II ร่วมกับตัวอย่างหมาในที่ได้มาจากพิพิธภัณฑ์ทางตอนเหนือ และตะวันออกของสาธารณรัฐอินเดีย พิพิธภัณฑ์จากสาธารณรัฐแห่งสหภาพพม่าและตัวอย่างมูลหมาในจากป่าของประเทศมาเลเซีย สอดคล้องตามความแตกต่างของลำดับเบสในส่วนของ cytochrome b ที่เหมือนกัน ซึ่งตัวอย่างดังกล่าวนั้นถูกจัดเป็น haplotype 2 เช่นเดียวกัน การศึกษานี้ถือว่าเป็นงานวิจัยแรกที่ทำการศึกษาเกี่ยวกับความหลากหลายทางพันธุกรรมของหมาในและเป็นงานวิจัยที่มีประโยชน์ในแง่การอนุรักษ์หมาในเป็นอย่างยิ่ง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาของ Iyengar *et al.* (2005) นั้นเป็นตัวอย่างที่มาจากผืนป่าแห่งเดียวในประเทศไทย จึงไม่สามารถบอกได้ครอบคลุมว่าประเทศไทยมีความหลากหลายทางพันธุกรรมของหมาในแบ่งได้ทั้งหมดกี่กลุ่ม (haplotype) ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อให้ได้ข้อมูลที่เพิ่มมากขึ้น การวิจัยนี้จึงมีจุดประสงค์ที่จะศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของหมาในเพิ่มเติมในพื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาอ่างฤาไน จังหวัดฉะเชิงเทราและหมาในในกรงเลี้ยงของประเทศไทย โดยทำการศึกษาในบางส่วนของ cytochrome b และ hypervariable region 1 หรือ left domain ของ control region หรือ D-loop บนสายไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของหมาใน เพื่อให้ได้มาซึ่งข้อมูลเกี่ยวกับความหลากหลายทางพันธุกรรมของหมาในในประเทศไทยเพิ่มเติมจากการศึกษาที่ผ่านมา ซึ่งข้อมูลเกี่ยวกับความหลากหลายทางพันธุกรรมของหมาในในประเทศไทยที่ได้มานั้นสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการประเมินความสัมพันธ์ทางเครือญาติและนำมาใช้เป็นข้อมูลสำหรับวางแผนการจัดการผสมพันธุ์และการอนุรักษ์หมาในต่อไป

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในบางส่วนของ cytochrome b และ control region บนไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอจากตัวอย่างมูลหมาในที่อาศัยในกรงเลี้ยงของสวนสัตว์เชียงใหม่ สวนสัตว์เชียงใหม่ไนท์ซาฟารี จังหวัดเชียงใหม่และหมาในที่อาศัยในพื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาอ่างฤาไน จังหวัดฉะเชิงเทราและเปรียบเทียบกับรายงานของ Iyengar *et al*. (2005)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การตรวจเอกสาร

1. หมาใน *(Cuon alpinus)*

สัตว์ป่าในวงศ์สุนัข (Canidae) ประกอบด้วย 16 สกุล 36 ชนิด ในประเทศไทยพบเพียง 2 สกุล คือสกุล *Canis* คือ สุนัขจิ้งจอก (Asiatic jackal; *Canis aureus*) และสกุล *Cuon* คือ หมาใน (Asiatic wild dog; *Cuon alpinus*)

ภาพที่ 1 แสดงภาพหมาใน (*Cuon alpinus*) ในกรงเลี้ยงของสวนสัตว์เชียงใหม่ไนท์ซาฟารี

หมาในเป็นสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่ถูกจัดอยู่ในอันดับ (Order): Carnivora วงศ์ (Family): Canidae วงศ์ย่อย (Subfamily): Caninae จีนัส (Genus): *Cuon* ชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Cuon alpinus* (Pallas, 1811) ชื่อไทยคือ หมาในหรือหมาแดง ชื่ออังกฤษคือ dhole, Asiatic wild dog, red dog และ Indian wild dog (Lekagul and McNeely, 1977)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สัตว์ในวงศ์ Canidae มีทั้งหมด 36 ชนิด แบ่งเป็น 3 กลุ่มคือ กลุ่มแรก wolflike carnivore กลุ่มที่สอง jackallike carnivore และกลุ่มที่สาม foxlike carnivore โดยมี 23 ชนิดที่เคยศึกษาโดย Wayne *et al*. (1987, 1989, 1993) โดยทำการจัดแบ่งตามประวัติ รูปแบบและจำนวนโครโมโซม แบ่งเป็น 4 กลุ่มได้แก่ กลุ่ม wolflike, South American, red-foxe-like และกลุ่มอื่นๆ ซึ่งหมาในถูกจัดอยู่ในกลุ่มของ wolflike canid ซึ่งกลุ่มนี้แบ่งเป็น 3 กลุ่มย่อยคือ 1) กลุ่มย่อย wolflike small size (5-10 กิโลกรัม) ประกอบด้วย golden jackal (*Canis aureus*), side-striped jackal (*Canis adustus*) และ black-backed jackal (*Canis mesomelas*) 2) กลุ่มย่อย wolflike large size (12-30 กิโลกรัม) ประกอบด้วย Simien jackal (*Canis simensis*), grey wolf (*Canis lupus*) และ coyote (*Canis latrans*) 3) กลุ่มย่อย trenchant heel ซึ่งหมาในถูกจัดอยู่ในกลุ่มย่อยนี้ร่วมกับ African wild dog (*Lycaon pictus*) และ bush dog (*Speothos venaticus*) ตามลักษณะของ trenchant-heeled carnassial molar ที่สั้น จากการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของ Wayne *et al*. (1997) ในสัตว์ 23 ชนิดที่อยู่ในวงศ์สุนัขรวมถึงหมาในด้วย โดยใช้ลำดับเบสในบางส่วนของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอความยาว 2,001 bp ประกอบด้วยส่วนของ cytochrome b ความยาว 729 bp, cytochrome *c* oxidase I (COI, 588 bp) และ cytochrome *c* oxidase II (COII, 684 bp) นำมาหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ พบว่าหมาในถูกจัดอยู่ในกลุ่มของ wolflike canid ร่วมกับ Simien jackal, golden jackal, black-backed jackal, grey wolf และ coyote แต่ African wild dog และ bush dog มีปัญหาในการจัดรวมอยู่ในกลุ่มนี้คือ ค่าที่สนับสนุนในการจัดรวมอยู่ในกลุ่มเดียวกันมีค่าต่ำ หรือความน่าจะเป็นต่ำที่จะจัดรวมอยู่ในกลุ่ม wolflike canid ซึ่งผลที่ได้นี้ไม่สอดคล้องกับข้อมูลที่จำแนกโดยใช้การพัฒนาของ trenchant-heeled carnassial molar (Wayne *et al*., 1997)

หมาในเป็นหนึ่งใน 32 ชนิดของสัตว์ผู้ล่าขนาดเล็กที่เลี้ยงลูกด้วยนม ซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อการดำรงความหลากหลายทางชีวภาพในระบบนิเวศ เช่น ช่วยในการควบคุมจำนวนประชากรของหนู สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมขนาดเล็ก และขนาดกลางอื่น ๆ ซึ่งหมาในถูกจัดอยู่ในกลุ่มสัตว์ที่จำเป็นต้องได้รับการอนุรักษ์อย่างเร่งด่วน (วัลลภ และคณะ, 2553)

หมาในจัดเป็นหมาป่าขนาดปานกลาง มีน้ำหนักตัวประมาณ 10-20 กิโลกรัม มีขนหนาสีน้ำตาลแดงอมส้ม หางยาวและมีสีเข้มกว่าลำตัว มีขนในหูเป็นสีขาว หมาในที่มีการกระจายอยู่ทางเหนือจะมีขนสีน้ำตาล หรือสีเหลืองอ่อนและมีขนยาวกว่าหมาในที่อยู่ทางใต้ลงมา นิ้วเท้ามีขนสีแดงน้ำตาล หรือสีขาว มีขนบริเวณนิ้วเท้าหน้าทุกนิ้วคล้ายสุนัขบ้าน สำหรับหมาในในประเทศไทยนั้นมีขนสีน้ำตาลแดงตลอดทั้งตัว หลังมีขนสีเข้มกว่าที่ลำตัว ขนด้านล่างของคอ หน้าอกและท้องมีสีขน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อ่อนกว่าลำตัว ขนในหูสีขาว หางเป็นพวงฟูสีดำ หางยาวประมาณ 40-45 เซนติเมตร หมาในมีกรามและฟันที่แข็งแรงมาก หมาในมีฟันกรามล่างสองซี่ซึ่งต่างจากหมาประเภทอื่นที่มีฟันกรามล่างสามซี่ โดยทั่วไปมีเต้านมจำนวน 12-14 คู่ (Lekagul and McNeely, 1977)

Mivart (1890) แบ่งหมาในเป็นสองชนิด (species) ได้แก่ หมาในตอนใต้ *(Cuon javanicus)* และหมาในตอนเหนือ *(Cuon alpinus)* โดยใช้ขนาดลำตั ฟันกรามบนและฟันกรามล่างที่สองเป็นเกณฑ์ในการแบ่ง ต่อมา Ellerman and Morrison-Scott (1951) แบ่งเป็น 10 ชนิดย่อย (subspecies) ต่อมา Ginsberg และ Macdonald (1990) ใช้สีขนและความยาวขนเป็นเกณฑ์ในการแบ่งหมาในได้ 11 ชนิดย่อย (subspecies) (Durbin *et al*., 2004) ได้แก่

1.1 *Cuon alpinus alpinus* ลำตัวมีขนหนาสีแดงน้ำตาลอ่อน ขนที่คอมีสีเทา พบมีเขตกระจายพันธุ์ที่รัสเซียตะวันออก

1.2 *Cuon alpinus lepturus* ลำตัวมีขนสีแดงหนา มีเขตกระจายพันธุ์อยู่ทางตอนใต้ของแม่น้ำแยงซีเกียง สาธารณรัฐประชาชนจีน

1.3 *Cuon alpinus dukhunensis* ลำตัวมีขนสีแดงอ่อน มีขนสั้นที่อุ้งเท้าและมีหนวดสีดำ มีเขตการกระจายพันธุ์อยู่ทางตอนใต้ของแม่น้ำคงคา สาธารณรัฐอินเดีย

1.4 *Cuon alpinus adjustus* ลำตัวมีขนสีน้ำตาลแดงอ่อน มีการกระจายอยู่ทางตอนเหนือของสาธารณรัฐแห่งสหภาพพม่าและอินโดจีน ทางตะวันออกเฉียงเหนือของสาธารณรัฐอินเดีย

1.5 *Cuon alpinus primaevus* มีขนยาวและขนมีสีแดงเข้มกว่าชนิดย่อย *C. a. dukhunensis* มีขนยาวที่อุ้งเท้า มีเขตกระจายพันธุ์อยู่ทางเทือกเขาหิมาลัยในเนปาล สิกขิมและภูฏาน

1.6 *Cuon alpinus laniger* มีขนสีเหลืองอ่อนถึงเทา หางไม่เป็นสีดำแต่มีสีคล้ายลำตัว มีเขตการกระจายพันธุ์อยู่ทางแคชเมียร์และทางตอนใต้ของทิเบต

1.7 *Cuon alpinus hesperius* มีขนยาวและขนมีสีเหลืองถึงสีดีบุก ขนด้านในมีสีขาวและมีหนวดสีอ่อน มีเขตการกระจายพันธุ์อยู่ทางตะวันออกของรัสเซียและสาธารณรัฐประชาชนจีน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1.8 *Cuon alpinus fumosus* มีขนสีเหลืองอ่อนถึงสีแดง ขนที่หลังมีสีเข้มและขนที่คอมีสีเทา มีเขตการกระจายพันธุ์อยู่ทางตะวันตกของมณฑลเสฉวน สาธารณรัฐประชาชนจีนและมองโกเลีย

1.9 *Cuon alpinus infuscus* มีขนสีน้ำตาลตลอดลำตัว มีเขตการกระจายพันธุ์อยู่ทางตอนใต้ของสาธารณรัฐแห่งสหภาพพม่า มาเลเซีย ไทย สาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว กัมพูชา และสาธารณรัฐสังคมนิยมเวียดนาม

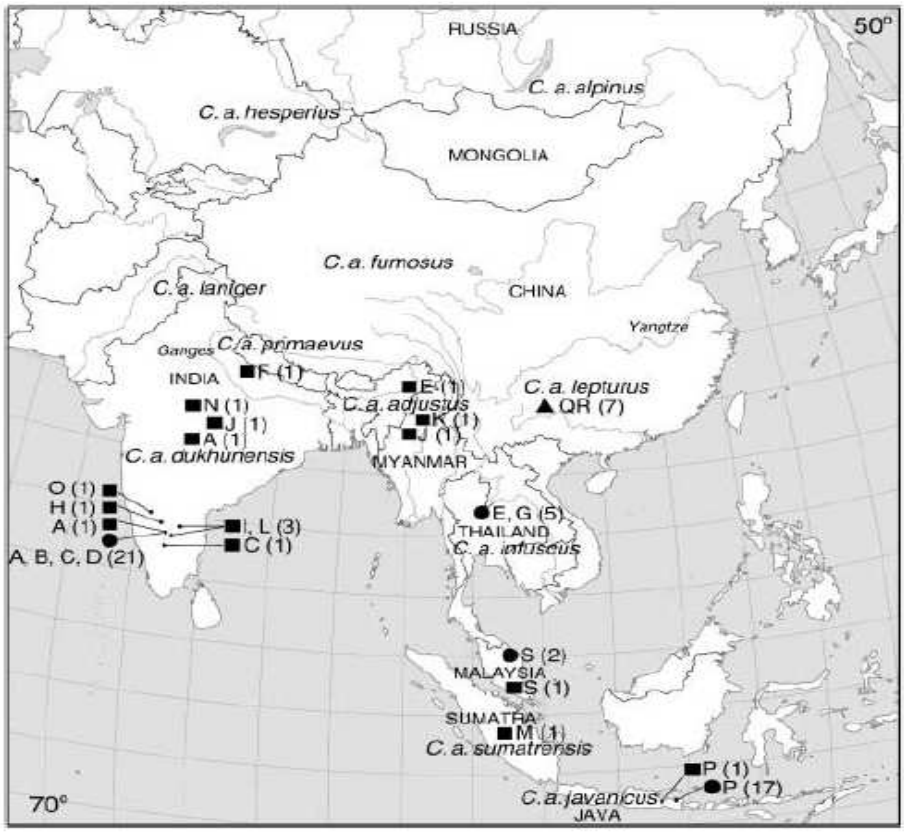
1.10 *Cuon alpinus sumatrensis* มีขนสั้นสีแดงและหนวดมีสีเข้ม มีเขตการกระจายพันธุ์อยู่ที่สุมาตรา อินโดนีเซีย

1.11 *Cuon alpinus javanicus* มีขนสั้นสีแดงอ่อน มีเขตการกระจายพันธุ์อยู่ที่เกาะชวา อินโดนีเซีย

จากการศึกษาของ Iyengar *et al*. (2005) ที่ใช้ลำดับเบสในส่วนของ cytochrome b ขนาด 321 bp สามารถจำแนกตามความหลากหลายของลำดับเบสได้เป็น 2 กลุ่ม (haplotype) คือ haplotype 1 (clade I) พบการกระจายครอบคลุมสาธารณรัฐอินเดียตอนใต้ ตอนกลางและตอนเหนือ รวมถึงตอนบนของสาธารณรัฐแห่งสหภาพพม่าและ haplotype 2 (clade II) พบการกระจายครอบคลุมตอนเหนือของสาธารณรัฐอินเดีย ในส่วนด้านทิศตะวันออกเฉียงเหนือของแม่น้ำคงคา สาธารณรัฐแห่งสหภาพพม่า ไทย และคาบสมุทรมลายูและ control region ขนาด 246 bp สามารถจำแนกได้เป็น 19 กลุ่ม คือ haplotype A-S (GenBank accession number AY682699-AY682717) ตามตำแหน่งที่พบตัวอย่างหมาในที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ (ภาพที่ 2) ในกรณีของ haplotype Q และ R นั้นได้ตัวอย่างมาจากหมาในในกรงเลี้ยง Haplotype E, F, G, K และ S ถูกจัดอยู่ใน clade I ส่วน haplotype อื่น ๆ ที่นอกเหนือจากนี้ถูกจัดอยู่ใน clade II

การจัดชนิดย่อยของหมาในโดยใช้ข้อมูลความแตกต่างของลำดับเบสในส่วนของ cytochrome b และ control region บนไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอนั้นมีความยากในการใช้เพื่อจำแนกความแตกต่างของทั้ง 11 ชนิดย่อย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 2 แสดงภาพการกระจายของหมาในทั้ง 11 ชนิดย่อย การกระจายของตำแหน่งที่พบตัวอย่างหมาในและแสดงการกระจายของ haplotype ที่พบทั้งหมด 19 กลุ่มจากการศึกษาของ Iyengar *et al*. (2005) โดย● แทนตัวอย่างมูลที่ได้จากป่า, ■ แทนตัวอย่างที่ได้จากพิพิธภัณฑ์และ ▲ แทนตัวอย่างที่ได้จากหมาในในกรงเลี้ยง

ที่มา: Iyengar *et al*. (2005)

2. นิเวศวิทยา (Ecology of Dhole)

หมาในพบได้ตั้งแต่เอเชียตะวันออก โดยพบกระจายจากประเทศปากีสถาน สาธารณรัฐอินเดีย เนปาล ธิเบต ไซบีเรีย สาธารณรัฐประชาชนจีน เกาหลี มองโกเลีย สาธารณรัฐแห่งสหภาพพม่า สาธารณรัฐสังคมนิยมเวียดนาม ไทย สาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว กัมพูชา ลงไปจนถึงมาเลเซีย สุมาตรา และเกาะชวาของอินโดนีเซีย สามารถพบได้ในพื้นที่ป่าหลายประเภท อาทิ เช่น ป่าทึบบนภูเขา ป่าไม้พุ่ม ป่าอัลไพน์ จนถึงป่าเปิดใกล้ทุ่งหญ้า แต่ไม่มีรายงานการพบหมาในใน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พื้นที่ทะเลทราย หมาในมีปัจจัยที่สำคัญในการเลือกถิ่นที่อยู่ได้แก่ จำนวนเหยื่อที่มีขนาดกลางไปถึงขนาดใหญ่, แหล่งน้ำ, สัตว์ผู้ล่าชนิดอื่นในบริเวณนั้น, ระดับประชากรมนุษย์และสถานที่ที่เหมาะสมในการให้กำเนิดลูกและเลี้ยงลูก อาณาเขตของหมาในกว้าง 40-83 ตารางกิโลเมตร ทำเครื่องหมายบอกอาณาเขตโดยการปัสสาวะและถ่ายอุจจาระไว้ ในช่วงที่มีลูกอาณาเขตจะลดขนาดลง สำหรับในประเทศไทยเคยมีการติดตามหมาในเพศผู้สองตัวที่อาศัยอยู่ในพื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูเขียว จังหวัดชัยภูมิ ด้วยวิทยุติดตามพบว่าหมาในตัวแรกมีอาณาเขต 12 ตารางกิโลเมตร และตัวที่สองมีอาณาเขต 49.5 ตารางกิโลเมตร (Derbin *et al*., 2004)

หมาในอยู่รวมกันเป็นฝูง ซึ่งหนึ่งฝูงมีสมาชิกประมาณ 5-10 ตัวหรืออาจมากถึง 25 ตัว ประกอบด้วยสมาชิกในครอบครัวเดียวกัน สมาชิกในฝูงมักมีตัวผู้มากกว่าตัวเมียสองเท่าและฝูงส่วนใหญ่มักมีตัวเมียที่เป็นแม่เพียงตัวเดียว หมาในออกหากินตอนเช้ามืด กลางวันและพลบค่ำเป็นหลัก ออกหากินตอนกลางคืนบ้างแต่ไม่บ่อยนัก อาหารของหมาในได้แก่ กวางขนาดใหญ่ กวางขนาดเล็ก แกะภูเขา แกะป่า หนู กระต่าย บางครั้งกินหญ้าและพืช ในประเทศไทยมีรายงานชนิดเหยื่อของหมาในที่อาศัยอยู่ในอุทยานแห่งชาติเขาใหญ่ จากการศึกษาพบว่าเหยื่อส่วนใหญ่คือ กวางป่า คิดเป็น 63% รองลงมาคือ เก้งแดง คิดเป็น 18% นอกจากนี้ยังมีเม่น คิดเป็น 5%, แมลง คิดเป็น 3%, นก คิดเป็น 3%, สัตว์เลื้อยคลาน คิดเป็น 3% และพืช คิดเป็น 5% หมาในออกล่าเหยื่อเป็นฝูงซึ่งอาจมากถึง 30 ตัวในการล่าหนึ่งครั้ง แต่ส่วนมากในการล่าเป็นกลุ่มนั้นจะพบว่ามีสมาชิกน้อยกว่า 10 ตัวในการล่าแต่ละครั้ง โดยจำนวนสมาชิกนั้นขึ้นอยู่กับชนิดของเหยื่อที่ล่าซึ่งบางครั้งอาจล่าเพียงลำพังหรือล่าเป็นคู่ในกรณีที่เหยื่อนั้นมีขนาดเล็กเช่น ลูกกวางหรือกระต่ายป่า นอกจากการล่าเหยื่อเองแล้ว ในบางครั้งหมาในก็ขโมยเหยื่อจากสัตว์อื่นและกินซากสัตว์ด้วย หมาในเปล่งเสียงได้หลายแบบ นอกเหนือจากเสียงผิวปากที่ใช้ในการสื่อสารภายในฝูงแล้ว หมาในยังสามารถร้องเหมียวเหมือนเสียงลูกแมว ร้องเสียงแหลมสั้น เสียงคำราม เสียงคำรามเห่าและเสียงกรีดร้องในการสื่อสารเพื่อบอกว่ามีอันตราย (Derbin *et al*., 2004)

หมาในเพศเมียแสดงการเป็นสัดในช่วงเดือนกันยายนถึงกุมภาพันธ์ หมาในออกลูกปีละครั้ง ระยะเวลาในการตั้งท้องประมาณ 9 สัปดาห์ ออกลูกครั้งละ 4-6 ตัว อาจมากถึง 11 ตัว เคยมีรายงานว่ามากที่สุดถึง 12 ตัวในสาธารณรัฐอินเดีย หมาในมักออกลูกในรังของสัตว์อื่นที่ทิ้งรังไปแล้ว สมาชิกทุกตัวในฝูงจะช่วยกันดูแลและป้อนอาหารให้ลูกหมาใน ลูกหมาในจะเริ่มหย่านมเมื่ออายุ 6-7 สัปดาห์และออกจากบริเวณรังได้เมื่ออายุได้ 10 สัปดาห์ ระหว่างที่ลูกหมาในเติบโตจะมีการประลองกำลังกันเพื่อจัดลำดับชั้นในฝูง การต่อสู้เพื่อจัดอันดับจะสิ้นสุดลงเมื่อหมาในมีอายุ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ประมาณ 7 เดือนซึ่งเป็นวัยที่เริ่มออกล่าเหยื่อร่วมกับฝูง หมาในโตเต็มวัยเมื่ออายุ 12-15 เดือน ซึ่งอาจแยกตัวออกไปหรืออาจอยู่กับฝูงต่อไป ในกรงเลี้ยงหมาในเพศเมียเริ่มให้กำเนิดลูกครั้งแรกเมื่ออายุได้ 2 ปี แต่ในธรรมชาตินั้นเริ่มให้กำเนิดลูกได้เมื่ออายุ 3 ปี ทั่วไปหมาในในธรรมชาติมีอายุขัยประมาณ 10 ปีและในกรงเลี้ยงอาจมีอายุได้นานถึง 15-16 ปี (Lekagul and McNeely, 1977; Derbin *et al*., 2004)

ปัจจุบันประชากรหมาในในธรรมชาติลดจำนวนลงอย่างมากเนื่องมาจากเหยื่อลดจำนวนลง ถิ่นที่อยู่อาศัยถูกบุกรุกและทำลาย มีรายงานว่ามีหมาในตายจากการได้รับสารพิษ จากการล่าโดยมนุษย์และโรคติดต่อจากหมาบ้านเช่น โรคพิษสุนัขบ้า โรคไข้หัดสุนัข โรคลำไส้อักเสบ เป็นต้น (Durbin *et al*., 2004)

หมาในได้รับการคุ้มครองแล้วในหลายประเทศ แต่จำนวนประชากรหมาในยังคงน้อยอยู่ โดยสหภาพนานาชาติเพื่อการอนุรักษ์ธรรมชาติและทรัพยากรธรรมชาติ (International Union for the Conservation of Nature and Natural Resources [IUCN] Species Survival Commission, 2009) รายงานว่าประชากรหมาในในพื้นที่ป่าทั่วโลกมีประมาณ 2,500 ตัวเท่านั้นและในกรงเลี้ยงทั่วโลกมีประมาณ 225 ตัว ซึ่งรายงานโดยองค์การสวนสัตว์และพิพิธภัณฑ์สัตว์น้ำโลก (World Association of Zoos and Aquariums [WAZA], 2010) สหภาพนานาชาติเพื่อการอนุรักษ์ธรรมชาติและทรัพยากรธรรมชาติประเมินสถานภาพของหมาในว่าอยู่ในระดับใกล้สูญพันธุ์ (Endangered species, EN) C2a(i) (IUCN, 2009) อนุสัญญาว่าด้วยการค้าระหว่างประเทศซึ่งชนิดสัตว์ป่าและพืชป่าที่ใกล้สูญพันธุ์ (Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora [CITES], 2010) จัดหมาในอยู่ในบัญชีหมายเลข 2 (Appendix II) สำหรับประเทศไทยได้จัดหมาในให้เป็นสัตว์ป่าคุ้มครองตามพระราชบัญญัติสงวนและคุ้มครองสัตว์ป่า พุทธศักราช 2535 (จารุวรรณ, 2553)

3. พันธุศาสตร์ในการอนุรักษ์สัตว์ป่า (Wildlife Conservation Genetics)

สัตว์ป่าหลายชนิดถูกจัดอยู่ในสถานะใกล้สูญพันธุ์ เนื่องจากการถูกคุกคามของมนุษย์ที่มีแนวโน้มการเพิ่มจำนวนประชากรอย่างรวดเร็ว ส่งผลให้เกิดการล่า การบุกรุก ทำลายแหล่งอาศัยและแหล่งอาหารของสัตว์ป่าเพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้จำนวนประชากรและชนิดของสัตว์ป่าลดลงอย่างรวดเร็ว เกิดเป็นปรากฏการณ์คอขวด (bottleneck) ขึ้นมาในพื้นที่ป่าบางแห่ง ส่งผลให้ความ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

หลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) ในธรรมชาติลดลง ซึ่งถือเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลกระทบให้เกิดการสูญพันธุ์ตามมา (Zhang *et al*., 2002) เช่นเดียวกับสัตว์ป่าในกรงเลี้ยงที่มีจำนวนประชากรน้อย ทำให้มีข้อจำกัดในการเลือกคู่ผสมพันธุ์ สาเหตุดังกล่าวส่งผลให้สัตว์ป่าเผชิญกับปัญหา 1) การผสมเลือดชิด (inbreeding) ที่สูงขึ้น ซึ่งอาจส่งผลให้เกิดความผิดปกติจากการผสมเลือดชิดตามมา (inbreeding depression) ได้แก่ ความผิดปกติของระบบสืบพันธุ์ ความต้านทานโรคลดลง เป็นต้น (Amos and Balmford, 2001) 2) ความหลากหลายทางพันธุกรรมลดลง ซึ่งส่งผลให้ความสามารถในการปรับตัวต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อม การเปลี่ยนแปลงสภาพอากาศของสัตว์ป่าลดลง (Bradshaw *et al*., 2007) ส่งผลให้สัตว์ป่าหลายชนิดเสี่ยงต่อการลดจำนวนลงและตามมาด้วยการสูญพันธุ์ 3) เกิดการสะสมลักษณะการกลายพันธุ์ (mutation) ที่เลวมากขึ้นผ่านทางการเปลี่ยนแปลงความถี่ของยีนแบบไร้ทิศทาง (genetic drift) และ 4) สำหรับสัตว์ในกรงเลี้ยงเกิดการปรับเปลี่ยนลักษณะทางพันธุกรรม (genetic adaptation) ที่ต่างไปจากบรรพบุรุษเพื่อให้สามารถปรับตัวให้สอดคล้องกับสภาพกรงเลี้ยงได้ (Frankham, 2007; Robert, 2009) ซึ่งส่งผลกระทบต่อการปล่อยสัตว์ที่เพาะขยายพันธุ์ในกรงเลี้ยงคืนสู่ธรรมชาติ (reintroduction)

ในปัจจุบันความรู้ทางด้านพันธุศาสตร์กำลังมีบทบาทมากในการเป็นปัจจัยสำคัญปัจจัยหนึ่งในการอนุรักษ์ทางชีวภาพ (O'Brien, 1994; Frankham, 2005) พันธุศาสตร์ในการอนุรักษ์เป็นการประยุกต์ใช้ข้อมูลทางพันธุกรรมในการจัดการเพื่อการดำรงอยู่ของสิ่งมีชีวิตชนิดใดชนิดหนึ่ง ซึ่งข้อมูลทางพันธุกรรมเป็นข้อมูลที่สำคัญและใช้เป็นข้อมูลประกอบในการศึกษาในหลาย ๆ ด้านของประชากรสัตว์ป่า ทั้งในด้านนิเวศวิทยา พฤติกรรม ความสัมพันธ์ทางเครือญาติและความสัมพันธ์ด้านภูมิประเทศ ซึ่งข้อมูลทางด้านพันธุกรรมเหล่านี้มีการนำไปใช้ในหลาย ๆ ด้าน เช่น เพื่อคัดเลือกสัตว์สำหรับนำไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ การผสมข้ามสายพันธุ์สัตว์ รวมไปถึงการถ่ายทอดยีน ชนิดนั้น ๆ จากรุ่นหนึ่งไปยังอีกรุ่นหนึ่งและในการอนุรักษ์สัตว์ป่านั้นข้อมูลเกี่ยวกับความหลากหลายทางพันธุกรรมสามารถนำมาใช้ในการจำแนกลักษณะทางพันธุกรรมระดับประชากร ใช้ประเมินในการวางแผนจัดการเพื่อการอนุรักษ์ เพิ่มจำนวนประชากรสัตว์ป่า รวมทั้งเพิ่มความหลากหลายทางพันธุกรรมและลดการเกิดภาวะเลือดชิด (Inbreeding) ในประชากรสัตว์ป่าที่ใกล้สูญพันธุ์ ซึ่งข้อมูลที่ถูกต้องและแม่นยำจะนำไปสู่การจัดการผสมพันธุ์และการอนุรักษ์ที่มีประสิทธิภาพและยั่งยืน (Khan *et al*., 2008)

ความรู้ทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพระดับโมเลกุลก้าวหน้าอย่างรวดเร็ว ในหลายประเทศได้นำความรู้ดังกล่าวมาประยุกต์ใช้ในการสำรวจประชากรและความหลากหลายทางพันธุกรรมใน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สัตว์ป่าเพื่อใช้เป็นข้อมูลในการอนุรักษ์ ซึ่งข้อมูลต่าง ๆ ที่นำมาใช้ เพื่อการอนุรักษ์ ได้แก่ การบอกลักษณะของ heterozygosities, ระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance), การจำแนกเพศ (sex identification) เพื่อประเมินหาอัตราส่วนทางเพศประชากร, การจัดอนุกรมวิธาน (systematic) และประโยชน์ในการศึกษาเชิงวิวัฒนาการ (evolutionary) (มานะกร, 2553)

ในการศึกษาข้อมูลทางพันธุกรรมเพื่อประโยชน์ในการอนุรักษ์นั้น หลักฐานที่ใช้ในการศึกษาคือ หลักฐานทางโมเลกุลจากสิ่งมีชีวิตที่มีอยู่ในปัจจุบัน ซึ่งได้รับการถ่ายทอดมาตามสายวิวัฒนาการและอาจทิ้งร่องรอยของบรรพบุรุษร่วมให้ตรวจพบได้ ซึ่งข้อมูลที่ได้ไม่มีการลำเอียงและมีความแม่นยำ ซึ่งใช้ได้ทั้งข้อมูลของโปรตีนและดีเอ็นเอเช่น ข้อมูลของดีเอ็นเอในไมโตคอนเดรีย (mitochondrial DNA) เพื่อใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (evolutionary relationship) ในสายแม่ (maternal lineage) เป็นต้น ซึ่งในส่วนของดีเอ็นเอนั้นสามารถใช้ได้ทั้งข้อมูลลำดับเบสและลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ตรวจสอบโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบต่าง ๆ (สุรินทร์, 2552)

4. ไมโตคอนเดรีย และไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ (Mitochondria and Mitochondrial DNA)

ไมโตคอนเดรียเป็นออร์กาเนลล์ (organelle) ที่สำคัญที่สุดอย่างหนึ่งของเซลล์ เชื่อว่าไมโตคอนเดรียเกิดจากการ endosymbiosis ของโปรคาริโอต (prokaryote) เข้าไปอยู่ในยูคาริโอต (eukaryote) เหมือนกับคลอโรพลาสต์ ซึ่งไมโตคอนเดรียนี้มีการเจริญเติบโตเปลี่ยนรูปทรงจากเส้นใย (filament) จนกลายเป็นแท่ง (rod) หรือทรงกลม (sphere)

ไมโตคอนเดรียมีลักษณะเป็นรูปไข่ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.2 – 0.8 ไมโครเมตร ประกอบด้วยผนัง 2 ชั้น ผนังชั้นนอก (outer membrane) และผนังชั้นใน (inner membrane) ผนังชั้นในของไมโตคอนเดรียมีลักษณะพับทบไปมาเรียกว่า cristae ทำให้มีพื้นที่ขนาดใหญ่มาก ผนังทั้งสองของไมโตคอนเดรียนี้ทำให้เกิดช่องว่างขึ้นภายในไมโตคอนเดรียคือ ช่องว่างระหว่างผนังชั้นนอกและชั้นในที่เรียกว่า intermembranous space และช่องว่างที่ล้อมรอบโดยผนังชั้นในที่เรียกว่า เมทริกซ์ (matrix) ทำให้โครงสร้างของไมโตคอนเดรียแบ่งเป็น 4 ส่วนคือ 1) ส่วนในที่สุดคือ matrix ที่ซึ่งมีปฏิกิริยาสำคัญหลายปฏิกิริยาเช่น วัฏจักรเครบส์ (Kreb's cycle) และขบวนการ β-oxidation เกิดขึ้น 2) ส่วนผนังชั้นในของไมโตคอนเดรียซึ่งมีเอนไซม์เชิงซ้อนของขบวนการ oxidative phosphorylation (OXPHOS) อยู่ 3) ส่วน intermembranous space นั้นมี

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

โปรตีนหลายตัวและ 4) ส่วนผนังชั้นนอกที่คั่นกลางระหว่างไมโตคอนเดรียและไซโทซอล สำหรับส่วนประกอบใน intermembranous space และใน matrix นั้น จะแตกต่างกันโดยสิ้นเชิง เนื่องจากว่าผนังชั้นนอกของไมโตคอนเดรียจะยอมให้สารที่มีขนาดใหญ่เข้าออกได้ง่าย ทำให้ส่วนประกอบของสารใน intermembranous space คล้ายคลึงกับในไซโทพลาสซึมของเซลล์ ในขณะที่ผนังชั้นในนั้นค่อนข้างจะไม่ยอมให้สารต่าง ๆ ผ่านเข้าออกโดยง่าย (impermeable) จำเป็นต้องมีช่องทางพิเศษหรือขบวนการโดยเฉพาะเพื่อให้สารนั้น ๆ เข้าไปภายใน matrix ของไมโตคอนเดรียได้ นอกจากนี้ภายใน matrix ของไมโตคอนเดรียยังมีสารพันธุกรรม (DNA) ที่เรียกว่า จีโนมไมโตคอนเดรียหรือไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ (mitochondrial genome, mitochondrial DNA; mtDNA) อยู่ด้วย

จำนวนไมโตคอนเดรียในแต่ละเซลล์นั้นแตกต่างกันได้ตั้งแต่ 1-1000 ไมโตคอนเดรียต่อเซลล์ ซึ่งขึ้นอยู่กับความต้องการพลังงานของเซลล์นั้น ๆ เซลล์ที่ต้องใช้พลังงานมากเช่น เซลล์ตับ ก็จะมีจำนวนไมโตคอนเดรียในแต่ละเซลล์มาก เป็นต้น สำหรับตำแหน่งของไมโตคอนเดรียในเซลล์นั้น พบว่าไมโตคอนเดรียจะอยู่ในตำแหน่งที่มีการใช้พลังงานมากเช่น ในเซลล์เยื่อบุลำไส้ที่ต้องใช้พลังงานในการดูดซึมสารอาหารที่ส่วน apical ของเซลล์ ซึ่งเป็นส่วนที่จะพบไมโตคอนเดรียอยู่หนาแน่นมาก

ไมโตคอนเดรียสามารถแบ่งตัวของมันเองได้ภายในเซลล์ โดยไม่ขึ้นกับการแบ่งตัวของเซลล์หรือ cell cycle ลักษณะการแบ่งตัวของไมโตคอนเดรียนั้นคล้ายคลึงกับการแบ่งตัวของแบคทีเรียมาก ก่อนที่ไมโตคอนเดรียจะมีการแบ่งตัว จะเกิดมีขบวนการถ่ายแบบสารพันธุกรรม (mitochondrial DNA replication) ของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอเกิดขึ้นก่อน จากนั้นไมโตคอนเดรียจะมีขนาดใหญ่ขึ้นและจะมีการแบ่งตัวโดยเริ่มจากการมีรอยและมีร่องเกิดขึ้น ร่องดังกล่าวเกิดจากการหยักลึกลงไปของผนังชั้นนอกและผนังชั้นในของไมโตคอนเดรียซึ่งจะหยักลึกลงไปจนกระทั่งไมโตคอนเดรียขาดออกจากกันเกิดเป็นไมโตคอนเดรียใหม่ขึ้น ไมโตคอนเดรียมีสารพันธุกรรมและมีไรโบโซมของมันเอง ซึ่งมันจะแบ่งตัวเมื่อมันต้องการหรืออาจจะไม่มีการแบ่งตัวเลยในขณะที่เซลล์กำลังแบ่งตัว บ่งบอกว่าไมโตคอนเดรียมีความเป็นเอกเทศของมันเอง ไม่ขึ้นกับเซลล์ เพียงแต่มีสัมพันธภาพที่ดีโดยแลกกับการผลิตพลังงานให้เซลล์นั้น

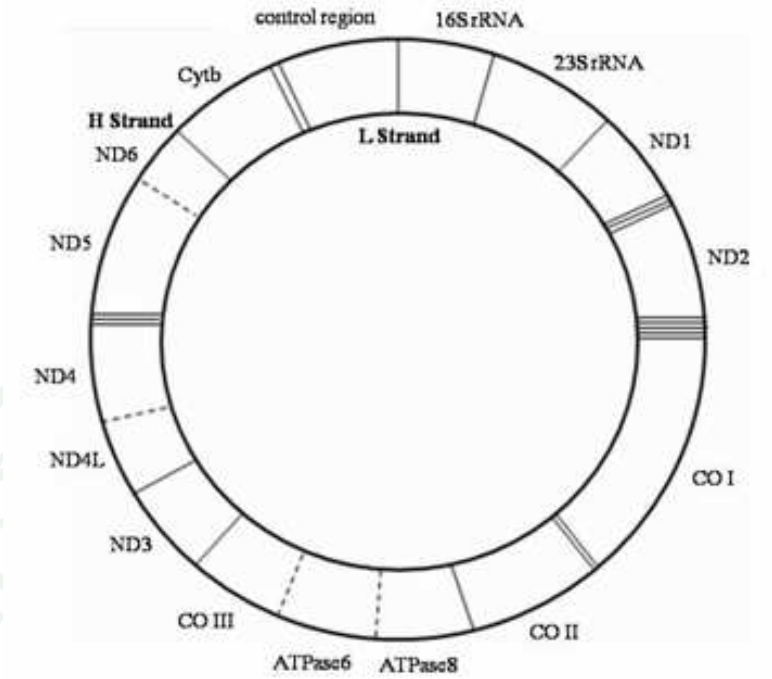
ไมโตคอนเดรียมีหน้าที่สำคัญหลายประการ แต่หน้าที่ที่สำคัญที่สุดคือ การสร้างพลังงานในรูปของ Adenosine triphosphate หรือ ATP ซึ่งต้องอาศัยขบวนการ oxidative phosphorylation นอกจากนั้นเอนไซม์ในขบวนการนี้ยังมีความเกี่ยวข้องกับการเกิดอนุมูลอิสระ (reactive oxygen

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

species)และการควบคุมขบวนการ apoptosis อีกด้วย (พัชรีย์, 2549)

ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมโดยทั่วไปมีขนาดประมาณ 16,000 – 17,500 bp และอยู่ในส่วนของ matrix ของไมโตคอนเดรีย ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของคนมีขนาด 16,569 bp, สุนัข (*Canis familiaris*) มีขนาด 16,728 bp (Kim *et al*., 1998) และหมาใน (*Cuon alpinus*) มีขนาด 16,672 bp ซึ่งได้มีรายงานไว้ใน GenBank โดยมี accession number NC013445 (Zhang and Chen, 2010) ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมมีลักษณะเป็น double stranded เรียงต่อกันเป็นรูปวงแหวน 2 วง ไม่เกาะติดกับโปรตีนชนิดใด อยู่ในสภาพวงกลมปลายปิด (closed circular DNA) ลอยอยู่ในส่วน matrix ของไมโตคอนเดรีย ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอมีลักษณะสายคู่ที่เป็น double stranded นั้น สายหนึ่งเรียกว่า heavy strand (H strand) เพราะเหตุว่ามีเบส G และ T มากกว่าอีกสายหนึ่งซึ่งเรียกว่า light strand (L strand) ทำให้ heavy strand หนักกว่า light strand เมื่อแยกออกจากกัน (พัชรีย์, 2549)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 3 แสดงโครงสร้างจีโนมไมโตคอนเดรีย เส้นทึบตามขวางของวงกลม แสดงตำแหน่งของยีน tRNA ส่วนเส้นประแสดงขอบเขตของจีนในตำแหน่งนั้น ๆ

ที่มา: สุรินทร์ (2552)

ยีนไมโตคอนเดรียสามารถถอดรหัสให้ยีนทั้งหมด 37 ยีน ประกอบด้วยยีนที่ถอดรหัสให้ mitochondrial ribosomal RNA (mt rRNA) จำนวน 2 ยีน คือ large และ small subunit อย่างละ 1 ยีน และยีนที่ถอดรหัสให้ mitochondrial transfer RNA (mt tRNA) อีกจำนวน 22 ยีน ซึ่งทั้ง mt rRNA และ mt tRNA เหล่านี้มีความสำคัญในขบวนการสังเคราะห์โปรตีนจากยีนไมโตคอนเดรียที่มีการสังเคราะห์ภายใน matrix ของไมโตคอนเดรียเอง และอีก 13 ยีนไมโตคอนเดรียนั้นถอดรหัสให้โปรตีนที่ใช้ในขบวนการ oxidative phosphorylation คือ ถอดรหัสให้โปรตีนที่เป็นโปรตีนหน่วยย่อยของเอนไซม์เชิงซ้อนที่ใช้ในขบวนการ oxidative phosphorylation ตัวที่ 1 (NADH-ubiquinone reductase) จำนวน 7 ยีนคือ ยีน ND1, ND2, ND3, ND4, NDL4, ND5 และ ND6 เป็นโปรตีนหน่วยย่อยของเอนไซม์เชิงซ้อนตัวที่ 3 (ubiquinone cytochrome *c* reductase) จำนวน 1 ยีนคือ cytb ซึ่งยีน cytochrome b ของหมาใน (*Cuon alpinus*) มีความยาว 1,140 bp (GenBank accession number NC013445) ซึ่งมีความยาวเท่ากับสุนัขบ้าน (*Canis lupus familiaris*) (GenBank accession number NC002008) และสุนัขจิ้งจอก (*Canis aureus*) (GenBank accession number AY291433) (ภาพผนวก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ที่ จ1) โปรตีนหน่วยย่อยของเอนไซม์เชิงซ้อนตัวที่ 4 (cytochrome oxidase) จำนวน 3 ยีนคือ COI, COII และ COIII และเป็นโปรตีนหน่วยย่อยของเอนไซม์เชิงซ้อนตัวที่ 5 (ATP synthase) จำนวน 2 ยีนคือ ATPase6 และ ATPase8 (พัชรีย์, 2549)

ตารางที่ 1 แสดงยีนและโปรตีนทั้ง 13 ชนิดที่ถอดรหัสจากยีนไมโตคอนเดรีย

Gene	Product
ND1	NADH dehydrogenase subunit 1
ND2	NADH dehydrogenase subunit 2
CO I	Cytochrome *c* oxidase subunit I
CO II	Cytochrome *c* oxidase subunit II
ATPase8	ATP synthase F0 subunit 8
ATPase6	ATP synthase F0 subunit 6
CO III	Cytochrome *c* oxidase subunit III
ND3	NADH dehydrogenase subunit 3
ND4L	NADH dehydrogenase subunit 4L
ND4	NADH dehydrogenase subunit 4
ND5	NADH dehydrogenase subunit 5
ND6	NADH dehydrogenase subunit 6
Cytb	Cytochrome b

ที่มา: GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov)

นอกจากนั้นแล้วไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอยังมีส่วนที่ไม่ถอดรหัสใด ๆ เลยแต่เป็นส่วนที่มีความสำคัญอย่างมากคือ ส่วนที่เรียกว่า control region หรือ displacement loop (D-loop) ซึ่งเป็นส่วนที่มีขนาด 1,200 bp ในคน, 1,270 bp ในสุนัข (*Canis familiaris*) (Kim *et al*., 1998) และขนาด 1,206 bp ในหมาใน (*Cuon alpinus*) ซึ่งได้มีรายงานไว้ใน GenBank โดยมี accession number NC013445 (Zhang and Chen, 2010) แม้ส่วน control region ของยีนไมโตคอนเดรียจะไม่มีการถอดรหัส แต่ก็มีหน้าที่ที่สำคัญมาก กล่าวคือเป็นส่วนที่เป็นจุดเริ่มต้นของขบวนการถ่ายแบบ DNA (DNA replication) ของสายที่เรียกว่า heavy strand และเป็นส่วนที่เป็นจุดเริ่มต้นของขบวนการสร้าง RNA จากแม่พิมพ์ DNA (transcription) อีกด้วย จากการศึกษาพบว่าในส่วน control region นี้จะมี

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ความหลากหลาย (polymorphism) ของการเรียงลำดับเบสมากกว่าในส่วนอื่นของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอและในส่วนของ control region เอง ก็มีความหลากหลายไม่เท่ากัน ส่วนของ control region ที่พบความหลากหลายมากที่สุดอยู่ที่บริเวณที่เรียกว่า hypervariable region 1 (HVS-1) และ hypervariable region 2 (HVS-2) (วรวีร์, 2549) โดยที่การมีเบสแตกต่างกันนี้จะไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงใดที่ผิดปกติเกิดขึ้น เนื่องจากบริเวณนี้เป็นส่วนที่ไม่ได้ทำหน้าที่ถอดรหัส ในส่วน hypervariable region เป็นส่วนที่พบว่ามีความแตกต่างของลำดับเบสในคนปกติแต่ละคน ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมปกติแต่ละตัว แต่จะเหมือนกันทุกอย่างในคนหรือสัตว์ที่มาจากทางสายแม่เดียวกัน เพราะไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอมีการถ่ายทอดผ่านทางแม่เท่านั้น ด้วยเหตุที่ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเออยู่ในไมโตคอนเดรียซึ่งเป็นส่วนที่อยู่ในไซโตพลาสซึมเท่านั้น ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอส่วนนี้จึงสามารถนำมาใช้เป็น marker ในแต่ละ family tree ได้และเมื่อทำการศึกษาดู mitochondrial DNA haplogroup ซึ่งพิจารณาจากความหลากหลายของลำดับเบสหรือพอลิมอร์ฟิซึม (polymorphism) ที่เกิดขึ้นในไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ ในประชากรภูมิภาคต่างๆของโลก พบว่ามี mitochondrial DNA haplogroup ที่มีความแตกต่างกันในแต่ละภูมิภาค (Brown, 1980)

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในสัตว์ป่าหลายชนิดโดยใช้ลำดับเบสบนไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอเช่น การศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการระหว่างออริกซ์ (oryx species) 3 ชนิด โดยใช้ลำดับเบสในตำแหน่ง cytochrome b บนไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ (Khan *et al*., 2008) การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของหมีขอ (binturong) ในกรงเลี้ยงโดยศึกษาในส่วน hypervariable region 1 ของ control region บนไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ (Cosson *et al*., 2007) และมีการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในส่วนของ cytochrome b และ control region บนไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของหมาใน (Iyengar *et al*., 2005)

จีโนมไมโตคอนเดรียมีลักษณะที่แตกต่างจากจีโนมนิวเคลียสหลายประการคือ 1) ตำแหน่งของของจีโนม โดยที่จีโนมนิวเคลียสจะอยู่ภายในนิวเคลียสของเซลล์ ส่วนจีโนมไมโตคอนเดรียจะอยู่ในส่วนไซโตพลาสซึมของเซลล์ 2) การถ่ายทอดสู่รุ่นลูกหลานของจีโนมนิวเคลียสจะเป็นไปตามทฤษฎีหรือตามกฎของเมนเดล ในขณะที่การถ่ายทอดของจีโนมไมโตคอนเดรียสู่รุ่นลูกหลานจะเป็นการถ่ายทอดทางสายแม่เท่านั้น 3) ลักษณะการจัดรวมตัวกันของสารพันธุกรรมของจีโนมนิวเคลียสจะมีการรวมตัวกันขดแน่นและเกาะติดอยู่กับโปรตีนที่สำคัญคือ โปรตีนฮีสโตน (histone) แต่จีโนมไมโตคอนเดรียจะไม่มีการรวมหรือเกาะติดกับโปรตีนใด ๆ จีโนมไมโตคอนเดรียจะลอยอยู่ใน matrix ของไมโตคอนเดรีย 4) ขบวนการถ่ายแบบจีโนมไมโตคอนเดรียที่เกิดขึ้นใน matrix

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

นั้นไม่มี repairing system ที่ดี ทำให้เกิดความผิดพลาดในการถ่ายแบบสารพันธุกรรมของยีนไมโตคอนเดรียในอัตราที่สูงกว่าในยีนนิวเคลียสซึ่งมี repairing system ที่ดีมาก พบว่าอัตราการกลายพันธุ์ของจีโนมไมโตคอนเดรียของมนุษย์สูงกว่ายีนนิวเคลียส 10-20 เท่า การที่จีโนมไมโตคอนเดรียมีอัตราการกลายพันธุ์สูงกว่าจีโนมนิวเคลียสนั้น เนื่องจากลักษณะและสิ่งแวดล้อมรอบ ๆ จีโนมไมโตคอนเดรีย นั่นคือ การที่จีโนมไมโตคอนเดรียอยู่ในส่วน matrix ของไมโตคอนเดรียทำให้มีโอกาสสัมผัสกับอนุมูลอิสระที่เกิดจากขบวนการ oxidative phosphorylation สูงมากและตลอดเวลา รวมทั้งการที่จีโนมไมโตคอนเดรียไม่มี repairing system ที่ดี ไม่มีโปรตีนฮีสโตน (histone) ช่วยปกป้องล้อมรอบ เป็นต้น สิ่งเหล่านี้ล้วนเป็นสิ่งที่ส่งเสริมให้จีโนมไมโตคอนเดรียมีอัตราการกลายพันธุ์ที่สูง อัตราการกลายพันธุ์ของจีโนมไมโตคอนเดรียในส่วน control region หรือ D-loop ของมนุษย์ประมาณไว้ 0.32 ต่อหนึ่งคู่เบสต่อ หนึ่งล้านปี ส่วนอื่นของจีโนมไมโตคอนเดรียประมาณ 0.02 ต่อหนึ่งคู่เบสต่อ หนึ่งล้านปี (Brown *et al*., 1979)

นอกจากนี้การถอดรหัสของลำดับเบสเป็นกรดอะมิโนของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอบางตัวแตกต่างจากนิวเคลียสดีเอ็นเอดังแสดงไว้ในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงความแตกต่างระหว่าง Nuclear genetic code กับ Mitochondrial genetic code

Codon	Mammalian Mitochondrial Code	Yeast Mitochondrial Code	Nuclear Code
UGA	Trp	Trp	STOP
AUA	Met	Met	Ile
CUA	Leu	Thr	Leu
AGA	STOP	Arg	Arg
AGG	STOP	Arg	Arg

ที่มา: Albert *et al*. (1983)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

คุณสมบัติของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอในการศึกษาวิวัฒนาการ ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอเป็นเครื่องมือที่มีศักยภาพอย่างหนึ่งสำหรับนำมาใช้ศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการทั้งภายในและระหว่างชนิด (specie) ของสิ่งมีชีวิตและนอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติเฉพาะตัวบางประการที่ทำให้มันเป็นเครื่องมือศึกษาวิวัฒนาการที่น่าจะมีประสิทธิภาพเหนือกว่าดีเอ็นเอในนิวเคลียส (เสมอชัย และ พัชรีย์, 2549) ดังนี้

1. ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของมนุษย์และสัตว์ทั่วไปมีการถ่ายทอดพันธุกรรมแบบจากแม่สู่ลูกเท่านั้น (maternal inheritance) เนื่องจากตามปกติไมโตคอนเดรียในเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้จะไม่ถ่ายทอดให้กับเซลล์ไข่ที่ตัวมันเข้าไปปฏิสนธิด้วย ลูกจึงควรมีลำดับของเบสในไมโตคอนเดรียเหมือนกับของแม่ทุกประการ ยกเว้นว่าจะมีการกลายพันธุ์เกิดขึ้นในต้นกำเนิดเซลล์สืบพันธุ์ของแม่

การที่ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอถ่ายทอดผ่านเฉพาะทางบรรพบุรุษสายแม่โดยไม่การรวมตัวหรือแลกเปลี่ยนพันธุกรรมกับดีเอ็นเอจากบรรพบุรุษสายพ่อ ทำให้ความแตกต่างของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอในบรรดาลูกหลานรุ่นปัจจุบันที่สืบสายมาจากบรรพบุรุษสายแม่เดียวกันในอดีตเกิดขึ้นได้โดยเป็นผลสั่งสมมาจากการกลายพันธุ์ที่เกิดใหม่ทั้งสิ้นและถ้าหากไม่มีอิทธิพลจากการคัดเลือกโดยธรรมชาติ (natural selection) เข้ามาเกี่ยวข้องกับการกลายพันธุ์ใหม่ ๆ เหล่านี้ โดยที่การกลายพันธุ์ใหม่เกิดขึ้นในอัตราที่คงที่แล้ว ความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ตรวจพบในบรรดาลูกหลานรุ่นปัจจุบันย่อมเป็นสัดส่วนโดยตรงกับจำนวนชั่วอายุ (generations) ที่ห่างกันนับจากบรรพบุรุษสายแม่ดังกล่าวลงมาจนถึงลูกหลานปัจจุบัน ทำให้สามารถโยงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระหว่างรูปแบบที่แตกต่างกันของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอเป็นโครงสร้างต้นไม้วิวัฒนาการ (phylogenetic tree) สืบย้อนกลับขึ้นไปถึงบรรพบุรุษสายแม่เดียวกันได้เสมอ โดยที่ไม่ว่าประชากรอ้างอิงจะเป็นกลุ่มใดก็ตาม สมาชิกของประชากรนั้นย่อมสืบไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอมาจากบรรพบุรุษสายแม่เดียวกัน

2. ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอมีอัตราการกลายพันธุ์สูงมากกว่าอัตราการกลายพันธุ์ของดีเอ็นเอในนิวเคลียส โดยภาพรวมประมาณ 5-10 เท่า ทำให้เมื่อเวลาผ่านไปเท่า ๆ กัน จีโนมไมโตคอนเดรียลจะสามารถสะสมการกลายพันธุ์ใหม่ ๆ ได้มากกว่าในจีโนมนิวเคลียสประมาณ 5-10 เท่าตัวตามไปด้วย ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอจึงสะสมการกลายพันธุ์ได้มากกว่าในระยะเวลาเท่า ๆ กันมันจึงเป็นเครื่องมือวัดการเปลี่ยนแปลงทางวิวัฒนาการที่มีทั้งความไว และความละเอียดสูงกว่าดีเอ็นเอในนิวเคลียสด้วย control region บนไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอเป็นส่วนที่มีความผันแปรมากที่สุด

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เนื่องจากมีอัตราการกลายพันธุ์สูงกว่าในบริเวณอื่น ๆ ของจีโนม จึงนิยมนำมาศึกษาลำดับเบสเพื่อตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของจีโนมในการศึกษาวิวัฒนาการและอัตราการกลายพันธุ์ที่วัดได้จากโอกาสที่เบส ณ ตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่งจะถูกแทนที่ด้วยเบสที่ต่างไปจากตำแหน่งเดิมต่อช่วงเวลาหนึ่งล้านปี หรือบางครั้งก็ใช้ต่อช่วงเวลาหนึ่งรุ่นอายุ (เท่ากับ 20 ปี โดยประมาณในมนุษย์) จากการประมาณพบว่าอัตราการกลายพันธุ์ของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอในส่วน control region จะอยู่ที่ 0.025-0.26 ต่อตำแหน่งเบสต่อล้านปี ซึ่งเท่ากับ 5×10^{-7} ถึง 5×10^{-6} ต่อตำแหน่งเบสต่อรุ่นอายุ สำหรับส่วนของดีเอ็นเอใน hypervariable region 1 (HVS-1) ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของ control region ประมาณไว้ที่ 3.6×10^{-6} ต่อตำแหน่งเบสต่อรุ่นและสำหรับไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอส่วนอื่น ๆ ที่มิได้อยู่ใน control region ประมาณอัตราการกลายพันธุ์อยู่ที่ 3.4×10^{-7} ต่อตำแหน่งเบสต่อรุ่นอายุ

3. ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอพบได้ในเซลล์ที่มีชีวิตทุกเซลล์ของร่างกายโดยมีจำนวนชุด (copy) ต่อเซลล์อยู่ในหลักพัน ส่วนดีเอ็นเอในนิวเคลียสมีเพียง 2 ชุดต่อหนึ่ง somatic cell ทำให้เราสามารถตรวจพบและสกัดดีเอ็นเอจากจีโนมไมโตคอนเดรียได้ง่ายกว่าจากจีโนมนิวเคลียสและการที่ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอมีจำนวนชุดมาก อีกทั้งค่อนข้างทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่เป็นกรดยังทำให้มีความเป็นไปได้มากที่ดีเอ็นเอซึ่งยังคงมีสภาพดีอยู่จะยังคงหลงเหลืออยู่ในตัวอย่างที่ตายมานานแล้วเช่น โครงกระดูกโบราณทำให้พอจะสกัดมาศึกษาได้

ข้อจำกัดของการใช้ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอในการศึกษาวิวัฒนาการนั้น ประการแรกคือการวิเคราะห์ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอให้ประวัติวิวัฒนาการเฉพาะในสายบรรพบุรุษสายแม่เท่านั้น ในขณะที่ประชากรประกอบด้วยสองเพศทั้งสายแม่และพ่อ ถ้าหากรูปแบบการอพยพเคลื่อนย้ายของประชากรในอดีตมีความแตกต่างกันระหว่างเพศ ประวัติวิวัฒนาการที่ได้จากการศึกษาไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอย่อมไม่ใช่ประวัติวิวัฒนาการโดยภาพรวม ประการที่สอง จีโนมไมโตคอนเดรียมีขนาดเล็กคิดเป็นเพียงร้อยละ 0.00006 ของจีโนมในนิวเคลียส ทำให้เกิดคำถามว่ามันจะเป็นตัวแทนได้ดีเพียงใดสำหรับวิวัฒนาการของจีโนมโดยภาพรวม ดังนั้นเราควรต้องใช้การศึกษาวิวัฒนาการของจีโนมในนิวเคลียสมาช่วยตรวจสอบเทียบเคียงด้วย ประการสุดท้าย จีโนมไมโตคอนเดรียประกอบด้วยยีนหลายตำแหน่ง (ควบคุมการสร้างโปรตีน 13 ชนิด ribosomal RNAs 2 ชนิดและ transfer RNAs 22 ชนิด) ซึ่งผูกติดกันอย่างสมบูรณ์ (complete linkage) ถ้าหากมีการคัดเลือกโดยธรรมชาติ (natural selection) เข้ามาเกี่ยวข้องจะส่งผลต่อการดัดแปลงความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากรของทั้งจีโนมด้วย (เสมอชัย และ พัชรีย์, 2549)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

5. ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (Polymerase Chain Reaction: PCR)

PCR หรือ *in vitro* enzymatic gene amplification เป็นเทคนิคการเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอในหลอดทดลอง ซึ่งเป็นการเลียนแบบกระบวนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในธรรมชาติ โดยสามารถเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอเฉพาะบริเวณที่ต้องการศึกษาให้มีปริมาณสูงกว่าเดิมหลายล้านเท่า เทคนิคนี้ถูกค้นพบโดย Kary Mullis ในปี ค.ศ. 1983 หลักการคือ นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) ปัจจัยสำคัญของการทำ PCR คือต้องอาศัยดีเอ็นเอสายสั้น ๆ ขนาดประมาณ 20-30 นิวคลีโอไทด์ที่เรียกว่าไพรเมอร์ (primer) ซึ่งเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวซึ่งสามารถจับคู่กับดีเอ็นเอต้นแบบแต่ละเส้นในบริเวณเป้าหมายที่ต้องการเพิ่มจำนวน เทคนิคนี้ยังต้องมีเอนไซม์ DNA polymerase ช่วยในการสร้างสายดีเอ็นเอโดยเอนไซม์ที่นิยมใช้สกัดได้จากแบคทีเรีย *Thermus aquaticus* ที่สามารถทนต่อความร้อนได้ (thermostable) เรียกเอนไซม์นี้ว่า *Taq* polymerase ซึ่งต้องการใช้แมกนีเซียมไอออน (Mg^{2+}) เป็นโคแฟกเตอร์ (cofactor) ต้องมีนิวคลีโอไทด์ทั้ง 4 ชนิด (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) เป็นสารตั้งต้น และมีบัฟเฟอร์เป็นตัวควบคุมให้ระบบอยู่ในภาวะที่เหมาะสม (กัลยาณี, 2551) โดยใส่ในเครื่อง Thermal Cycle ซึ่งการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจะทำเป็นรอบ ๆ โดยแต่ละรอบจะมี 3 ขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. Denaturation เป็นการแยกดีเอ็นเอแม่พิมพ์ที่เป็นเกลียวคู่ (double strand DNA) แยกออกจากกันกลายเป็นสายเดี่ยวอยู่เป็นอิสระ ทำหน้าที่เป็นแม่พิมพ์ในการเกิด DNA replication ซึ่งขั้นตอนนี้เกิดขึ้นที่อุณหภูมิสูงประมาณ 90-95 องศาเซลเซียส

2. Annealing เป็นขั้นตอนที่ไพรเมอร์จะเข้าไปจับกับเบสที่เป็นคู่สมของเบสแต่ละตัวบนดีเอ็นเอแม่พิมพ์ที่เป็นสายเดี่ยว เกิดขึ้นที่อุณหภูมิเหมาะสมในช่วง 40-60 องศาเซลเซียส ซึ่งขึ้นอยู่กับความยาวและจำนวนเบส C และ G (GC-content) ของไพรเมอร์

3. Extension เป็นขั้นตอนการเติมนิวคลีโอไทด์ที่เข้าคู่กันกับสายดีเอ็นเอต้นแบบเพื่อสังเคราะห์ดีเอ็นเอให้สมบูรณ์ต่อเนื่องจากจุดที่ไพรเมอร์เข้าไปจับกับดีเอ็นเอต้นแบบ โดยเริ่มจากปลาย 3’ ของไพรเมอร์ทั้งสอง โดยมีเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase เชื่อมไพรเมอร์ด้วย dNTPs ทำให้ดีเอ็นเอสายใหม่สร้างจากทิศทาง 5’⟶3’ โดยเกิดที่อุณหภูมิเหมาะสมที่ 72 องศาเซลเซียส

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

หลังจากเสร็จขั้นตอน extension ปฏิกิริยา PCR จะวนกลับไปเริ่มต้นที่ขั้นตอนแรกใหม่และทำซ้ำกันอย่างนี้ประมาณ 30-40 รอบ ก็จะได้ชิ้นดีเอ็นเอที่จำเพาะหลายล้านชิ้น ปฏิกิริยา PCR สามารถเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอจำเพาะได้เร็วเนื่องจากผลิตผล (PCR product หรือ amplicon) ที่ได้จากแต่ละรอบจะถูกใช้เป็นต้นแบบในกระบวนการถ่ายแบบในรอบต่อ ๆ ไปทุกครั้ง จำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ในแต่ละรอบจะเท่ากับ 2^n เมื่อ n คือ จำนวนรอบของปฏิกิริยา PCR (กัลยาณี, 2551)

เนื่องจากการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเป้าหมายเป็นการช่วยเพิ่มความไวให้กับการตรวจวัดและวิเคราะห์ดีเอ็นเอและทำได้อย่างรวดเร็ว จึงมีการนำมาใช้ในการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ การตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรม นำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจวินิจฉัยอย่างแพร่หลาย

6. การแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (Electrophoresis)

สารพอลิเมอร์ชีวภาพ (biological polymer) ส่วนใหญ่มีประจุไฟฟ้าเช่น กรดอะมิโน, ดีเอ็นเอ, อาร์เอ็นเอหรือโปรตีนในตัวค้ำจุน ซึ่งสามารถเคลื่อนที่ภายใต้สนามไฟฟ้า (electric field) ในสารละลายตัวกลางที่เหมาะสมได้ การขนส่งอนุภาคที่มีประจุไฟฟ้าผ่านตัวทำละลายโดยสนามไฟฟ้า เรียกว่า อิเล็กโทรโฟรีซิส อนุภาคที่มีประจุบวกจะเคลื่อนที่เข้าหาขั้วลบ ในขณะที่อนุภาคที่มีประจุลบจะเคลื่อนที่เข้าหาขั้วบวก ซึ่งโมเลกุลแต่ละชนิดมีอัตราเร็วในการเคลื่อนที่ภายใต้สนามไฟฟ้าได้ไม่เท่ากัน ขึ้นกับปริมาณประจุสุทธิบนโมเลกุลของสาร ขนาดและรูปร่างของโมเลกุลของสารนั้นและกระแสไฟฟ้า

อิเล็กโทรโฟรีซิส เป็นเทคนิคที่ใช้แยกโมเลกุลของสารที่มีประจุออกจากกันโดยใช้กระแสไฟฟ้าในการแยก โดยให้สารที่มีประจุนั้นเคลื่อนที่ผ่านตัวกลางในสารละลาย สารที่มีประจุต่างกันก็จะเคลื่อนที่ไปกันในทิศทางที่ตรงกันข้ามกัน เนื่องจากโมเลกุลของดีเอ็นเอมีหมู่ฟอสเฟตเป็นองค์ประกอบจำนวนมาก สารละลายดีเอ็นเอจึงมีประจุเป็นลบในสภาพ pH ที่เป็นกลาง โมเลกุลของดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่จากขั้วลบไปขั้วบวกและเนื่องจากหมู่ฟอสเฟตเป็นองค์ประกอบหลักของนิวคลีโอไทด์ ดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กจึงมีหมู่ฟอสเฟตน้อยกว่าดีเอ็นเอที่มีโมเลกุลใหญ่กว่า ดังนั้นจะเห็นได้ว่าประจุต่อมวลโมเลกุลของดีเอ็นเอทุกขนาดมีค่าเท่ากัน ทำให้ความเร็วในการเคลื่อนที่ของโมเลกุลดีเอ็นเอบนตัวกลางจึงขึ้นอยู่กับขนาดเป็นหลัก นอกจากประจุแล้วการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอยังขึ้นอยู่กับขนาดของโมเลกุล รูปร่างของดีเอ็นเอ (DNA configuration) แรงเคลื่อนไฟฟ้า (voltage) เปอร์เซ็นต์และชนิดของเจล รวมถึงสารละลายตัวกลางที่ใช้ด้วย (สุรินทร์, 2545)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อิเล็กโทรโฟรีซิสแบบเจล (Gel electrophoresis) ใช้เจลเป็นตัวกลางค้ำจุนซึ่งมีหลายชนิด เช่น แป้ง (starch), พอลิอะคริลาไมด์ (poly-acrylamide), อะกาโรส (agarose) และอะกาโลส-อะคริลาไมด์ (agarose-acrylamide) อิเล็กโทรโฟรีซิสแบบเจลใช้ในการแยกสารแมโครโมเลกุลเช่น โปรตีนและกรดนิวคลีอิกได้อย่างมีประสิทธิภาพ

อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (Agarose gel electrophoresis) มีตัวกลางค้ำจุนเป็นอะกาโรสเจล (agarose gel) เป็นพอลิแซคคาไรด์ (polysaccharide) ที่เป็นพอลิเมอร์ของ D-galactose สลับกับ 3,6-anhydrogalactose แยกได้จากวุ้น (agar) เนื่องจากอะกาโรสจับตัวกับสารต่าง ๆ ได้น้อยมาก จึงนิยมใช้ในการทำอิเล็กโทรโฟริซิส การแยกโมเลกุลของดีเอ็นเอส่วนมากจะนิยมใช้อะกาโรสเจลเป็นส่วนใหญ่เพราะมีช่วงที่ใช้ได้มากกว่า สามารถทำการเตรียมได้ง่ายและไม่เป็นอันตรายมากนัก โดยส่วนมากนิยมทำในแนวราบ (horizontal gel) (สุรินทร์, 2545)

7. การหาลำดับเบส (DNA Sequencing)

เทคนิคในการหาลำดับเบสของดีเอ็นเอมี 2 วิธีคือ การหาลำดับเบสโดยการติดฉลากที่ปลายดีเอ็นเอและใช้สารเคมีทำลายนิวคลีโอไทด์ ในตำแหน่งที่มีความจำเพาะต่อชนิดของเบส (sequencing of end-labeled DNA by base-specific chemical cleavage) โดยอาศัยหลักการใช้สารเคมีปรับเปลี่ยนเบสของดีเอ็นเอเช่น การเติม methyl group ในตำแหน่งที่จำเพาะต่อเบสบางตำแหน่ง ซึ่งเบสจะถูกปรับเปลี่ยนหรือถูกทำลายไปจนเหลือเพียง deoxyribose ซึ่งจะถูกทำลายต่อไปจนเกิดการขาดของสายดีเอ็นเอ ในตำแหน่งของเบสดังกล่าว ทั้งนี้เราสามารถติดตามดีเอ็นเอด้วยการติดสารกัมมันตรังสีเช่น ฟอสฟอรัส-32 (^{32}P) ซึ่งขนาดของดีเอ็นเอสามารถแยกได้โดยการใช้ไฟฟ้ากระแสตรงใน polyacrylamide gel และลำดับเบสสามารถอ่านได้จากแถบที่ปรากฏบนแผ่นฟิล์มเอกซเรย์

ส่วนอีกวิธีได้ถูกพัฒนาขึ้นโดย Frederick Sanger โดยใช้เอนไซม์เพื่อสร้างดีเอ็นเอสายใหม่จากดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA sequencing by enzymatic synthesis) อาศัยหลักการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่จากดีเอ็นเอต้นแบบสายเดี่ยวโดยการทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase และนิวคลีโอไทด์ที่ติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสี ซึ่งการสิ้นสุดการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่จะเกิดขึ้นในตำแหน่งของ dideoxy nucleotide จึงเรียกวิธีการนี้ว่า dideoxy chain termination DNA sequencing หรือ Sanger method (กัลยาณี, 2551)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สำหรับปัจจุบันวิธีที่ใช้อยู่เป็นวิธี Automated DNA sequencing อาศัยหลักการของ dideoxy chain termination ยกเว้นสีที่ใช้ในการติดฉลากจะใช้สารเรืองแสงแทนการใช้สารกัมมันตรังสี เนื่องจากสารกัมมันตรังสีมีอันตรายและกากกัมมันตรังสี (radioactive waste) ซึ่งกำจัดได้ยากนั้น ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม ดังนั้นจึงพัฒนามาใช้สารเรืองแสงเป็นตัวส่งสัญญาณแทน โดยอาศัยอุปกรณ์ติดตามการเรืองแสงที่แตกต่างกัน 4 ชนิดคือ A, G, T และ C โดยสีที่ติดฉลากบนนิวคลีโอไทด์แต่ละตัวจะมีการเรืองแสงที่ความยาวคลื่นแตกต่างกัน การติดฉลากสีในสายดีเอ็นเอจะเกิดขึ้นในขั้นตอนการสร้างสายดีเอ็นเอ โดยจะติดฉลากที่ปลาย 5’ ของไพรเมอร์หรือที่ปลาย 3’ ของ dideoxynucleotide triphosphate (จตุรงค์, 2541)

8. การหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมประชากร (Construction of Phylogenetic Tree)

Phylogeny หรือ Phylogenetic tree หรือโครงสร้างต้นไม้วิวัฒนาการคือ แผนภูมิประวัติแสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของกลุ่มสิ่งมีชีวิต ซึ่งจะช่วยให้สามารถอธิบายความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่สัมพันธ์กับวิวัฒนาการ เปรียบเทียบไปยังบรรพบุรุษหรือสิ่งมีชีวิตรุ่นก่อนหน้าได้ โดยแสดงความสัมพันธ์ในรูปแบบแผนภูมิหรือโครงสร้างไดอะแกรมเสมือนกับกิ่งก้านและลำต้นของต้นไม้เรียกว่า branching diagram หรือ tree

การแปลงข้อมูลทางโมเลกุลเป็น tree มีวิธีหลัก 2 วิธี โดยอาศัยลักษณะที่แตกต่างกัน (character-based method) หรืออาศัยระยะความห่างไกลกัน (distance-based method) (สุรินทร์, 2552)

Character-based method

การสร้าง tree โดยอาศัย character-based ใช้กับข้อมูลลำดับเบส (หรือลำดับกรดอะมิโน) โดยเปรียบเทียบลำดับเบสเป็นคู่ ๆ นับจำนวนการกลายพันธุ์ (mutation) ที่เกิดขึ้น มี 2 วิธีคือ

1. Maximum parsimony (MP) เริ่มจากการหาลำดับเบสที่เป็นบรรพบุรุษ ซึ่งอาจมีโอกาสเป็นไปได้หลายตัวอย่าง ทำให้ได้ tree หลายแบบ สร้าง tree โดยหาความเป็นไปได้ที่จะเกิดการเปลี่ยนแปลงน้อยที่สุดจากลำดับเบสของบรรพบุรุษจนถึงปัจจุบัน การเปรียบเทียบนิวคลีโอไทด์จะไม่ใช้ทุกตำแหน่ง แต่เลือกเฉพาะตำแหน่งที่พบการแทนที่เบสแบบเดียวกันนั้น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อย่างน้อย 2 ตัวอย่างหรือเกิดการแทนที่เบสที่ตำแหน่งนั้นอย่างน้อย 2 ครั้งซึ่งจัดว่าเป็น informative ถ้าเกิดการแทนที่เบสที่ตำแหน่งใดเพียงครั้งเดียวจัดว่าเป็น non-informative ซึ่งจะไม่นำมาคิด เมื่อเลือกได้ตำแหน่งที่เป็น informative แล้ว หาจำนวนการแทนที่เบสน้อยที่สุดที่ตำแหน่งดังกล่าว รวมจำนวนการเปลี่ยนแปลงทุกตำแหน่ง สร้าง tree ที่มีการเปลี่ยนแปลงรวมน้อยที่สุด

2. Maximum likelihood (ML) ใช้โมเดลของความน่าจะเป็นเพื่อเลือก tree ที่ดีที่สุด มีความเป็นไปได้มากที่สุด สร้าง tree ทุกแบบแล้วเปรียบเทียบความน่าจะเป็น โดยพิจารณาจากลำดับเบสทั้งหมด ไม่ใช่เฉพาะที่เป็น informative เหมือนวิธี MP คำนวณความน่าจะเป็นของลำดับเบสของบรรพบุรุษทั้งหมดที่ค่อย ๆ เปลี่ยนแปลงจากจุดต่าง ๆ จนถึงปัจจุบัน

Distance-based method

การสร้าง tree โดยวิธีนี้เริ่มจากการเปลี่ยนข้อมูลทางโมเลกุลให้เป็นค่า distance ก่อน โดยคำนวณค่า distance ระหว่างแต่ละตัวอย่างเป็นคู่ๆ นำมาทำเป็นเมทริกซ์ (matrix) แล้วจึงสร้าง tree ค่า distance คำนวณมาจากรูปแบบของแถบดีเอ็นเอหรือโปรตีนที่ได้จากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายแบบต่าง ๆ ซึ่งข้อมูลลำดับเบสก็สามารถนำมาหาค่า distance ได้ ส่วนการสร้าง tree ด้วยวิธีนี้มี 2 ระบบคือ

1. Clustering based method โดยดูจาก distance matrix แล้วเริ่มจับคู่ตัวอย่างหรือ taxon ที่เหมือนกันมากที่สุดคือมีค่า distance น้อยที่สุดก่อน แล้วดำเนินการต่อไปเรื่อย ๆ ที่นิยมใช้มี 2 วิธี

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

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

- วิธี Neighbor joining (NJ) คล้ายกับวิธี UPGMA คือ ค่อย ๆ ลดขนาดของเมทริกซ์ลง แต่ไม่ได้คิดว่าทุก taxon มีอัตราการวิวัฒนาการที่คงที่เหมือนวิธี UPGMA สำหรับข้อเสียของ NJ คือ สร้าง tree ได้เพียง 1 แบบ บางครั้งอาจมี taxon ที่ใกล้กันมากกว่า 1 คู่ การเลือกเพียง 1 คู่อาจดูผิดพลาดได้ วิธีแก้ไขคือ สร้าง tree ใหม่ โดยเริ่มจับกลุ่มตั้งต้นที่แตกต่างกัน แล้วค่อยเลือก tree ที่เหมาะสมจากข้อมูลประกอบอื่นอีกครั้งหนึ่ง

2. Optimality based method การสร้าง tree โดยวิธี clustering จะสร้างเพียง 1 tree เท่านั้น ไม่มีตัวเลือก แต่วิธี Optimality จะใช้วิธีสุ่มจับคู่ taxon แล้วสร้าง tree หลาย ๆ แบบ แล้วจึงเลือกแบบที่เหมาะสมที่สุด

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

9. เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาอ่างฤาไน (Khao Ang Ruenai Wildlife Sanctuary)

เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาอ่างฤาไน เป็นส่วนหนึ่งของสงวนแห่งชาติป่าแควระบม-สียัด ในจังหวัดฉะเชิงเทรา ติดกับบริเวณรอยต่อของจังหวัดสระแก้ว จันทบุรี ระยองและชลบุรี ประกาศตามพระราชกฤษฎีกากำหนดให้เป็นเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาอ่างฤาไน เมื่อพุทธศักราช 2520 ปัจจุบันมีเนื้อที่ 674,352 ไร่หรือ 1,079 ตารางกิโลเมตร มีอาณาเขตรวมกลุ่มพื้นที่ 5 จังหวัดคือ ฉะเชิงเทรา ชลบุรี ระยอง จันทบุรีและสระแก้ว มีลักษณะพื้นที่เป็นที่ราบต่ำ มีความสูงจากระดับน้ำทะเลปานกลาง 30-802 เมตร ลักษณะพืชพันธุ์ที่ปกคลุมเป็นป่าดิบแล้งเป็นส่วนใหญ่และมีป่าผลัดใบขึ้นแทรกเป็นกลุ่มเล็ก ๆ จากการสำรวจพบพันธุ์พืชจำนวนไม่น้อยกว่า 1,459 ชนิด โดยมีไม้มีค่าทางเศรษฐกิจหลายชนิดเช่น ไม้สกุลยาง ไม้มะค่าโมง เป็นต้น ข้อมูลจากการสำรวจพบว่า

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาอ่างฤาไนมีจำนวนและความหลากหลายของชนิดสัตว์ที่สูง สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมมีการสำรวจพบ 132 ชนิดได้แก่ กระทิง วัวแดง ช้างป่า เป็นต้น สัตว์เลื้อยคลานสำรวจพบ 107 ชนิด ได้แก่ จระเข้น้ำจืด เต่าใบไม้ เป็นต้น ปลาพบจำนวน 23 ชนิดได้แก่ ปลาช่อน ปลาหมอ เป็นต้น ในส่วนของแมลงมีการสำรวจพบ 106 ชนิด จาก 76 สกุล ใน 12 วงศ์และสัตว์ปีกจำนวน 395 ชนิด 106 สกุล ใน 64 วงศ์

พื้นที่ของเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาอ่างฤาไนนั้นมีการสำรวจพบสัตว์ป่าที่ถูกจัดอยู่ในสถานะถูกคุกคาม และใกล้สูญพันธุ์ที่สำคัญหลายชนิดได้แก่ นกกระสาคอขาว (*Ciconia episcopus*), ไก่ฟ้าพญาลอ (*Lophura diardi*), นกตะกรุม (*Leptoptilos javanicus*), จระเข้น้ำจืด (*Crocodylus siamensis*), ชะนีมงกุฎ (*Hylobates pileatus*), เสือลายเมฆ (*Neofelis nebulosa*), ช้าง (*Elephas maximus*) รวมทั้งหมาใน (*Cuon alpinus infuscus*) ด้วย (กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพันธุ์พืช, 2553)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. หลอดเก็บตัวอย่างมูลที่บรรจุสารละลายสำหรับรักษาสภาพมูล (DETs buffer)
2. เครื่องปั่นแยกตะกอน Centrifugation, DENVILLE 260D (Scientific. Inc, USA)
3. เครื่องแห้งตะกอน Dry bath incubation (Major Science Inc, Taiwan)
4. เครื่องถ่ายภาพเจล Gel documentation (Alphadigidoc™, EEC)
5. Gel electrophoresis Gelmate 200 (TOYOBO®, Japan)
6. เครื่องกำเนิดแสง U.V. Electronic U.V. Transilluminator (Alphadigidoc™, EEC)
7. เครื่องปฏิกิริยา PCR, PTC-200 (Peltier Thermal Cycler machine, USA)
8. เครื่องคอมพิวเตอร์
9. โปรแกรมวิเคราะห์ลำดับเบส Bioedit version 7.0.9.0. (Hall, 1997)
10. โปรแกรมวิเคราะห์ลำดับเบส MEGA version 4.0.2 (Tamura *et al*., 2007)
11. โปรแกรมวิเคราะห์ลำดับเบส PAUP version 4.0b10 (Swafford, 2002)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

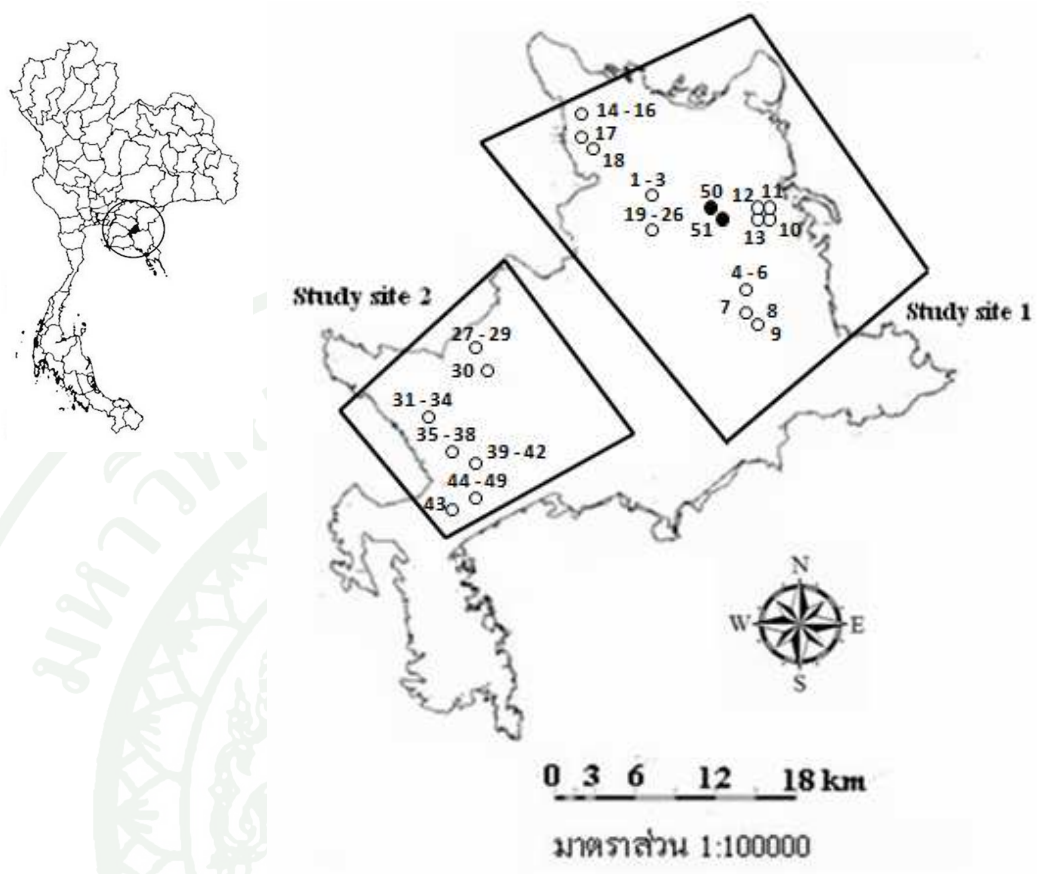
วิธีการ

1. การเก็บตัวอย่างมูล (Faecal Samples Collection)

ทำการเก็บตัวอย่างมูลจากหมาในในกรงเลี้ยงของสวนสัตว์เชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่ จากหมาในเพศผู้ 2 ตัว อายุ 8 ปี จำนวน 2 ตัวอย่างและเก็บตัวอย่างมูลจากหมาใน 6 ตัว ประกอบด้วยเพศผู้ 2 ตัว เพศเมีย 4 ตัวจากกรงเลี้ยงของสวนสัตว์เชียงใหม่ไนท์ซาฟารี จังหวัดเชียงใหม่ จำนวน 6 ตัวอย่างและเก็บตัวอย่างมูลจากพื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาอ่างฤาไน จังหวัดฉะเชิงเทรา จำนวน 51 ตัวอย่าง พร้อมจดบันทึกพิกัดด้วยระบบกำหนดตำแหน่งบนพื้นโลกผ่านดาวเทียม (Global Positioning System: GPS) โดยแบ่งพื้นที่ในการศึกษา (study site) เป็น 2 พื้นที่โดยทั้งสองพื้นที่อยู่ห่างกันประมาณ 10-12 กิโลเมตร (ภาพที่ 4 และ ตารางผนวกที่ ข1) ตามรายงานการพบฝูงหมาในของเจ้าหน้าที่ป่าไม้ที่เดินสำรวจผืนป่าเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาอ่างฤาไนและตามรายงานการถ่ายภาพหมาในโดยกล้องดักถ่ายภาพสัตว์ (camera trap) จากการศึกษาของ Kate Jenks (ติดต่อส่วนตัว) ในช่วงระยะเวลาตั้งแต่เดือนธันวาคม พุทธศักราช 2551 ถึงเดือนพฤษภาคม พุทธศักราช 2553 นั้นสามารถจับภาพหมาในได้ทั้งหมด 48 ตำแหน่ง (ภาพที่ 5 และ ตารางผนวกที่ ข2) โดยระยะเวลาในการเก็บตัวอย่างมูลหมาในในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาอ่างฤาไน ตั้งแต่เดือนกันยายน พุทธศักราช 2552 ถึงเดือนมิถุนายน พุทธศักราช 2553

โดยเก็บตัวอย่างมูลในน้ำยารักษาสภาพมูล DETs buffer (Frantzen *et al*., 1998) (ภาคผนวก ก) ในหลอดใหม่ปริมาตร 50 มิลลิลิตร อัตราส่วนน้ำยารักษาสภาพมูล DETs buffer ต่อตัวอย่างมูลคือ 4:1 (Melanie *et al*., 2002)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 4 แสดงแผนที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาอ่างฤาไน จังหวัดฉะเชิงเทรา ขอบเขตพื้นที่ศึกษา และตำแหน่งที่ทำการเก็บตัวอย่างมูลหมาในเพื่อสกัดดีเอ็นเอ โดยเครื่องหมาย (○) แทนตำแหน่งตัวอย่างที่มีการจดบันทึกพิกัด, (●) แทนตำแหน่งตัวอย่างที่ไม่มีการจดบันทึกพิกัดและพบเห็นตัวหมาใน

ที่มา: กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพันธุ์พืช (2553)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพที่ 5 แสดงแผนที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาอ่างฤาไน จังหวัดฉะเชิงเทรา ขอบเขตพื้นที่ศึกษา และตำแหน่งที่ถ่ายภาพหมาในไว้ได้โดยกล้องดักถ่ายภาพสัตว์ (Jenks, ติดต่อส่วนตัว)

ที่มา: กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพันธุ์พืช (2553)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. การสกัดดีเอ็นเอ (DNA Extraction)

การสกัดดีเอ็นเอจากมูลนั้นประยุกต์จากวิธีการสกัดดีเอ็นเอจากรายงานของ Boom *et al*. (1990) โดยดูดของเหลวจากหลอดที่บรรจุตัวอย่างมูล 1.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอด 2 มิลลิลิตร จากนั้นทำการปั่นให้ตกตะกอนที่ 13,000 รอบต่อนาที (rpm) นาน 15 นาที เทสารละลายส่วนบนทิ้ง และเติมสารละลาย L1 (Lysis buffer) (ภาคผนวก ก) ให้ได้ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน และนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน จากนั้นนามาปั่นตกตะกอนที่ 5,000 rpm นาน 1 นาที ทำการดูดสารละลายส่วนบนประมาณ 750 ไมโครลิตร ย้ายใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตรหลอดใหม่ที่มีการเติม silica (ภาคผนวก ก) 50 ไมโครลิตรและ L1 buffer 250 ไมโครลิตร รอไว้แล้ว จากนั้นเขย่าให้เข้ากันและเขย่าทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง นำไปปั่นที่ 13,000 rpm นาน 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนด้วย L2 (Wash buffer) (ภาคผนวก ก) 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันและปั่นให้ตกตะกอนที่ 10,000 rpm นาน 1 นาที เทส่วนใสทิ้งและทำการล้างด้วย L2 อีกครั้ง และล้างตะกอนด้วย 70% ethanol 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันและปั่นที่ 10,000 rpm นาน 1 นาที ทำซ้ำสองรอบเช่นเดียวกัน เทส่วนใสด้านบนออกให้หมดและทิ้งตะกอนให้แห้ง ก่อนใช้งานทำการเติม TE buffer (ภาคผนวก ก) 45-50 ไมโครลิตร เพื่อละลายดีเอ็นเอ เขย่าให้เข้ากันและนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จากนั้นนำไปปั่นที่ 10,000 rpm นาน 3 นาทีและเก็บดีเอ็นเอที่ละลายแล้วไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้งานในขั้นตอนต่อไป

3. การออกแบบไพรเมอร์ (Primer)

การออกแบบไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในบางส่วนของตำแหน่ง cytochrome b และ control region บนไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของหมาในนั้นทำการออกแบบไพรเมอร์เพื่อการศึกษาในครั้งนี้ทั้งหมด 2 คู่ ซึ่งไพรเมอร์คู่แรกมีตำแหน่งจำเพาะต่อบางส่วนของตำแหน่งยีน tRNA-Glu และ cytochrome b ส่วนคู่ที่สองมีตำแหน่งจำเพาะต่อบางส่วนของยีน tRNA-Pro และ control region บนไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ (ภาพที่ 6-8) โดยข้อมูลลำดับเบสของไพรเมอร์ อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการจับของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอต้นแบบ (annealing temperature) และขนาดของผลผลิต PCR ที่คาดว่าจะได้ (ตารางที่ 3)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4. การเพิ่มชิ้นดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยา PCR (Polymerase Chain Reaction)

ในปฏิกิริยา PCR จะประกอบไปด้วยส่วนของ mixture ซึ่งประกอบไปด้วย deionized water 67.5 ไมโครลิตร, 10x PCR buffer 10 ไมโครลิตร, $MgCl_2$ 8 ไมโครลิตร, 10mM dNTP 2 ไมโครลิตร, forward และ reverse primer ความเข้มข้น 1 ไมโครโมล อย่างละ 1 ไมโครลิตรและ *Taq* DNA polymerase 0.5 ไมโครลิตร (Fermentas, USA) รวมทั้งสิ้น 90 ไมโครลิตรและอีกส่วนคือดีเอ็นเอที่สกัดเก็บไว้ โดยผสม mixture กับ ดีเอ็นเอในอัตราส่วน mixture:DNA (27:3) ดังแสดงในตารางภาคผนวก ค1

ใช้เครื่องมือในการเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเออัตโนมัติ PTC-200 (Peltier Thermal Cycler machine, USA) โดยขั้นตอนในประกอบด้วย pre-denaturation ที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเข้าสู่รอบของการเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอ จำนวน 40 รอบ เริ่มจาก denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ขั้นตอน annealing ที่ 53 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาทีสำหรับไพรเมอร์คู่ CB0 และ CB2 เพื่อเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอในบางส่วนของ cytochrome b และ 54 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาทีสำหรับไพรเมอร์คู่ D-loopFw และ D-loopRe เพื่อเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอในบางส่วนของ control region และขั้นตอน extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที และเมื่อครบจำนวนรอบ อุณหภูมิจะเข้าสู่ขั้นตอนของ final extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาทีและ final incubation ที่ 4 องศาเซลเซียส

5. การตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (Electrophoresis)

นำผลผลิต PCR (PCR product) ที่ทำผ่านเพิ่มจำนวนจากปฏิกิริยา PCR ตรวจสอบด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis (ภาคผนวก ก) โดยผสมผลผลิต PCR ปริมาตร 30 ไมโครลิตรกับสีสำหรับผสมผลผลิต PCR เพื่อทำการตรวจสอบขนาดของผลผลิต PCR ปริมาตร 10 ไมโครลิตร และใส่ลงในหลุมบน 1.5% agarose gel จากนั้นใช้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 35 นาทีและนำไปย้อมใน ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5 mg/L นาน 5-10 นาที จากนั้นนำขึ้นมาล้างด้วยน้ำสะอาดนาน 5 นาที แล้วนำมาอ่านผลด้วยเครื่อง gel documentation หรือ เครื่อง U.V. transilluminator โดยใช้ 100 bp ladder เป็น marker ทำการประเมินขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการ จากนั้นทำการตัดชิ้นดีเอ็นเอดังกล่าว

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ทำดีเอ็นเอที่ได้ให้บริสุทธิ์โดยประยุกต์การใช้ silica ในการทำให้ชิ้นดีเอ็นเอบริสุทธิ์ เริ่มจากการตัดเจลในตำแหน่งที่มีแถบดีเอ็นเอตามขนาดที่ต้องการบนเครื่องฉายแสง U.V. และใส่ชิ้นเจลที่ตัดได้ไว้ในหลอดใหม่ขนาด 1.5 มิลลิลิตร โดยควรทำการเปลี่ยนใบมีดทุกครั้งที่ทำการตัดแถบของดีเอ็นเอเพื่อไม่ให้มีดีเอ็นเอปนเปื้อนกันในแต่ละตัวอย่าง ซึ่งดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนอาจจะทำให้ผลการหาลำดับเบสคลาดเคลื่อน เมื่อทำการตัดเสร็จแล้วทำการเติมสารละลาย L1 buffer ลงในหลอดที่บรรจุชิ้นเจลที่ตัดไว้แล้วปริมาณ 300 ไมโครลิตร ทำการเขย่าให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ใน heat box ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 นาทีสลับกับเขย่าจนกระทั่งชิ้นเจลที่ตัดไว้ละลายหมด

เมื่อชิ้นเจลละลายหมดแล้ว ทำการเติม silica 15-20 ไมโครลิตร ตามความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่คาดว่าจะได้จากการทำให้บริสุทธิ์ นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่านานครึ่งถึงหนึ่งชั่วโมง นำไปปั่นที่ 10,000 rpm นาน 1 นาที เทส่วนใสด้านบนทิ้ง จากนั้นทำการล้างตะกอนของ silica ด้วยสารละลาย L2 buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันและนำไปปั่นที่ 10,000 rpm นาน 1 นาที โดยทำการล้างด้วยสารละลาย L2 buffer ซ้ำสองครั้งและเทส่วนใสด้านบนทิ้ง จากนั้นทำการล้างด้วย 70% ethanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันและนำไปปั่นที่ 10,000 rpm นาน 1 นาที ทำซ้ำสองครั้งเช่นเดียวกันกับการล้างด้วยสารละลาย L2 จากนั้นเทส่วนใสด้านบนทิ้งและทิ้งให้ตะกอนแห้ง

เมื่อตะกอนแห้งดีแล้วทำการเติมสารละลาย TE ปริมาณ 20-25 ไมโครลิตร (ตามความเข้มของแถบดีเอ็นเอ) เพื่อละลายดีเอ็นเอออกจาก silica ทำการเขย่าให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส นาน 3-5 นาทีและนำไปปั่นที่ 10,000 rpm นาน 2 นาที จากนั้นทำการดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่ไว้ (พึงระวังในการดูดส่วนใสไม่ควรมี silica ติดมาเพราะจะส่งผลต่อการหาลำดับเบส) เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอการนำไปใช้งานต่อไป

6. การหาลำดับเบส (DNA Sequencing)

ชิ้นดีเอ็นเอที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วจะเก็บไว้ในหลอดและส่งไปหาลำดับเบสโดยเครื่องหาลำดับเบสอัตโนมัติรุ่น A-373 automated sequencer (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA) และใช้ไพรเมอร์คู่เดียวกันกับที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

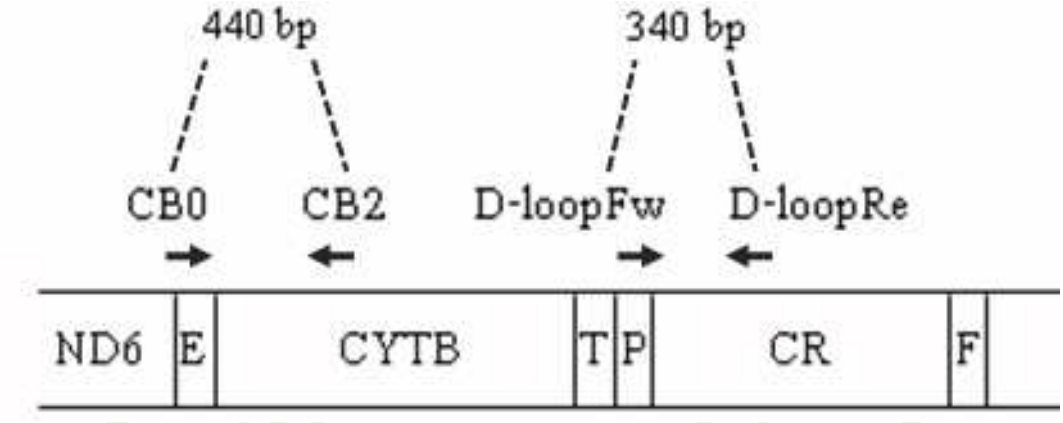
7. การเปรียบเทียบลำดับเบส (Alignment)

เมื่อได้ลำดับเบสขนาดความยาวประมาณ 440 bp สำหรับ cytochrome b และ 340 bp สำหรับ control region แล้วจากนั้นนำลำดับเบสที่ได้มาทำการตัดในลำดับเบสที่อ่านไม่ได้ออกก่อน นำเปรียบเทียบกับลำดับเบสบนไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของหมาในที่มีรายงานใน GenBank (accession number NC013445) (Zhang and Chen, 2010) เพื่อตรวจสอบว่าลำดับเบสที่ได้มานั้นเป็นหมาในจริง และใช้โปรแกรม BIOEDIT version 7.0.9 (Hall, 1999) ในการตรวจสอบ เปรียบเทียบลำดับเบส เพื่อหาความแตกต่างและจัดกลุ่ม (haplotype) ของหมาในจากสวนสัตว์เชียงใหม่ สวนสัตว์เชียงใหม่ ไนท์ซาฟารี จังหวัดเชียงใหม่ และเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาอ่างฤาไน จังหวัดฉะเชิงเทรา โดยทำการวิเคราะห์ลำดับเบสในบางบริเวณของ cytochrome b และ control region บนไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ ขนาดความยาว 407 bp และ 246 bp ตามลำดับ โดยเปรียบเทียบกับรายงานของ Iyengar *et al*. (2005)

8. การหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของหมาใน (Phylogenetic Tree)

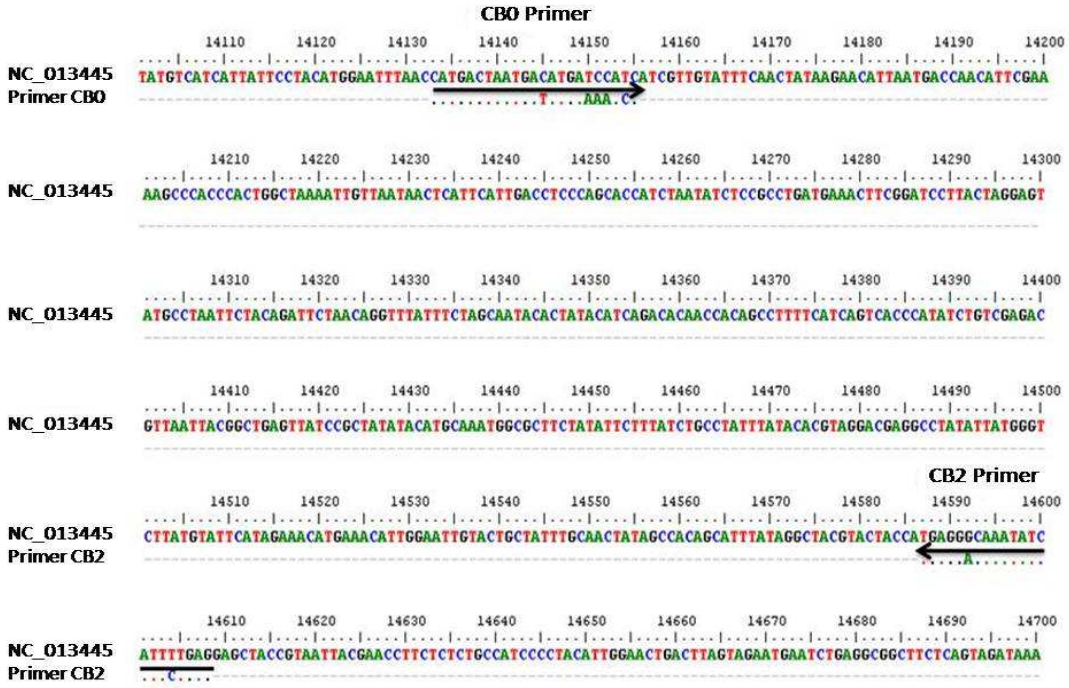
ลำดับเบสทั้งหมดที่ได้จะถูกนำมาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของสายวิวัฒนาการพันธุกรรมในรูปแบบของโครงสร้างต้นไม้วิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ของหมาในและเปรียบเทียบกับลำดับเบสของหมาในที่มีรายงานใน GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) โดยใช้หมาป่าสีเทา (grey wolf; *Canis lupus*) (GenBank accession number AF098117) เป็นสัตว์นอกกลุ่ม (outgroup) เพื่อให้สอดคล้องกับการศึกษาของ Iyengar *et al*. (2005) ด้วยโปรแกรม PAUP version 4.0b10 (Swafford, 2002) โดยใช้วิธี maximum likelihood (ML) และ maximum parsimony (MP) ในการวิเคราะห์ ร่วมกับการทดสอบความน่าเชื่อถือของ tree ด้วย Bootstrap 1,000 รอบ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



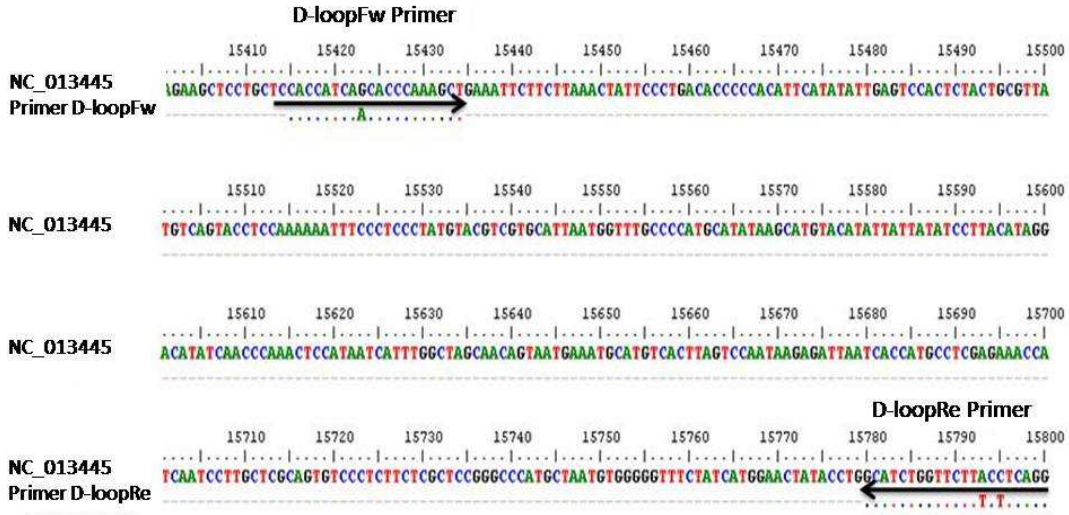
ภาพที่ 6 ภาพแสดงตำแหน่งของไพรเมอร์ ณ ตำแหน่งบางส่วนของ tRNA-Glu (E) กับ cytochrome b (CYTB) และ tRNA-Pro (P) กับ control region (CR) บนไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอและขนาดของผลผลิตที่คาดว่าจะได้ของไพรเมอร์คู่ CB0 กับ CB2 และคู่ D-loopFw กับ D-loopRe

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 7 ภาพแสดงลำดับเบสในบางส่วนของ tRNA-Glu และ cytochrome b บนไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอและตำแหน่งของไพรเมอร์ CB0 และ CB2 ที่ออกแบบในการศึกษานี้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 8 ภาพแสดงลำดับเบสในบางส่วนของ tRNA-Pro และ control region บนไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอและตำแหน่งของไพรเมอร์ D-loopFw และ D-loopRe ที่ออกแบบในการศึกษานี้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 3 ตารางแสดงลำดับเบส อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการจับของไพรเมอร์ (annealing temperature) และขนาดของผลผลิต PCR ที่คาดว่าจะได้ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษา

Name	Primer 5'-3'	Condition Annealing (Ta)	Size (bp)
CB0	CATGACTAATGATATGAAAAACC	53°C	440
CB2	CTCAGAATGATATTTGTCCTCA		
D-loopFw	CACCATCAACACCCAAAGCT	54°C	340
D-loopRe	CCTGAAGAAAGAACCCAGATGC		

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผลและวิจารณ์

ผล

การหาลำดับเบสบนไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ เพื่อจัดกลุ่มตามรูปแบบที่แตกต่างกันของลำดับเบส หรือ haplotype ของหมาในจากดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) ที่ได้มาจากตัวอย่างมูลจำนวน 31 ตัวอย่างจากทั้งหมด 59 ตัวอย่าง (ร้อยละความสำเร็จในการเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR คิดเป็น 52.54) แบ่งเป็นมูลหมาในในกรงเลี้ยง 8 ตัวอย่าง ซึ่งสามารถสกัดและเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอได้ขนาดของผลผลิต PCR ตามที่ต้องการได้ทั้งหมด คิดเป็นร้อยละความสำเร็จในการเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR เท่ากับ 100 และมูล 51 ตัวอย่างที่เก็บได้จากพื้นที่ป่าเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาอ่างฤาไน จังหวัดฉะเชิงเทรานั้น สามารถสกัดและเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอได้ขนาดของผลผลิต PCR ตามที่ต้องการ ทั้งหมด 23 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละความสำเร็จในการเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR เท่ากับ 45.1 โดย 28 ตัวอย่างที่เหลือ แบ่งเป็น 26 ตัวอย่างไม่สามารถเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอในส่วนที่ต้องการทั้งสองส่วนคือ ส่วนของ cytochrome b และ control region และอีก 2 ตัวอย่างสามารถเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอในส่วนของ control region ได้ แต่ได้ผลผลิต PCR ความยาวประมาณ 422 bp ซึ่งไม่ตรงกับขนาดที่ต้องการ (340 bp) มีโอกาสสูงที่จะเป็นดีเอ็นเอของสัตว์อื่น

เมื่อได้ผลผลิต PCR ที่ต้องการจากดีเอ็นเอต้นแบบคือ ขนาดความยาว 440 bp สำหรับ cytochrome b และ 340 bp สำหรับ control region (ภาพที่ 9-10) ที่ได้จากมูลทั้ง 31 ตัวอย่างแล้วมาทำให้บริสุทธิ์ หาลำดับเบสโดยเครื่องหาลำดับเบสอัตโนมัติรุ่น A-373 และนำลำดับเบสที่ได้มา BLAST ใน GenBank แล้วเป็นหมาในจริง (ภาพที่ 11-13) และทำการวิเคราะห์ลำดับเบสในบางส่วนของบริเวณ cytochrome b และ control region บนไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ ขนาดความยาว 407 และ 246 bp ตามลำดับ (จากความยาวของ PCR product ที่ได้ 440 และ 340 bp ตามลำดับ ทำการตัดลำดับเบสส่วนต้นและท้ายที่อ่านได้ไม่ชัดเจนออก) และทำการเปรียบเทียบลำดับเบสด้วยโปรแกรม BIOEDIT version 7.0.9 (Hall, 1999) (http://www.mbio.ncsu.edu/Bioedit/bioedit.html) (ภาพที่ 14-15) จากการศึกษาในบางบริเวณของ cytochrome b บนไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอขนาดความยาว 407 bp พบว่ามีความแตกต่างของลำดับเบส (variable site) จำนวน 1 ตำแหน่ง (ตารางที่ 4) คือตำแหน่งที่ 291 ของความยาว 407 bp ตรงกับตำแหน่งที่ 14475 ของความยาว 16,672 bp ที่มีรายงานใน GenBank (accession number NC013445) (Zhang and Chen, 2010) ซึ่งสามารถแบ่ง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

หมาในได้เป็น 2 กลุ่ม (haplotype) คือ haplotype 1 และ 2 (Iyengar *et al*., 2005) โดย haplotype 1 มีลำดับเบสที่ตำแหน่ง 291 เป็น เบส C (Cytosine) และ haplotype 2 เป็นเบส T (Thymine) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงเบสในตำแหน่งนี้ส่งผลให้กรดอะมิโนเปลี่ยนจากอาร์จินีน (Arginine) ใน haplotype 1 ไปเป็นซีสทีอีน (Cysteine) ใน haplotype 2 โดยลำดับเบสที่ได้จากมูลหมาในในกรงเลี้ยงทั้ง 8 ตัวอย่าง ได้แก่ CMZ 1, 2, CNS 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 นั้นถูกจัดเป็น haplotype 1 และลำดับเบสที่ได้จากมูลหมาในทั้ง 23 ตัวอย่าง (KARWS 1, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 18, 19, 21, 22, 23, 25, 26, 27, 28, 31, 32, 33, 34, 50 และ 51) จากเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาอ่างฤาไนนั้นถูกจัดอยู่ใน haplotype 2

จากการศึกษาในบางบริเวณของ hypervarible region 1 ของ control region บนไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ ความยาว 246 bp พบว่ามีความแตกต่างของลำดับเบส (variable site) จำนวน 22 ตำแหน่ง (ตารางที่ 5) ซึ่งสามารถแบ่งหมาในได้ 3 กลุ่ม (haplotype) โดยหมาในในกรงเลี้ยงแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรกคือ haplotype R ซึ่งตรงกับรายงานของ Iyengar *et al*. (2005) ในตัวอย่างมูล 4 ตัวอย่างได้แก่ CNS 1, 3, 4 และ 6 จากสวนสัตว์เชียงใหม่ ไนท์ซาฟารีและอีกกลุ่มเป็นกลุ่มที่พบใหม่และให้ชื่อกลุ่มนี้ว่า haplotype U ซึ่งพบในตัวอย่างมูล 4 ตัวอย่าง ได้แก่ CMZ 1, 2, CNS 2 และ 5 จากสวนสัตว์เชียงใหม่และสวนสัตว์เชียงใหม่ไนท์ซาฟารี (ตารางที่ 6) ส่วนอีกหนึ่งกลุ่มใหม่ที่พบในการศึกษาครั้งนี้ให้ชื่อว่า haplotype T ซึ่งได้จากการศึกษาในตัวอย่างมูลทั้ง 23 ตัวอย่าง (KARWS1, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 18, 19, 21, 22, 23, 25, 26, 27, 28, 31, 32, 33, 34, 50 และ 51) จากพื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาอ่างฤาไน จังหวัดฉะเชิงเทรา

การเปรียบเทียบความคล้ายคลึงทางพันธุกรรม (genetic similarity) โดยใช้โปรแกรม MEGA version 4.0.2 (Tamura *et al*., 2007) วิธีวิเคราะห์คือ Pairwise distance และโมเดลที่ใช้คือ Maximum Composite Likelihood ในการคำนวณค่า genetic distance ระหว่าง haplotype ทั้ง 3 กลุ่มที่ได้จากการศึกษาในบางส่วนของ control region และลำดับเบสของหมาในในส่วนของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอที่มีรายงานใน GenBank (accession number NC013445) (Zhang and Chen, 2010) ค่าที่ได้จากการคำนวณพบว่า control region haplotype R และ U ที่ถูกจัดอยู่ใน haplotype 1 ร่วมกัน จากการศึกษาในบางส่วนของ cytochrome b นั้นมีความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมมากกว่า control region haplotype T ที่ถูกจัดอยู่ใน cytochrome b haplotype 2 (ตารางที่ 7)

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ โดยแสดงความสัมพันธ์ในรูปแบบของต้นไม้วงศ์วานเครือทางวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ด้วยโปรแกรม PAUP version 4.0b10 (Swafford,

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2002) โดยใช้วิธี maximum likelihood (ML) และ maximum parsimony (MP) ในการวิเคราะห์ร่วมกับการทดสอบความน่าเชื่อถือของ tree ด้วย Bootstrap 1,000 รอบ (ภาพที่ 16) พบว่า haplotype R และ U แยกมาจากบรรพบุรุษร่วม (common ancestor) เดียวกันที่เรียกว่า เคลด (clade) ซึ่งทั้งสองกลุ่มถูกจัดอยู่ใน clade I ซึ่งสอดคล้องกับการที่มีลำดับเบสในตำแหน่งที่ 291 ของ cytochrome b ที่เป็นเบส C (Cytosine) โดยมีค่า bootstrap ที่ได้จากการคำนวณด้วยวิธี ML และ MP เท่ากับ 58 และ 51 ตามลำดับ แสดงว่าการจัด haplotype R และ U ไว้ใน clade I นั้นมีความน่าเชื่อถือหรือความเป็นไปได้ในระดับปานกลางและ haplotype R กับ U มีการแยกสายวิวัฒนาการออกจากจุดที่มีการเปลี่ยนแปลง (node) ร่วมกัน ในการจัด haplotype R อยู่รวมกับ M และ P มีค่า bootstrap ที่ได้จากการคำนวณด้วยวิธี ML และ MP เท่ากับ 74 และ 79 ตามลำดับ ซึ่งมีความน่าเชื่อถือปานกลาง ส่วน haplotype U ถูกจัดอยู่รวมกับ M, P และ R ซึ่งมีค่า bootstrap เท่ากับ 66 จากทั้งวิธี ML และ MP แสดงว่ามีความน่าเชื่อถือ หรือความเป็นไปได้ที่ U จะอยู่รวมกลุ่มกับ M, P และ R ในระดับปานกลาง ในส่วนของ haplotype T นั้นถูกจัดอยู่ใน clade II รวมกับ E, F, G, K และ S ซึ่งสอดคล้องกับการที่มีลำดับเบสในตำแหน่งที่ 291 ของ cytochrome b ที่เป็นเบส T (Thymine) การจัดรวมกลุ่มใน clade II สนับสนุนด้วยค่า bootstrap ที่ได้จากการคำนวณด้วยวิธี ML และ MP เท่ากับ 91 และ 90 ตามลำดับแสดงว่าการจัดกลุ่ม T อยู่รวมกับ E, F, G, K และ S นั้นมีความน่าเชื่อถือที่สูงและ haplotype T และ S มีการแยกสายวิวัฒนาการออกจากจุดที่มีการเปลี่ยนแปลง (node) ร่วมกัน ในการจัด haplotype T อยู่รวมกับ S นั้นมีค่า bootstrap ที่ได้จากการคำนวณด้วยวิธี ML และ MP เท่ากับ 74 และ 58 ตามลำดับ แสดงว่ามีความน่าเชื่อถือหรือความเป็นไปได้ที่ T จะอยู่รวมกลุ่มกับ S ในระดับปานกลาง

เมื่อนำทั้ง 3 กลุ่มของ control region haplotype คือ R, T และ U ที่ได้จากการศึกษาในตัวอย่างมูลทั้ง 31 ตัวอย่าง มาสร้างเป็นเครือข่าย (Median-joining networks) (ภาพที่ 17) ของกลุ่มหมาใน พบว่า haplotype R และ U มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้เคียงกันมากกว่า haplotype T และ haplotype T มีการแยกสายวิวัฒนาการออกจากจุดที่มีการเปลี่ยนแปลงร่วมกันกับ haplotype S ซึ่งตรงกับข้อมูลของต้นไม้เครือวิวัฒนาการ (phylogenetic tree)

ตัวอย่างมูลจากเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาอ่างฤาไน จังหวัดฉะเชิงเทราที่สามารถสกัดดีเอ็นเอ เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอและได้ผลของลำดับเบสเป็นหมาในจริงมีจำนวน 23 ตัวอย่างจากทั้งหมด 51 ตัวอย่าง ใน 28 ตัวอย่างนั้น แบ่งเป็น 26 ตัวอย่างที่ไม่สามารถเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอได้โดยไพรเมอร์ทั้งสองคู่ และอีก 2 ตัวอย่างสามารถเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอในส่วนของ control region ได้ แต่

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผลผลิต PCR ที่ได้มีขนาดประมาณ 422 bp ซึ่งไม่ตรงกับขนาดที่ต้องการ (340 bp) และเมื่อนำผลของลำดับเบสจากตัวอย่างดังกล่าวไป BLSAT ใน GenBank พบว่าลำดับเบสจากทั้งสองตัวอย่างนั้นตรงกับลำดับเบสของกระจงเล็กหรือกระจงหนู (*Tragulus javanicus*) ซึ่งอาจเกิดจากการออกแบบไพรเมอร์ที่ครอบคลุมในบริเวณลำดับเบสที่อนุรักษ์คือ ลำดับเบสในส่วนของ tRNA-Pro ที่มีความคล้ายคลึงกันอย่างมากในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมทำให้มีโอกาสได้ลำดับเบสของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมชนิดอื่นที่เป็นเหยื่อของหมาในได้และดีเอ็นเอของหมาในอาจมีคุณภาพไม่ดีและดีเอ็นเอคุณภาพดีปริมาณน้อยกว่าทำให้เกิดความยากในการจับอย่างจำเพาะของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอต้นแบบ

ขณะที่ตัวอย่างมูล 8 ตัวอย่างจากกรงเลี้ยงในจังหวัดเชียงใหม่ สามารถสกัดดีเอ็นเอ และเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR ได้ในทุกตัวอย่าง ซึ่งอาจเนื่องมาจากมูลที่ได้มาจากสวนสัตว์เป็นมูลสด ทำการเก็บหลังจากถ่ายไม่เกิน 2-4 ชั่วโมง ทำให้ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพดียังมีอยู่ปริมาณมากและอาหารที่ให้กับหมาในในกรงเลี้ยงนั้นเป็นอาหารเม็ดสำเร็จรูป กับเนื้อหมูดิบ จึงลดปัจจัยรบกวนจากเหยื่อลงได้ ทำให้สามารถได้ PCR product ในขนาดที่ต้องการจากการสกัดและการเพิ่มจำนวนในครั้งแรกและพบ PCR product ในขนาดที่ไม่ต้องการน้อย (non-specific band) ในขณะที่ตัวอย่างมูลที่ได้จากเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาอ่างฤาไนนั้นมีบางตัวอย่างเป็นมูลที่แห้งหรือเปียกจนเกินไป ซึ่งแตกต่างกันตามฤดูกาลที่ทำการเก็บตัวอย่าง รวมทั้งความชื้นในอากาศและการส่องถึงของแสงแดดในบริเวณที่พบตัวอย่างมูล เป็นปัจจัยที่ส่งผลให้เซลล์ของเยื่อบุผนังลำไส้ (intestinal epithelium cell) ที่ผิวนอกของมูลนั้นมีคุณภาพและปริมาณลดลง เช่นเดียวกับไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ (Stenglein *et al*., 2010) ทำให้ความสามารถในการจับของไพรเมอร์กับลำดับเบสบนไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอลดลงด้วย รวมทั้งลักษณะมูลที่มีขนของเหยื่อปะปนอยู่จำนวนมากนั้น ส่งผลให้เกิด PCR product ในขนาดที่ไม่ต้องการ (non-specific band) เพิ่มมากขึ้นด้วย (Melanie *et al*., 2003)

จากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในส่วนของไมโตคอนเดรียลจีโนมในหมาในพบว่าบริเวณ control region นั้นมีความหลากหลายทางพันธุกรรมมากกว่าบริเวณ cytochrome b บนสายไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Iyengar *et al*. (2005) ที่ทำการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการในหมาใน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Haplotype R และ U ที่ถูกพบในตัวอย่างมูลที่ได้มาจากหมาในในกรงเลี้ยงทั้งสองแห่งนั้นมีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้เคียงกันมากกว่า haplotype T ที่พบในตัวอย่างมูลหมาในที่ได้จากเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาอ่างฤาไน จังหวัดฉะเชิงเทรา เนื่องจากหมาในจากสวนสัตว์ทั้งสองแห่งนั้นเป็นหมาในที่ได้รับมาจากสวนสัตว์ในเนเธอร์แลนด์ ไม่ใช่หมาในจากพื้นที่ป่าของประเทศไทย ซึ่งหมาในในป่าของประเทศไทยถูกจัดเป็นชนิดสายพันธุ์ย่อย *Cuon alpinus infuscus* ในขณะที่หมาในทั้งสี่ตัวในกรงเลี้ยงของสวนสัตว์เชียงใหม่ไนท์ซาฟารีที่ถูกจัดเป็น haplotype R นั้นคาดว่าจะเป็นหมาในสายพันธุ์ย่อย *Cuon alpinus lepturus* ที่ได้มาจากป่าในสาธารณรัฐประชาชนจีน เนื่องจากมีลำดับเบสในบางส่วนของ cytochrome b และ control region ขนาดความยาว 407 และ 246 bp ตามลำดับ มีความคล้ายคลึงกัน 100% กับลำดับเบสที่ได้จากตัวอย่างเลือดของหมาในในพื้นที่ป่าของสาธารณรัฐประชาชนจีน ที่มีรายงานใน GenBank accession number NC013445 (Zhang and Chen, 2010) ส่วนหมาในที่ถูกจัดเป็น haplotype U นั้นยังไม่มีข้อมูลที่แน่ชัดในการระบุแหล่งที่มาดั้งเดิม และชนิดสายพันธุ์ย่อยของหมาในทั้ง 4 ตัวในกรงเลี้ยงของสวนสัตว์ทั้งสองแห่ง แต่จากสายวิวัฒนาการที่ใกล้เคียงกันกับ haplotype R นั้นทำให้คาดเดาได้ว่า haplotype U อาจจัดอยู่ในชนิดสายพันธุ์ย่อย *Cuon alpinus lepturus* เช่นเดียวกับ R และอาจได้มาจากป่าของสาธารณรัฐประชาชนจีน

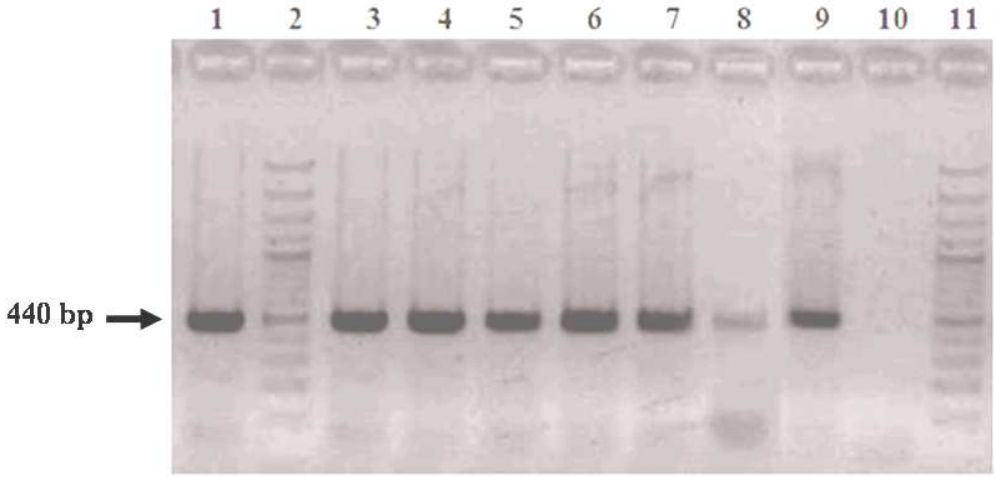
Haplotype T เป็นลำดับเบสที่ได้จากตัวอย่างมูลหมาในในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาอ่างฤาไน ซึ่งพบว่าเป็นกลุ่มใหม่นั้นมีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้เคียงกับ haplotype S ที่ได้จากตัวอย่างมูลหมาในที่พบในอุทยานแห่งชาติของประเทศมาเลเซีย มากกว่า haplotype E และ G ซึ่งถูกวิเคราะห์จากตัวอย่างมูลจำนวน 5 ตัวอย่างที่ได้จากเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูเขียว จังหวัดชัยภูมิ (Iyengar *et al*., 2005) ซึ่งอาจเกิดจากมีการเคลื่อนย้ายของบรรพบุรุษที่มีร่วมกันระหว่างสองพื้นที่ตั้งแต่ในช่วงยุค Pleistocene ที่พื้นที่ที่ในปัจจุบันคือประเทศไทยและมาเลเซียนั้นยังรวมกันเป็นผืนแผ่นดินเดียวกัน เรียกว่า Sunda Shelf (Lekagul and McNeely, 1977) ซึ่งผืนแผนดินในส่วนดังกล่าวยังไม่ถูกแยกออกจากกันโดยการท่วมของน้ำทะเลเหมือนในปัจจุบันและอาจเป็นเพราะยังไม่มีข้อมูลเกี่ยวกับความหลากหลายทางพันธุกรรมของหมาในในพื้นที่ป่าแห่งอื่นของประเทศไทย ทำให้ยังขาดข้อมูลเพื่อใช้ในการจัดกลุ่มของหมาใน ซึ่งหมาในในป่าของประเทศไทยอาจมี haplotype S หรือจุดร่วมของบรรพบุรุษของ haplotype T รวมอยู่ด้วย

ดังนั้นควรมีการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของหมาในในพื้นที่ป่าอื่น ๆ ในประเทศไทยเพิ่มเติม เพื่อให้ได้มาซึ่งแหล่งข้อมูลทางพันธุกรรมเกี่ยวกับความหลากหลายทางพันธุกรรมของหมาในที่ครอบคลุมทั้งประเทศไทย เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานและเพื่อเติมเต็มข้อมูล

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

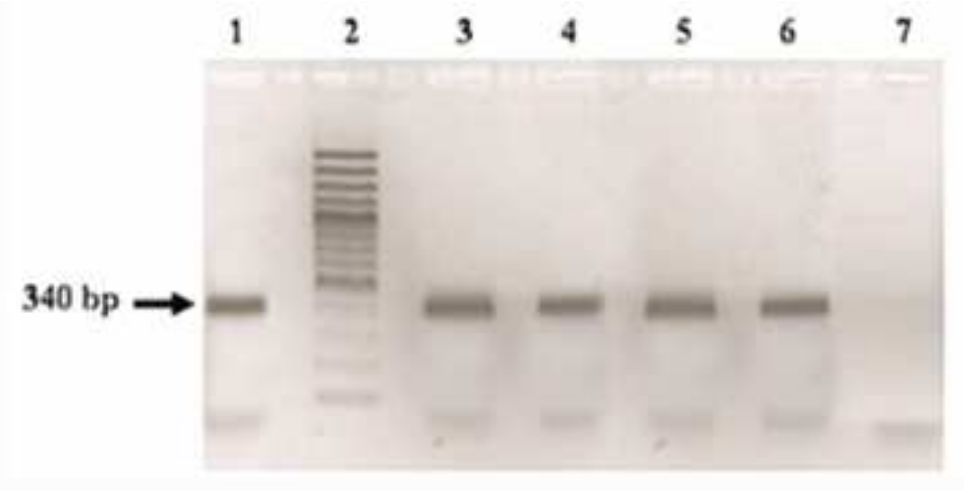
ในด้านความหลากหลายทางพันธุกรรมในส่วนของสายแม่ของหมาใน เพื่อประยุกต์ใช้ร่วมกับข้อมูลทางด้านนิเวศวิทยาและลักษณะการกระจายของหมาในกับสภาพภูมิศาสตร์ สำหรับใช้เป็นข้อมูลในการวางแผน การจัดการอนุรักษ์หมาในต่อไปในอนาคต

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



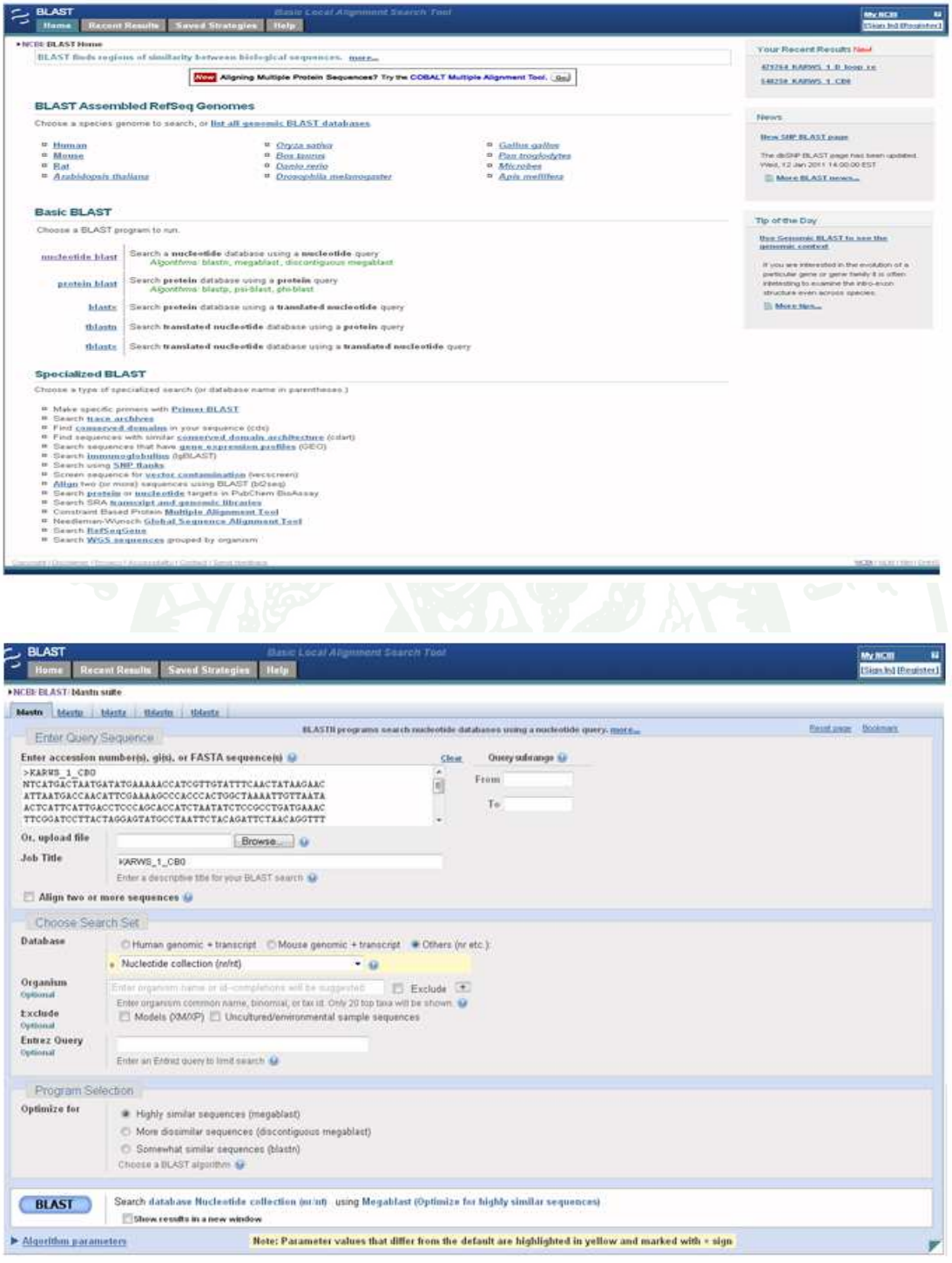
ภาพที่ 9 แสดงแถบผลผลิต PCR ที่ปรากฏเมื่อทดสอบด้วยไพรเมอร์คู่ CB0 และ CB2 ที่จำเพาะต่อบางส่วนของ tRNA-Glu และ cytochrome b บนไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ
ช่องที่ 1 เป็นช่องตัวควบคุมที่เติม DNA template จากเลือดหมาในที่ได้จากกรงเลี้ยง
ช่องที่ 2 และ 11 แสดงตำแหน่งของ Marker
ช่องที่ 3-9 แสดงผลผลิต PCR ขนาด 440 bp
ช่องที่ 10 เป็นช่องของตัวควบคุมที่ไม่เติม DNA template

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



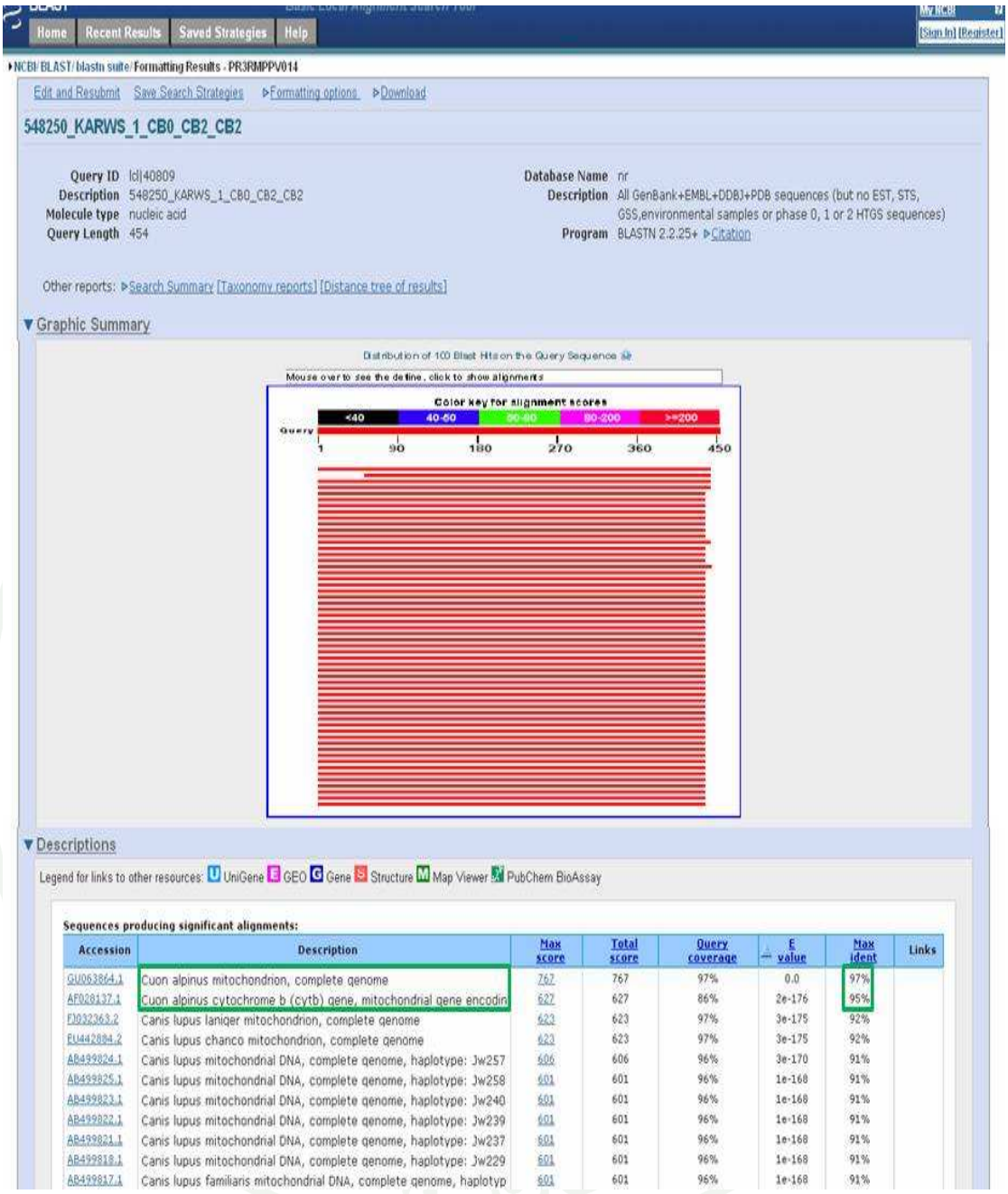
ภาพที่ 10 แสดงแถบผลผลิต PCR ที่ปรากฏเมื่อทดสอบด้วยไพรเมอร์คู่ D-loopFw และ D-loopRe ที่จำเพาะต่อบางส่วนของ tRNA-Pro และ control region บนไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ
ช่องที่ 1 เป็นช่องตัวควบคุมที่เติม DNA template จากเลือดหมาในที่ได้จากกรงเลี้ยง
ช่องที่ 2 แสดงตำแหน่งของ Marker
ช่องที่ 3-6 แสดงผลผลิต PCR ขนาด 340 bp
ช่องที่ 7 เป็นช่องของตัวควบคุมที่ไม่เติม DNA template

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



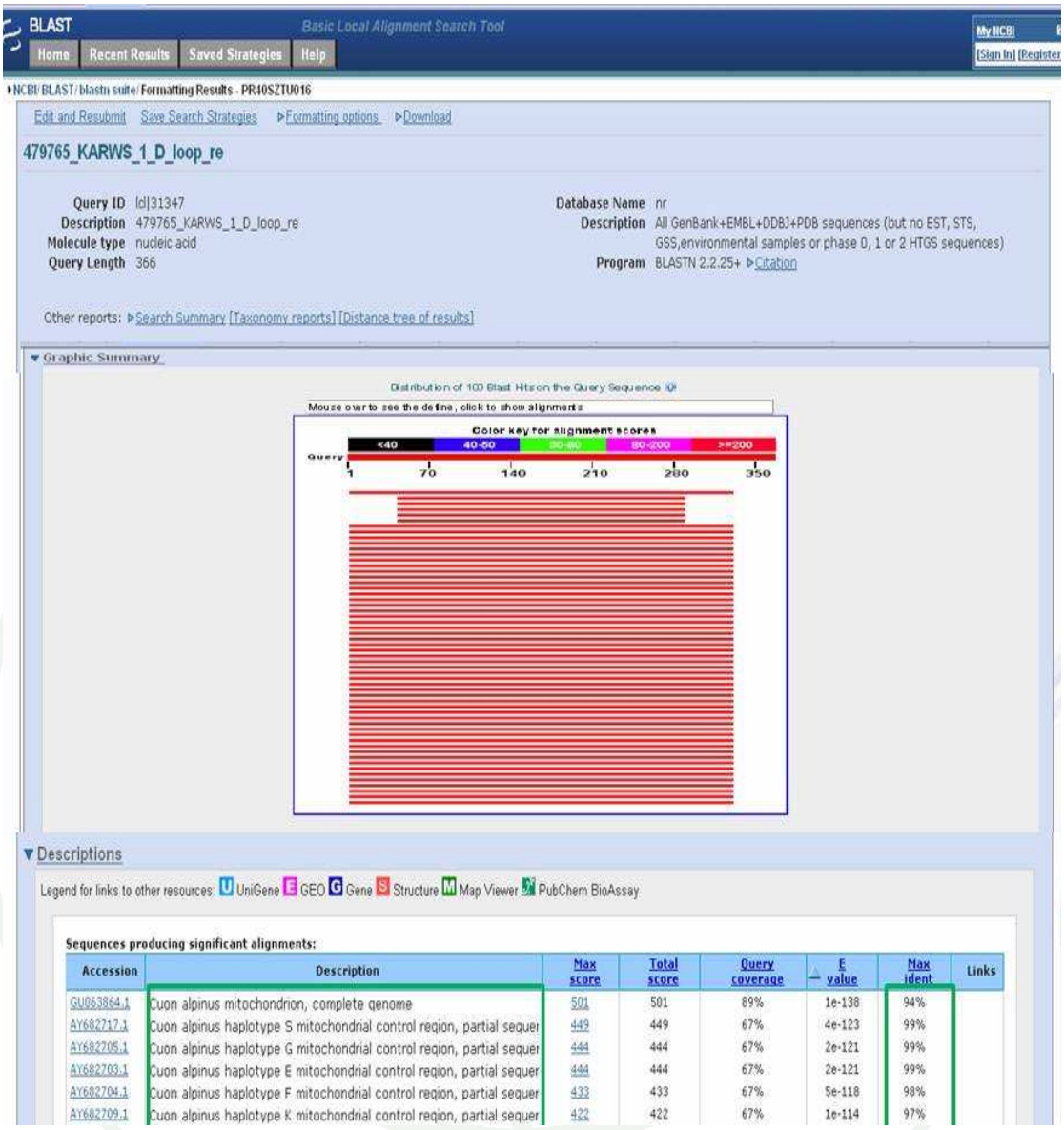
ภาพที่ 11 แสดงการนำลำดับเบสที่ได้หลังจากการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR ได้ผลิตผลในขนาดที่ต้องการและทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ นำมา BLAST ใน GenBank เพื่อตรวจสอบว่าลำดับเบสที่ได้เป็นหมาในจริงหรือไม่ (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastHome)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



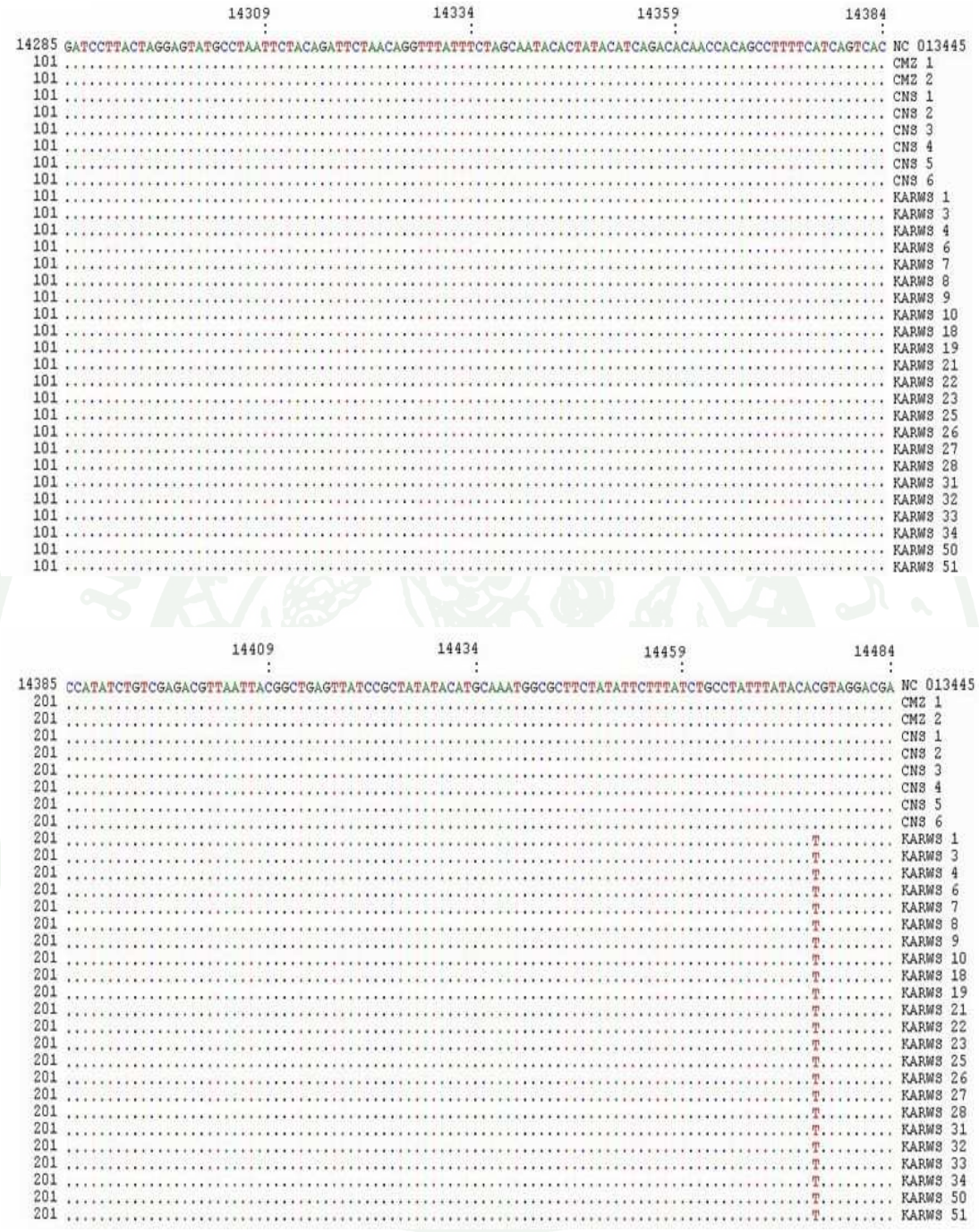
ภาพที่ 12 แสดงผลของนำลำดับเบสในส่วนของ cytochrome b ขนาดประมาณ 440 bp มา BLAST ใน GenBank และตรวจสอบแล้วว่าลำดับเบสที่ได้เป็นหมาในจริง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



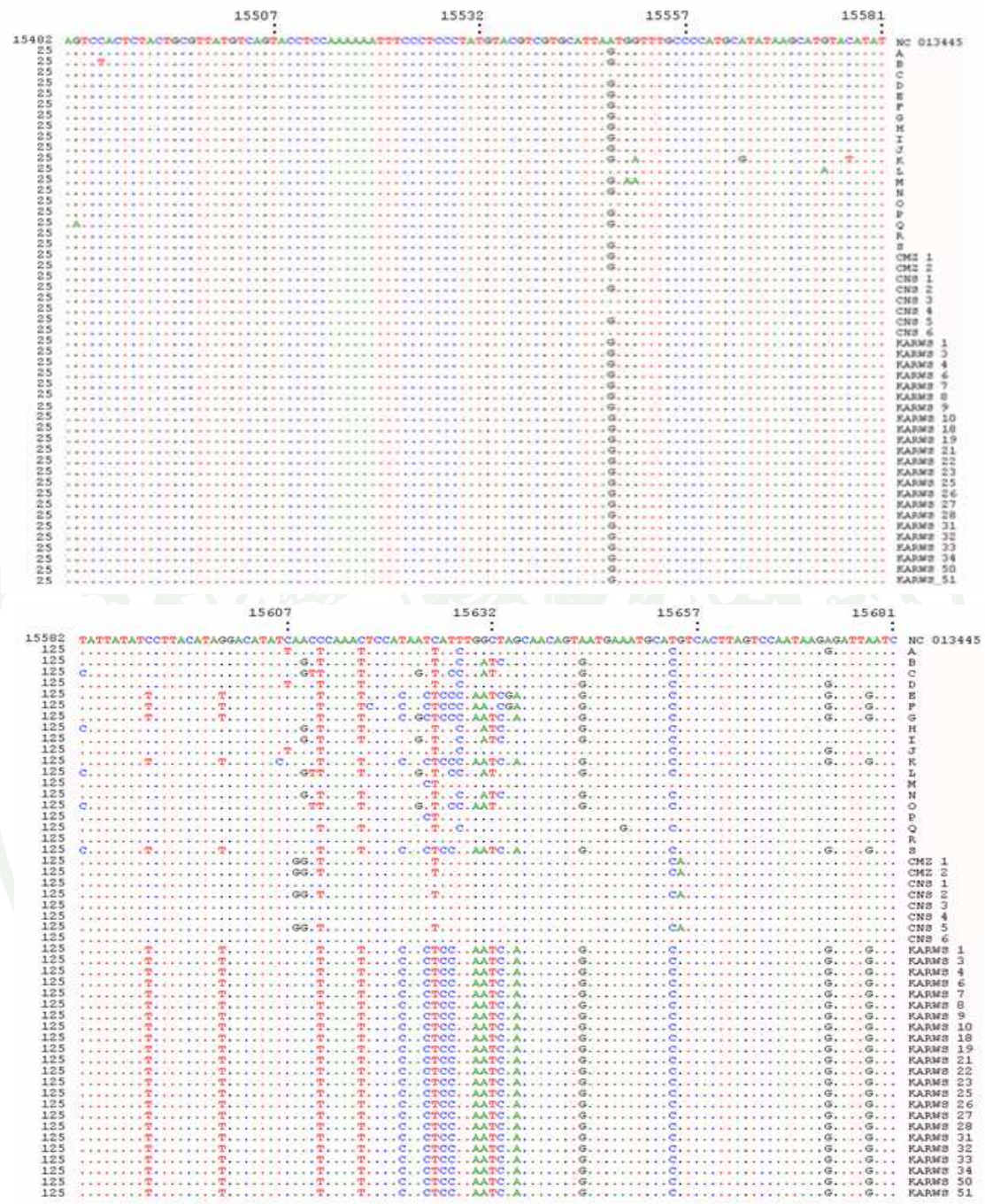
ภาพที่ 13 แสดงผลของนำลำดับเบสในส่วนของ control region ขนาดประมาณ 340 bp มา BLAST ใน GenBank และตรวจสอบแล้วว่าลำดับเบสที่ได้เป็นหมาในจริง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 14 แสดงการเปรียบเทียบลำดับเบสในบางส่วนของ cytochrome b ความยาว 407 bp เพื่อจัดกลุ่ม (haplotype) ของตัวอย่างมูลหมาใน 31 ตัวอย่าง โดยเทียบกับลำดับเบสบนไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของหมาในที่มีรายงานใน GenBank accession number NC013445 (Zhang and Chen, 2010)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 15 แสดงการเปรียบเทียบลำดับเบสในส่วนของ control region ความยาว 246 bp เพื่อจัดกลุ่ม (haplotype) ของตัวอย่างมูลหมาใน 31 ตัวอย่าง โดยเทียบกับลำดับเบสบนไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของหมาในที่มีรายงานใน GenBank accession number NC013445 (Zhang and Chen, 2010) และ haplotype A-S (GenBank accession number AY682699-AY682717) โดย Iyengar *et al*. 2005

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 4 แสดงตำแหน่งเบสที่แตกต่างกันในบางส่วนของ cytochrome b ขนาดความยาว 407 bp บนไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ จากตัวอย่างมูลหมาใน 31 ตัวอย่าง โดยตัวเลขด้านบนจะเทียบกับลำดับเบสของหมาในที่มีรายงานใน GenBank (accession number NC013445) (Zhang and Chen, 2010) ลำดับเบสที่ 1 ของ 407 bp ในการศึกษานี้ตรงกับลำดับที่ 14185 ของ NC013445

Haplotype	Numerical position of nucleotide sequence	Number
	14475	
1	C	CMZ 1, 2, CNS 1, 2, 3, 4, 5, 6
2	T	KARWS (23 samples)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 5 แสดงตำแหน่งเบสที่แตกต่างกันในบางส่วนของ control region ขนาดความยาว 246 bp บนไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ จากตัวอย่างมูลหมาใน 31 ตัวอย่าง โดยตัวเลขด้านบนจะเทียบกับลำดับเบสของหมาในที่มีรายงานใน GenBank accession number NC013445 (Zhang and Chen, 2010) ลำดับเบสที่ 1 ของ 246 bp ในการศึกษานี้ตรงกับลำดับที่ 15458 ของ NC013445 และสัญลักษณ์ (.) แทนลำดับเบสที่เหมือนกับเบสด้านบน

Haplotype	Numerical position of nucleotide sequence 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 4 9 9 0 0 1 1 2 2 2 2 2 3 3 3 3 3 4 5 5 7 7 8 0 9 8 9 1 6 1 4 5 6 7 0 1 2 3 5 3 4 5 3 8	Number
R	A C G A A C C T T C A T G G C T G A T G A A	CNS 1, 3, 4, 6
U	G . . G G T . . . T . . . . C A . .	CMZ 1, 2, CNS 2, 5
T	G T T . . T T C C T C C A A T C A G C . G G	KARWS (23 samples)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 6 แสดงข้อมูลของหมาในทั้ง 8 ตัวในกรงเลี้ยงและ haplotype ที่พบในการศึกษาครั้งนี้

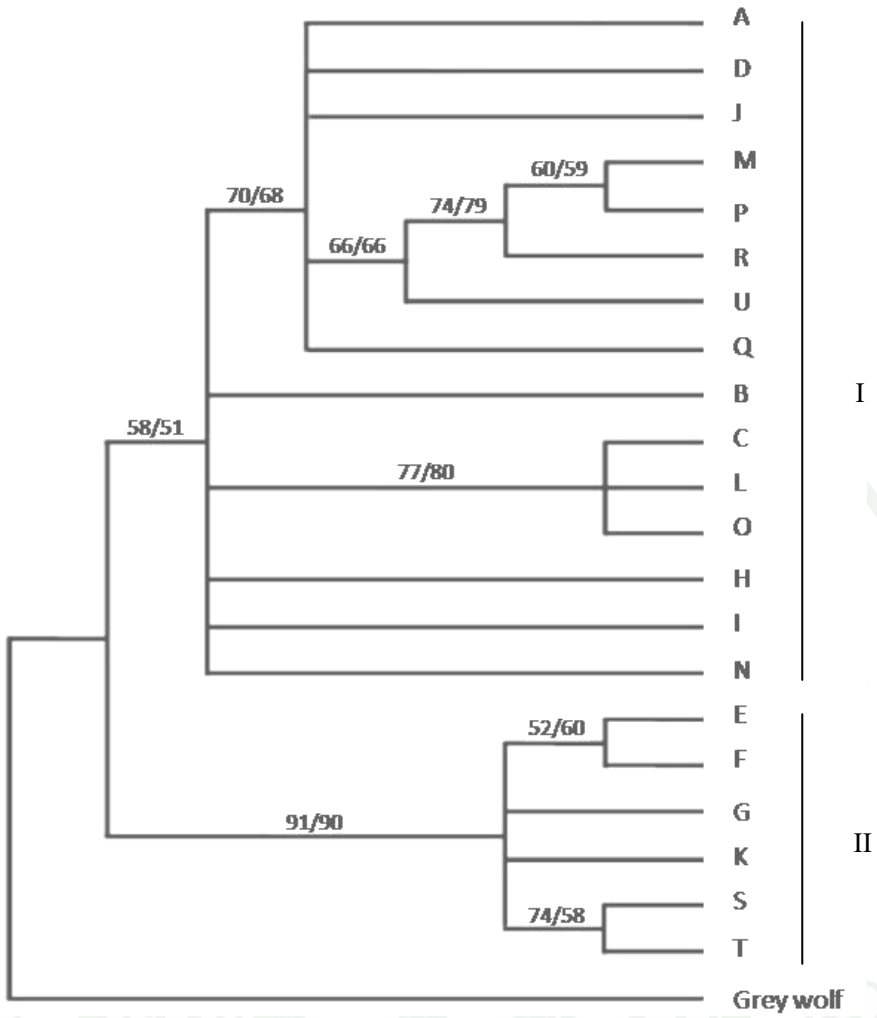
Sample number	Age	Gender	Source	Haplotype	
				Cytochrome b 407 bp	Control region 246 bp
CMZ 1	8 years	male	Chiang Mai Zoo	1	U
CMZ 2	8 years	male	Chiang Mai Zoo	1	U
CNS 1	6 years	female	Chiang Mai Night Safari	1	R
CNS 2	8 years	male	Chiang Mai Night Safari	1	U
CNS 3	6 years	female	Chiang Mai Night Safari	1	R
CNS 4	6 years	male	Chiang Mai Night Safari	1	R
CNS 5	8 years	female	Chiang Mai Night Safari	1	U
CNS 6	2 years	female	Chiang Mai Night Safari	1	R

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 7 แสดงค่า Pairwise distance ของลำดับเบสในบางส่วนของ control region บนไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอของหมาใน (*Cuon alpinus*) โดย 1. หมาใน (Accession number NC013445) 2. Haplotype R (Accession number AY682716 and in this study) 3. Haplotype U (in this study) 4. Haplotye T (in this study)

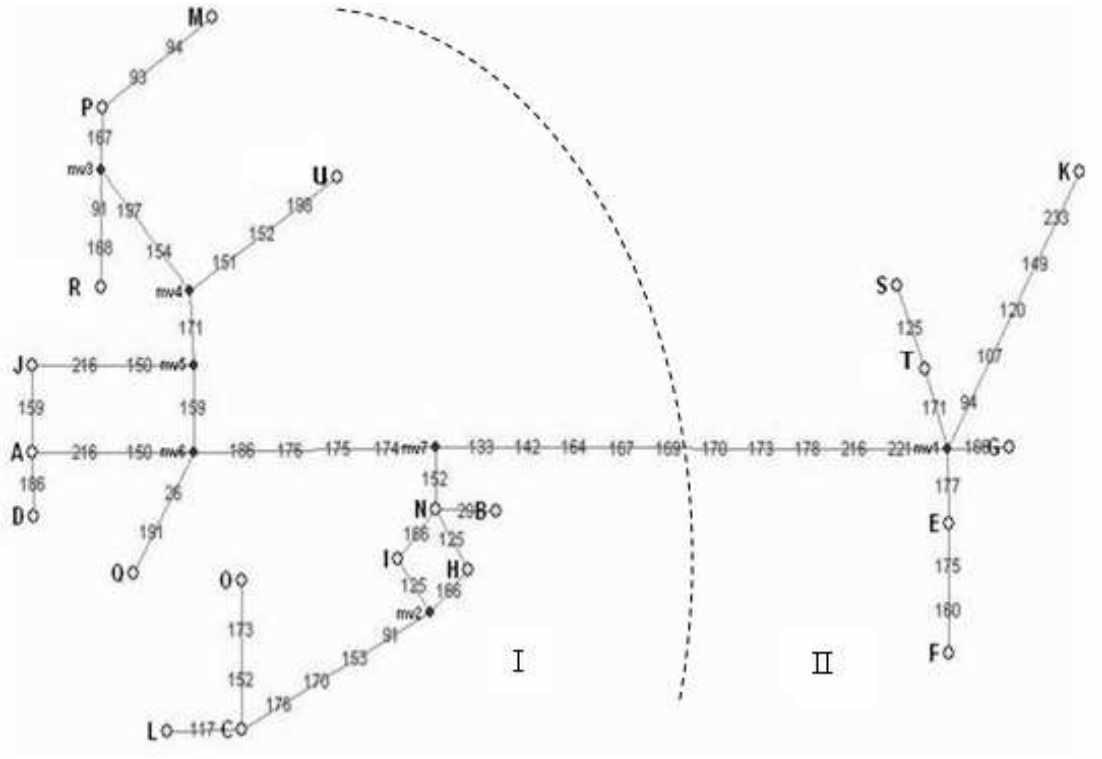
	1	2	3	4
1				
2	0.000			
3	0.029	0.029		
4	0.084	0.084	0.079	

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 16 แสดง Phylogenetic tree บางส่วนของ cytochrome b และ control region บนไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ ด้วยวิธี Maximum Likelihood (ML) และ Maximum Parsimony (MP) ร่วมกับการทดสอบความน่าเชื่อถือของ tree ด้วย Bootstrap 1,000 รอบ เปรียบเทียบระหว่าง หมาใน (*Cuon alpinus*) haplotype A-S (accession number AY682699-AY682717) โดย Iyengar *et al*. (2005) หมาใน haplotype T (in this study) และ haplotype U (in this study) โดยมีหมาป่าสีเทา (Grey wolf; *Canis lupus*) เป็นสัตว์นอกกลุ่ม (outgroup) โดยตัวเลขที่แสดงเป็นตัวเลขที่สนับสนุนการแยกสายวิวัฒนาการออกจากจุดที่มีการเปลี่ยนแปลง (node) ร่วมกันจากการทำ Bootstrap 1,000 รอบ โดยตัวเลขด้านซ้ายเป็นของวิธี ML และด้านขวาเป็นของวิธี MP

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 17 แสดงเครือข่าย (Median-joining network) ของหมาใน จากการศึกษาในบางส่วนของ control region ความยาว 246 bp บนไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของทั้ง 3 กลุ่ม (haplotype) (R, T และ U) ที่พบจากการศึกษาในตัวอย่างมูลหมาใน 31 ตัวอย่าง เปรียบเทียบกับ haplotype A-S (accession number AY682699-AY682717) โดย Iyengar *et al*. (2005) สัญลักษณ์ (○) แทนกลุ่ม haplotype (●) แทนข้อมูลที่ขาดหายไปและตัวเลขแทนตำแหน่งของลำดับเบสที่แตกต่างกัน (variable sites)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

1. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของลำดับเบสบนไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอในหมาใน จากการใช้ตัวอย่างมูลทั้งหมด 59 ตัวอย่าง สามารถสกัดดีเอ็นเอ เพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR ทำให้บริสุทธิ์ นำมาหาลำดับเบส และผลของลำดับเบสที่ได้เมื่อ BLAST กับฐานข้อมูลใน GenBank แล้วผลเป็นหมาในจริงนั้นได้ทั้งหมด 31 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละความสำเร็จเท่ากับ 52.54 แบ่งเป็นตัวอย่างมูลจากหมาในในสวนสัตว์เชียงใหม่จำนวน 2 ตัวอย่างและสวนสัตว์เชียงใหม่ไนท์ซาฟารีจำนวน 6 ตัวอย่าง โดยทั้ง 8 ตัวอย่างสามารถเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอได้ทั้งหมด คิดเป็นร้อยละความสำเร็จเท่ากับ 100 และตัวอย่างมูล 51 ตัวอย่างจากเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาอ่างฤาไน โดยมีตัวอย่างมูล 23 ตัวอย่างที่สามารถเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอ และเมื่อเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank แล้วเป็นหมาในจริง คิดเป็นร้อยละความสำเร็จเท่ากับ 45.1 ส่วนอีก 28 ตัวอย่างมี 2 ตัวอย่างที่สามารถถูกเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ D-loopFw และ D-loopReโดยวิธี PCR ได้แต่ได้ผลผลิต 422 bp ซึ่งมีขนาดความยาวที่มากกว่าที่ต้องการคือ 340 bp สำหรับหมาในและเมื่อ BLAST ใน GenBank พบว่าลำดับเบสที่ได้ตรงกับกระจงเล็ก (*Tragulus javanicus*) ข้อมูลที่ได้สามารถบอกชนิดเหยื่อของหมาในในพื้นป่าได้ ซึ่งเป็นประโยชน์ในการศึกษาทางนิเวศวิทยาของหมาในต่อไป

2. การหาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยการศึกษาลำดับเบสบนไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอใน 2 บริเวณคือ บริเวณแรกเป็นการศึกษาในบางส่วนของ 5’ end cytochrome b ขนาดความยาว 407 bp สามารถจัดกลุ่ม (haplotype) ได้ 2 กลุ่มคือ 1: CMZ 1, 2, CNS 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 2: KARWS ทั้ง 23 ตัวอย่าง มีความแตกต่างของลำดับเบส 1 ตำแหน่ง และบริเวณที่สองเป็นการศึกษาในบางส่วนของ control region ขนาดความยาว 246 bp สามารถจัดกลุ่ม (haplotype) ได้ 3 กลุ่มคือ R: CNS 1, 3, 4, 6, U: CMZ 1, 2, CNS 2, 5 และ T: KARWS ทั้ง 23 ตัวอย่าง โดยมีความแตกต่างของลำดับเบสทั้งสิ้น 22 ตำแหน่ง โดย haplotype T และ U เป็นกลุ่มใหม่ที่พบในการศึกษาครั้งนี้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ข้อเสนอแนะ

1. การใช้ดีเอ็นเอจากมูลเป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมนั้นเป็นที่นิยมมากโดยเฉพาะกับการศึกษาในสัตว์ป่า เนื่องจากเป็นวิธีที่ไม่รบกวนสัตว์และไม่ต้องเผชิญหน้ากับสัตว์โดยตรง แต่ดีเอ็นเอที่ได้จากมูลนั้นมีคุณภาพต่ำและมีปริมาณน้อย เนื่องจากปัจจัยของสภาพแวดล้อมที่พบตัวอย่างทั้งความชื้น การส่องถึงของแสงแดด การปะปนของขนและกระดูกของเหยื่อในมูล รวมทั้งฤดูกาลที่ทำการเก็บตัวอย่าง วิธีการเก็บรักษามูลและวิธีการสกัดดีเอ็นเอ ซึ่งล้วนส่งผลต่อคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอในมูล ดังนั้นควรมีการศึกษาเปรียบเทียบฤดูกาลในการลงพื้นที่เก็บตัวอย่าง รวมทั้งวิธีการและระยะเวลาของการเก็บรักษาตัวอย่างมูลหมาในเพื่อเป็นข้อมูลที่สำคัญในการคำนึงถึงเมื่อวางแผนเก็บตัวอย่างในครั้งต่อไป ด้วยคุณภาพของดีเอ็นเอที่ได้จากมูลมีคุณภาพค่อนข้างต่ำ ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะและให้ผลผลิต PCR ขนาดความยาวไม่มากนักคือ 440 และ 340 bp สำหรับ cytochrome b และ control region ตามลำดับ เพื่อความสะดวกในการเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการและลดการเกิดผลผลิต PCR ที่ไม่จำเพาะลงได้ ซึ่งถือเป็นการออกแบบที่เหมาะสมสำหรับดีเอ็นเอที่ได้จากมูล

2. จากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของหมาในในกรงเลี้ยงเมื่อพิจารณาในส่วนของลำดับเบสในส่วนของ cytochrome b เป็น haplotype 1 นั้นสามารถบอกได้ว่าหมาในที่ได้รับมาจากประเทศเนเธอร์แลนด์นั้นไม่ใช่หมาในที่มาจากป่าดั้งเดิมของประเทศไทยและไม่ได้มาจากแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ด้วยและตามรูปแบบความหลากหลายของลำดับเบสในส่วน control region ความยาว 246 bp พบรูปแบบทางพันธุกรรมสายแม่ทั้งหมด 2 กลุ่ม (haplotype) คือ haplotype R และ U จากข้อมูลการทำต้นไม้วงศ์วานเครือทางวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ทั้งสองกลุ่มมีวิวัฒนาการใกล้เคียงกันโดยกลุ่ม U ถูกจัดอยู่รวมกับ R ซึ่งมีค่า bootstrap เท่ากับ 66 แสดงว่ามีความน่าเชื่อถือ หรือความเป็นไปได้ที่ U จะอยู่รวมกลุ่มกับ R ในระดับปานกลาง ซึ่งคาดว่าทั้งสองกลุ่มจะมาจากป่าดั้งเดิมในสาธารณรัฐประชาชนจีน และเป็นชนิดย่อย *Cuon alpinus lepturus* เช่นเดียวกัน ดังนั้นจึงควรมีการวางแผนจัดการผสมพันธุ์ระหว่างหมาในสองกลุ่มนี้ เพื่อเพิ่มความหลากหลายทางพันธุกรรม และลดโอกาสการเกิดปัญหาการผสมเลือดชิด (inbreeding) ของหมาในในกรงเลี้ยงต่อไป

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3. ตัวอย่างมูลหมาในทั้ง 23 ตัวอย่างจากพื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาอ่างฤาไน จากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในบางส่วนของ control region พบว่าเป็น haplotype T ทั้งหมด อาจเนื่องจากพื้นที่ป่าของเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาอ่างฤาไนเคยถูกบุกรุกมาก่อนโดยชาวบ้านซึ่งส่งผลให้สัตว์ป่าหลายชนิดลดจำนวนลงอย่างรวดเร็วจนเหลือเป็นประชากรกลุ่มเล็ก ๆ ซึ่งรวมทั้งการลดลงของความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) ด้วย ในเวลาต่อมาพื้นป่าแห่งนี้ได้ถูกประกาศให้เป็นเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่า ทำให้ประชากรสัตว์ป่ากลุ่มเล็ก ๆ ที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำที่มีชีวิตเหลือรอดมานั้นเพิ่มจำนวนมากขึ้น เกิดเป็นปรากฏการณ์คอขวด (bottleneck) คือการเพิ่มของจำนวนประชากรที่มากขึ้นโดยการสืบเชื้อสายมาจากบรรพบุรุษสายแม่ (maternal lineage) เดียวกัน อีกทั้งปัญหาที่พื้นป่าของไทยถูกตัดแบ่งเป็นหย่อม ๆ ทำให้ผืนป่าไม่มีอาณาเขตติดต่อกันและยังถูกล้อมรอบด้วยชุมชน ส่งผลทำให้โอกาสในการแลกเปลี่ยนทางพันธุกรรมลดลง ซึ่งมีโอกาสสูงที่หมาในในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาอ่างฤาไนจะเผชิญกับปัญหาที่เกิดจากการผสมเลือดชิดและมีความเสี่ยงสูงที่จะสูญพันธุ์ในอนาคต ดังนั้นควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับความหลากหลายทางพันธุกรรมของหมาในในพื้นที่ป่าแห่งอื่น เพื่อการวางแผนเคลื่อนย้าย (translocation) หมาในชนิดพันธุ์ย่อย *Cuon alpinus infuscus* ซึ่งเป็นพันธุ์ดั้งเดิมในป่าของไทยจากพื้นที่ป่าแห่งอื่นของประเทศที่มี haplotype ต่างกันมาอยู่ในพื้นที่ป่าเดียวกันเพื่อเพิ่มความหลากหลายทางพันธุกรรม

สำหรับการศึกษาในพื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาอ่างฤาไนครั้งนี้ มีพื้นที่บางส่วนที่ไม่สามารถเข้าไปทำการสำรวจและเก็บตัวอย่างได้ ซึ่งอาจมีฝูงหมาในอาศัยอยู่และอาจเป็นกลุ่มที่มาจากบรรพบุรุษสายแม่สายอื่นนอกเหนือจาก haplotype T ดังนั้นควรมีการสำรวจเพิ่มเติมให้ครอบคลุมทั้งพื้นที่ป่า และควรมีการศึกษาเพิ่มเติมด้วยวิธีอื่น ๆ เช่น วิธีการหาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ (microsatellite marker) เพื่อระบุว่ามูลที่ได้มาจากหมาในทั้ง 23 ตัวอย่างมาจากหมาในทั้งหมดกี่ตัว เพราะมีความเป็นไปได้ว่าในบางตัวอย่างมูลที่เก็บได้นั้นอาจจะมาจากหมาในตัวเดียวกัน และควรมีการจำแนกเพศ (sex identification) จากดีเอ็นเอที่ได้จากมูลเพื่อหาสัดส่วนเพศของประชากรหมาในในพื้นที่ป่าด้วย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพันธุ์พืช. 2553. **เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาอ่างฤาไน**, ฉะเชิงเทรา. (อัดสำเนา)

_____. 2553. **แผนที่แสดงแนวเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่า.** แหล่งที่มา: http://ims.dnp.go.th/smallthai_wls_map.htm, 1 ธันวาคม 2553.

กัลยาณี สวรรยาวิสุทธิ์. 2551. พันธุศาสตร์เชิงชีวเคมี, น. 82-123. *ใน* เตือนจิต คำพิทักษ์, บรรณาธิการ. **ตำราพันธุศาสตร์ทางการแพทย์.** ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.

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

จารุวรรณ คนมี. 2553. **สรีรวิทยาระบบสืบพันธุ์ของหมาใน (*Cuon alpinus*) เพศเมียที่เลี้ยงอยู่ในกรงเลี้ยง จังหวัดเชียงใหม่.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

พัชรีย์ เลิศฤทธิ์. 2549. จีโนมไมโทคอนเดรีย, น. 27-45. *ใน* พัชรีย์ เลิศฤทธิ์, บรรณาธิการ. **ตำราพันธุกรรมของยีนไมโทคอนเดรียในประเทศไทย.** มิสเตอร์กอปปี้, กรุงเทพฯ.

มานะกร สุขมาก. 2553. **ความหลากหลายทางพันธุกรรมบนโครโมโซมวายในละมั่งชนิดย่อยไทย.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วรวีร์ ไวยวุฒิ. 2545. ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ กับการศึกษานิติเวชวิทยา, น. 199-209. *ใน* พัชรีย์ เลิศฤทธิ์, บรรณาธิการ. **ตำราพันธุกรรมของยีนไมโทคอนเดรียในประเทศไทย.** มิสเตอร์กอปปี้, กรุงเทพฯ.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วัลลภ ชุติพงศ์, นฤมล ตันติพิษณุ, ดุสิต งอประเสริฐ, A.J Lynam, ลองราภ สุขมาสรวง, K. Jenks, J.G. Howard, L. Greesman, P. Cutter, R. Steinmetz, นริศ ภูมิภาคพันธ์, G.A. Gale, D.H. Reed, ยงยุทธ ไตรสุรัตน์, วิจักขณ์ ฉิมโฉม และ W. Duckworth. 2553. สถานภาพและการแพร่กระจายของสัตว์ผู้ล่าขนาดเล็ก ในประเทศไทย, น. 1-5. *ใน* **การประชุมวิชาการประจำปีโครงการ BRT ครั้งที่ 14.** โครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย, จังหวัดอุบลราชธานี.

เสมอชัย พูลสุวรรณ และ พัชรีย์ เลิศฤทธิ์. 2545. ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ กับการศึกษาวิวัฒนาการของมนุษย์, น. 211-244. *ใน* พัชรีย์ เลิศฤทธิ์, บรรณาธิการ. **ตำราพันธุกรรมของยีนไมโทคอนเดรียในประเทศไทย.** มิสเตอร์กอปปี้, กรุงเทพฯ.

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

_____. 2552. **เครื่องหมายดีเอ็นเอ: จากพื้นฐานสู่การประยุกต์.** สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts and J.D. Watson. 1983. The Biogenesis of mitochondria and chloroplasts, pp. 528-544. *In* **Molecular Biology of The Cell.** Garland Publishing, Inc., New York, USA.

Amos, W. and A. Balmford. 2001. When dose conservation genetics matter?. **Hered.** 87: 257-265.

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

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Bradshaw, C.J.A., Y. Isagi, S. Kaneko, B. Brook, D.M.J.S. Bowman and R. Frankham. 2007. Low genetic diversity in the bottlenecked population of endangered non-native banteng in northern Australia. **Mol. Ecol.** 16 (14): 2998-3008.

Brown, W.M. 1980. Polymorphism in mitochondrial DNA of humans as revealed by restriction endonuclease analysis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 77 (6): 3605-3609.

_____, M. George, J.R. and A.C. Wilson. 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 76 (4): 1967-1971.

CITES. 2010. ***Cuon alpinus***. The CITES Appendices II. Available Source: http://www.cites.org/eng/app/index.shtml, November 18, 2010.

Cosson, L., L.L. Grassman, A. Zubaid, S. Vellayan, A. Tillier and G. Veron. 2006. Genetic diversity of captive binturongs (*Arctictis binturong*, Viverridae, Carnivora): implications for conservation. **J. Zool.** 271 (4): 386-395.

Durbin, L., A. Vankataraman, S. Hedges and J.W. Duckworth. 2004. Dhole (*Cuon alpinus*), pp. 210-219. *In* C. Sillero-Zubiri, M. Hoffman and D.W. Macdonald, eds. **Status Survery and Conservation Action Plan. Canids: foxes, wolves, jackals and dogs.** IUCN/SCC Canid Specialist Group, Gland, Switzerland and Cambridge, UK.

Frankham, R. 2005. Genetics and extinction. **Biol. Conserv.** 126: 131-140.

_____. 2007. Genetic adaptation to captivity in species conservation programs. **Mol. Ecol.** 17: 325-333.

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.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Hall, T.A. 1999. BIOEDIT: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symp. Ser.** 41: 95-98.

Khan, H.A., I.A. Arif, A.H. Al Farhan and A.A. Al Homaidan. 2008. Phylogenetic analysis of oryx species using partial sequences of mitochondrial rRNA genes. **Genet. Mol. Res.** 7 (4): 1150-1155.

Kim, K.S., S.E. Lee, H.W. Jeong and J.H. Ha. 1998. The complete nucleotide sequences of the domestic dog (*Canis familiaris*) mitochondrial genome. **Mol. Phylo. Evol.** 10 (2): 210-220.

Lekagul, B. and J.A. McNeely. 1977. **Mammals of Thailand.** Kurusapha Ladprao Press, Thailand.

Melanie, A.M., L.P. Waits and K.C. Kendall. 2003. The influence of diet on faecal DNA amplification and sex identification in brown bears (*Ursus arctos*). **Mol. Ecol.** 12: 2261-2265.

_____ , _____ , _____ and S.K. Wasser. 2002. An evaluation of long-term preservation methods for brown bear (*Ursus arctos*) faecal DNA samples. **Conserv. Genet.** 3 (4): 435-440.

IUCN. 2009. ***Cuon alpinus***. The IUCN Red List of Threatened Species. Available Source: http://www.iucnredlist.org, November 16, 2010.

Iyengar, A., V.N. Babu, S. Hedges, A.B. Venkataraman , N. Maclean and P.A. Morin. 2005. Phylogeography, genetic structure, and diversity in the dhole (*Cuon alpinus*). **Mol. Ecol.** 14 (8): 2281-2297.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

O'Brien, S.J. 1994. A role for molecular genetics in biological conservation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 91 (13): 5748-5755.

Robert, A. 2009. Captive breeding genetics and reintroduction success. **Biol. Conserv.** 142 (12): 2915-2922.

Stenglein, J.L., M. De Barba, D.E. Ausband and L.P. Waits. 2010. Impacts of sampling location within a faeces on DNA quality in two carnivore species. **Mol. Ecol. Resour.** 10: 109-114.

Swafford, D.L. 2002. PAUP: **Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods)**, version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusettes.

Tamura, K., J. Dudley, M. Nei and S. Kumar. 2007. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis software version 4.0.2. **Mol. Biol. Evol.** 24 (8): 1596-1599.

WAZA. 2010. ***Cuon alpinus.*** The zoological records database. Available Source: http://www.waza.org, November 20, 2010.

Zhang, H. and L. Chen. 2010. The complete mitochondrial genome of dhole *Cuon alpinus*: phylogenetic analysis and dating evolutionary divergence within canidae. **Mol. Biol. Rep.** 38 (3): 1651-1660.

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

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก ก

สารเคมี

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1. TE buffer

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

2. 50X TA buffer

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

3. 1.5% agarose

- Agarose gel 1.5 g
-1X TA 100 ml

4. Loading dye

- 25% Bromphenol blue
- 30% glycerol

5. Lysis buffer (L1)

- 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

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

6. Wash buffer (L2)

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

7. 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

8. DETs buffer

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

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก ข

แสดงตำแหน่งพิกัดของตัวอย่างมูลและตำแหน่งกล้องดักถ่ายภาพสัตว์ในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาอ่างฤาไน จังหวัดฉะเชิงเทราและวัน เดือน ปีที่ทำการเก็บตัวอย่างและบันทึกภาพถ่าย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ข1 ตารางแสดงตำแหน่งพิกัดของตัวอย่างมูลที่พบในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาอ่างฤาไน จังหวัดฉะเชิงเทราและวัน เดือน ปีที่ทำการเก็บตัวอย่าง

ตัวอย่าง	วัน เดือน ปี	พิกัด	
		X	Y
KARWS 1-3	23 มกราคม 2552	47P 0813631	UTM 1484119
KARWS 4-6	14 ตุลาคม 2552	47P 0815290	UTM 1479718
KARWS 7	14 ตุลาคม 2552	47P 0815288	UTM 1479682
KARWS 8-9	15 ตุลาคม 2552	47P 0815722	UTM 1478155
KARWS 10	20 ตุลาคม 2552	47P 0821374	UTM 1481443
KARWS 11	20 ตุลาคม 2552	47P 0821357	UTM 1481458
KARWS 12	20 ตุลาคม 2552	47P 0820457	UTM 1481889
KARWS 13	20 ตุลาคม 2552	47P 0820344	UTM 1481844
KARWS 14-16	3 พฤศจิกายน 2552	47P 0807716	UTM 1488745
KARWS 17	3 พฤศจิกายน 2552	47P 0807548	UTM 1488551
KARWS 18	3 พฤศจิกายน 2552	47P 0807550	UTM 1488497
KARWS 19-26	24 พฤศจิกายน 2552	47P 0813209	UTM 1484012
KARWS 27-29	2 มกราคม 2553	47P 0797960	UTM 1471206
KARWS 30	2 มกราคม 2553	47P 0798098	UTM 1470962
KARWS 31-34	2 มกราคม 2553	47P 0795832	UTM 1462935
KARWS 35-38	2 มกราคม 2553	47P 0796380	UTM 1461939
KARWS 39-42	2 มกราคม 2553	47P 0796629	UTM 1461232
KARWS 43	2 มกราคม 2553	47P 0796368	UTM 1460116
KARWS 44-49	2 มกราคม 2553	47P 0796759	UTM 1460545
KARWS 50	4 มิถุนายน 2553	-	-
KARWS 51	4 มิถุนายน 2553	-	-

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ข2 ตารางแสดงตำแหน่งพิกัดของกล้องดักถ่ายภาพสัตว์ที่สามารถถ่ายภาพหมาใน ในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาอ่างฤาไน จังหวัดฉะเชิงเทราและวัน เดือน ปีที่ภาพถ่ายถูกบันทึก

กล้อง	วัน เดือน ปี	พิกัด	
		X	Y
M2B	10 ธันวาคม 2551	47P 0811843	UTM 1483927
M10	12 ธันวาคม 2551	47P 0812927	UTM 1483969
M2B	17 ธันวาคม 2551	47P 0812420	UTM 1485922
M1B	5 กุมภาพันธ์ 2552	47P 0811905	UTM 1483016
M9	5 กุมภาพันธ์ 2552	47P 0812976	UTM 1483146
M1B	27 กุมภาพันธ์ 2552	47P 0811905	UTM 1483016
M1B	7 พฤษภาคม 2552	47P 0811905	UTM 1483016
dhole	11 มิถุนายน 2552	47P 0812937	UTM 1485148
OZ	11 มิถุนายน 2552	47P 0812937	UTM 1485148
OX	12 มิถุนายน 2552	47P 0812947	UTM 1485136
OZ	13 มิถุนายน 2552	47P 0812955	UTM 1485122
dhole	13 มิถุนายน 2552	47P 0812971	UTM 1485113
dhole	17 มิถุนายน 2552	47P 0812971	UTM 1485113
M11	1 สิงหาคม 2552	47P 0802456	UTM 1478825
M8	2 กันยายน 2552	47P 0812971	UTM 1485113
M8	16 กันยายน 2552	47P 0812971	UTM 1485113
M16	18 กันยายน 2552	47P 0814094	UTM 1483231
M6	12 ตุลาคม 2552	47P 0813363	UTM 1485053
M1B	13 ตุลาคม 2552	47P 0812335	UTM 1485938
M16	13 ตุลาคม 2552	47P 0814094	UTM 1483231
M9	21 ตุลาคม 2552	47P 0814869	UTM 1482015
M12	21 ตุลาคม 2552	47P 0813596	UTM 1484038
M14	21 ตุลาคม 2552	47P 0813785	UTM 1484157
M10	22 ตุลาคม 2552	47P 0807427	UTM 1489100
M1B	2 ธันวาคม 2552	47P 0812335	UTM 1485938

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ข2 (ต่อ)

กล้อง	วัน เดือน ปี	พิกัด	
		X	Y
M9	2 ธันวาคม 2552	47P 0814869	UTM 1482015
M16	2 ธันวาคม 2552	47P 0814094	UTM 1483231
M10	2 ธันวาคม 2552	47P 0807427	UTM 1489100
M12	2 ธันวาคม 2552	47P 0813596	UTM 1484038
M16	12 ธันวาคม 2552	47P 0814094	UTM 1483231
M12	17 ธันวาคม 2552	47P 0813596	UTM 1484038
M20	28 ธันวาคม 2552	47P 0798761	UTM 1468698
M9B	28 ธันวาคม 2552	47P 0798458	UTM 1468937
M10	30 ธันวาคม 2552	47P 0807427	UTM 1489100
M9	2 กุมภาพันธ์ 2553	47P 0814869	UTM 1482015
M16	2 กุมภาพันธ์ 2553	47P 0814094	UTM 1483231
M9B	5 กุมภาพันธ์ 2553	47P 0798458	UTM 1468937
M9	7 กุมภาพันธ์ 2553	47P 0814869	UTM 1482015
M1B	22 มีนาคม 2553	47P 0812335	UTM 1485938
M17	22 มีนาคม 2553	47P 0812971	UTM 1485113
M21	12 เมษายน 2553	47P 0807513	UTM 1485869
M9B	24 เมษายน 2553	47P 0808920	UTM 1477437
M9	26 เมษายน 2553	47P 0814523	UTM 1482322
M8	26 เมษายน 2553	47P 0812495	UTM 1484303
M1B	26 เมษายน 2553	47P 0812761	UTM 1486226
M12	24 พฤษภาคม 2553	47P 0813251	UTM 1484416
M9	24 พฤษภาคม 2553	47P 0814523	UTM 1482322
M1B	24 พฤษภาคม 2553	47P 0812761	UTM 1486226

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก ค

วิธีการทดลอง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ส่วนประกอบในการทำ PCR

ตารางผนวกที่ ค1 ตารางแสดงองค์ประกอบของสารละลายในปฏิกิริยา PCR ในการศึกษาความหลากหลายบนไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ

ส่วนประกอบ	ปริมาณ (µl)	ความเข้มข้นสุดท้าย
น้ำที่ผ่านการ autoclave	20.25	-
10X $(NH_4)_2SO_4$ buffer	3	-
50mM $MgCl_2$	2.4	1-4 mM
10mM dNTP	0.6	0.2 mM
Primer Forward	0.3	0.1-1 µM
Primer Reverse	0.3	0.1-1 µM
Taq DNA polymerase	0.15	1.25 u
DNA template	3	10 pg – 1 µg

แสดงองค์ประกอบของสารละลายในการทำ PCR ในการศึกษาความหลากหลายของลำดับเบสบนไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอต่อ 1 ปฏิกิริยา (30 µl)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก ง

สัญลักษณ์ที่ใช้แทนลำดับเบส

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

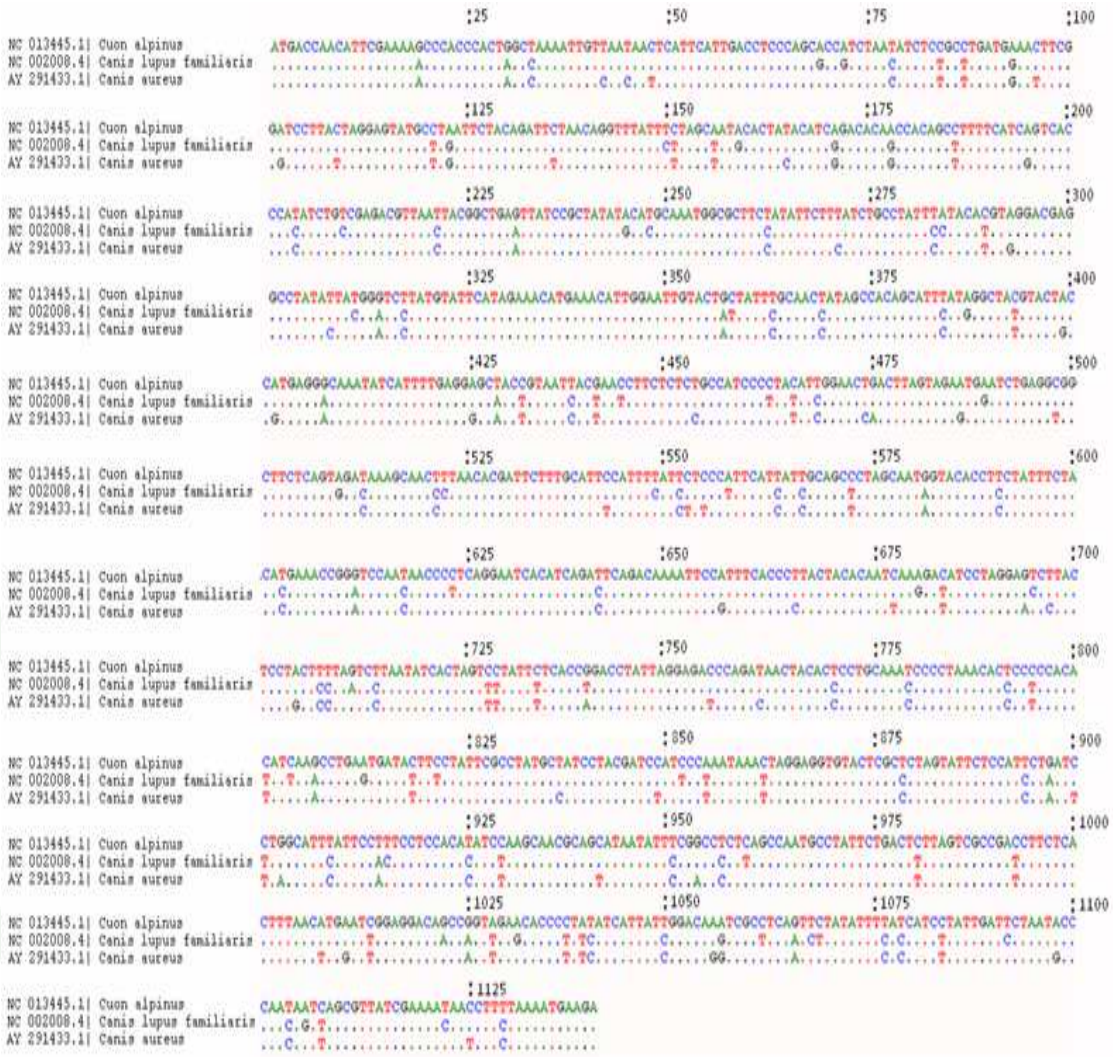
ตารางผนวกที่ ง1 ตารางแสดงสัญลักษณ์ที่ใช้แทนลำดับเบส

สัญลักษณ์	เบส
A	Adenine (A)
C	Cytosine (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 จ

ลำดับเบสของยีนส่วน cytochrome b

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพผนวกที่ จ1 ภาพแสดงข้อมูลการ alignment ของลำดับเบสในส่วน cytochrome b ความยาว 1,140 bp ของหมาใน (*Cuon alpinus*) GenBank accession number NC013445, สุนัขบ้าน (*Canis lupus familiaris*) GenBank accession number NC002008 และสุนัขจิ้งจอก (*Canis aureus*) GenBank accession number AY291433

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นางสาวจารุวี ค่ายมั่น
วัน เดือน ปี ที่เกิด	วันที่ 16 กันยายน 2527
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
ประวัติการศึกษา	สัตวแพทยศาสตรบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	-

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์