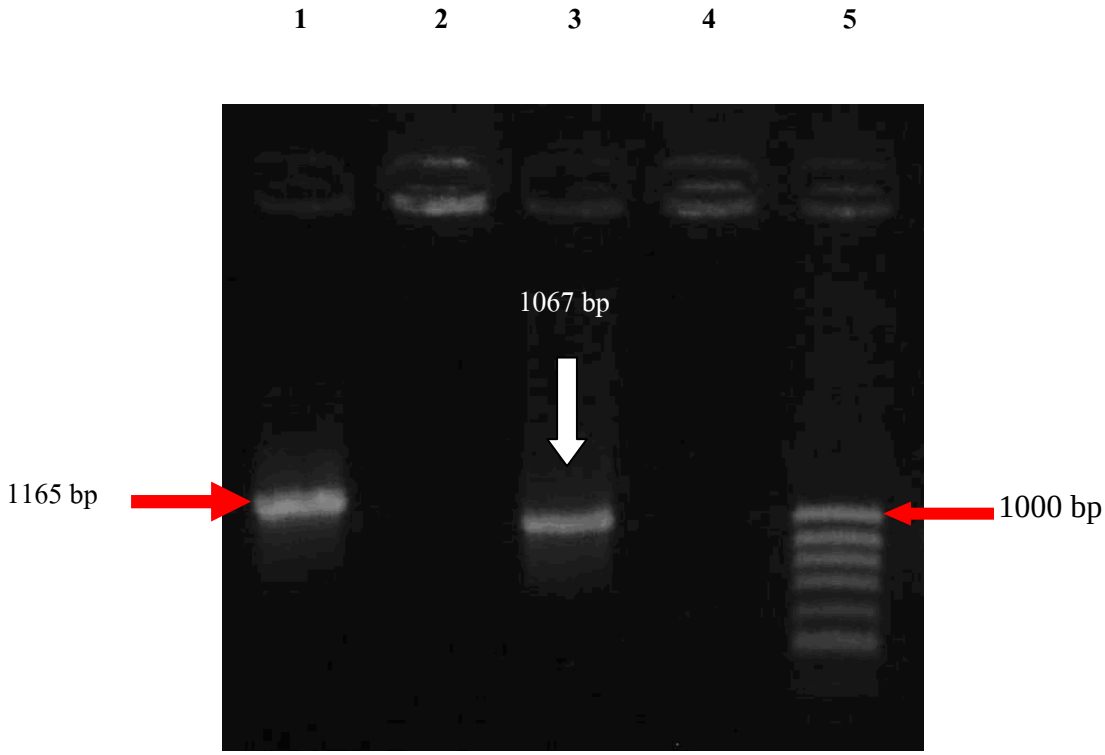
ผลและวิจารณ์

การหาลำดับเบสไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอทั้งหมดของช้างไทย ด้วยตัวอย่างเลือดของช้างหมายเลข 96 โดยใช้ Primers ทั้งหมด 20 คู่ ขนาดของ PCR product ที่ได้จาก Primers แต่ละคู่และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการจับตัวกัน (annealing temperature) ของ Primers แต่ละคู่แสดงในตารางที่ 1 ซึ่งขนาดของ PCR product บางคู่ดังแสดงในภาพที่ 4 และ 5 มาทำการวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยโปรแกรม Multipipmaker (ภาพที่ 6) พบว่ามีความยาวทั้งสิ้น 16847 bp ซึ่งได้รายงานไว้ใน GenBank โดยมี accession number EF588275 เมื่อนำลำดับเบสทั้งหมดที่ได้มาวิเคราะห์หาระยะห่างทางพันธุกรรม (Genetic distance) ของช้างไทย (No.96) เปรียบเทียบกับลำดับเบสของช้างเอเชีย ช้างแอฟริกาและช้างแมมมอทที่มีรายงานใน GenBank โดยใช้พยูนเป็นสัตว์นอกกลุ่ม (outgroup) ทำการวิเคราะห์แบบ Pairwise distance ด้วยโปรแกรม MEGA version 3.1 ผลการวิเคราะห์แสดงไว้ในตารางที่ 4 และเมื่อลำดับเบสไปวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมตามแผนภาพต้นไม้ (Phylogenetic tree) แบบ Bootstrap (ภาพที่ 7) เพื่อหาความสัมพันธ์ของสายวิวัฒนาการพันธุกรรม พบว่าช้างไทยซึ่งเป็นช้างเอเชียมีความใกล้ชิดกับช้างแมมมอทมากกว่าช้างแอฟริกา

ส่วนการหาลำดับเบสเพื่อจัดกลุ่ม (haplotype) ของช้าง 11 เชือกจากศูนย์อนุรักษ์ช้างไทย โดยวิเคราะห์ส่วนของ 5’ cytochrome b 250 bp (จากความยาว 324 bp ทำการตัดลำดับเบสส่วนต้นและท้ายที่อ่านได้ไม่ชัดเจนออก) พบความแตกต่างของลำดับเบส 9 ตำแหน่ง ซึ่งสามารถแบ่งช้างได้ 3 haplotypes (A, B, C) (ตารางที่ 5) และเมื่อวิเคราะห์ลำดับเบสส่วน 3’ cytochrome b ถึง left domain ของ control region 927 bp (จากความยาว 1078 bp ทำการตัดลำดับเบสส่วนต้นและท้ายที่อ่านได้ไม่ชัดเจนออก) จะพบความแตกต่างของลำดับเบส 30 ตำแหน่ง และสามารถจัดช้างได้ 6 haplotypes (ตารางที่ 6)



ภาพที่ 4 แสดง PCR product จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีการ PCR

ช่องที่ 1 แสดง PCR product ของ primer คู่ 1A Fw กับ 2A Re

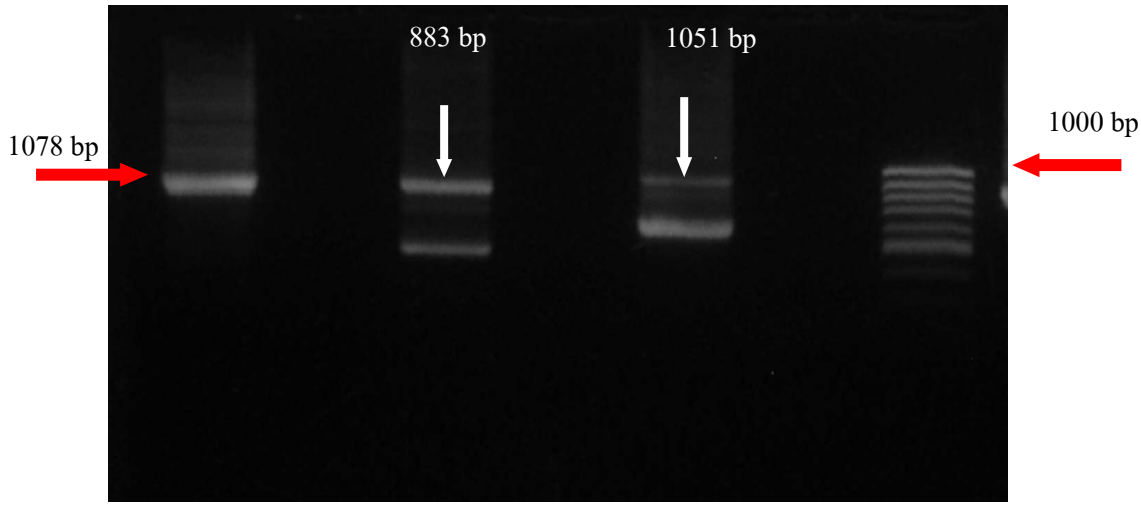
ช่องที่ 2 เป็นช่องของตัวควบคุมที่ไม่เติม Template ของ primer คู่ 1A Fw กับ 2A Re

ช่องที่ 3 แสดง PCR product ของ primer คู่ 2A Fw กับ 3A Re

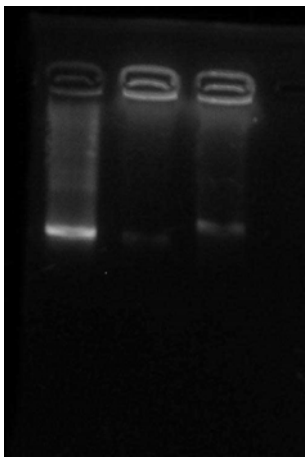
ช่องที่ 4 เป็นช่องของตัวควบคุมที่ไม่เติม Template ของ primer คู่ 2A Fw กับ 3A Re

ช่องที่ 5 แสดงตำแหน่งของ Marker

(ก) **1** **2** **3** **4**



(ข) **1** **2** **3**



ภาพที่ 5 (ก) แสดง PCR product จากการทำ PCR

ช่องที่ 1 แสดง PCR product ของ primer คู่ Mito-CB3 กับ 22A Re

ช่องที่ 2 แสดง PCR product ของ primer คู่ 22B Fw กับ 23A Re

ช่องที่ 3 แสดง PCR product ของ primer คู่ 23A Fw กับ 1A Re

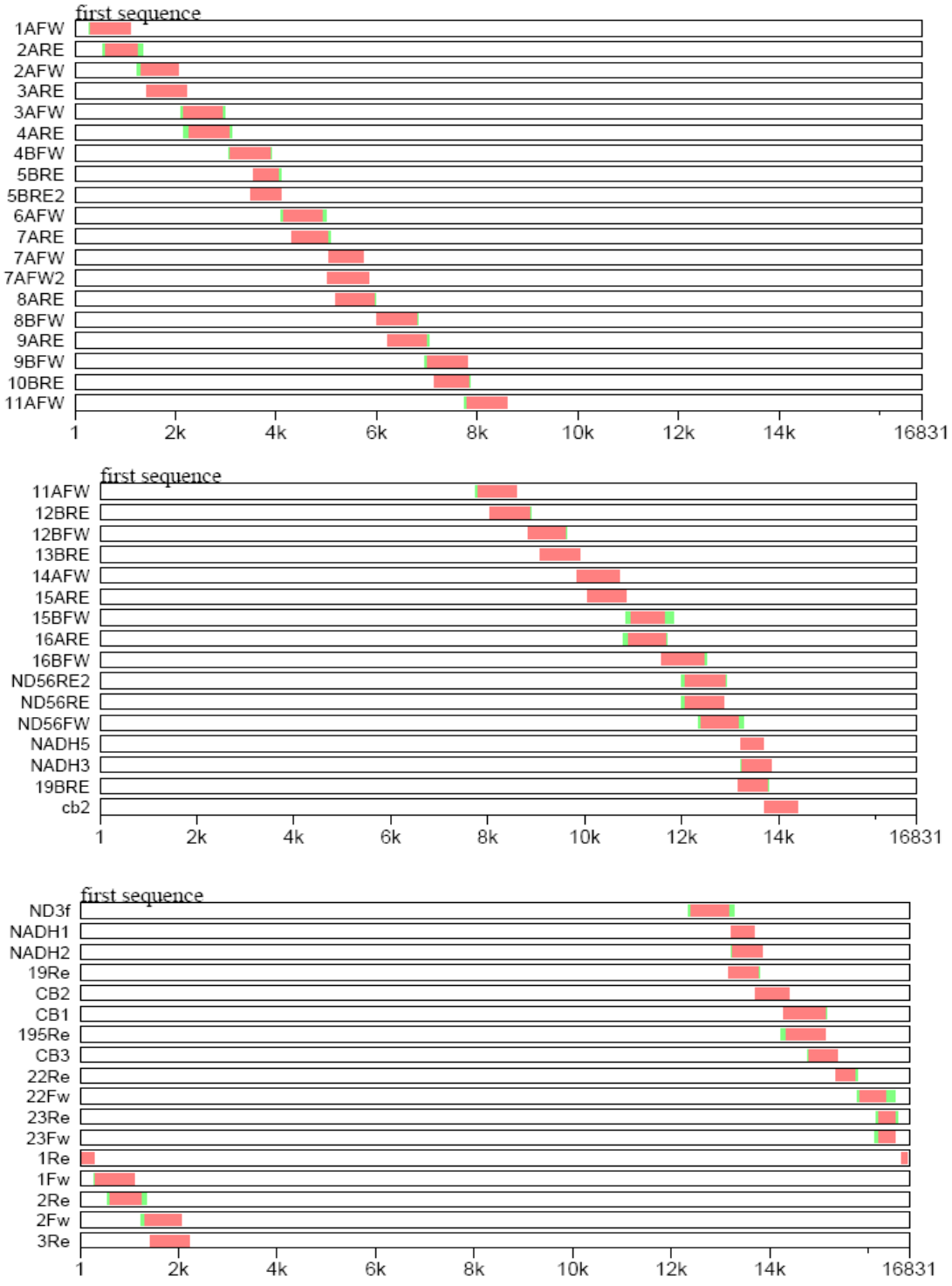
ช่องที่ 4 แสดงตำแหน่งของ Marker

(ข) PCR product ภายหลังการทำ Gel purification

ช่องที่ 1 แสดง PCR product ของ primer คู่ Mito-CB3 กับ 22A Re

ช่องที่ 2 แสดง PCR product ของ primer คู่ 22B Fw กับ 23A Re จาก band บน

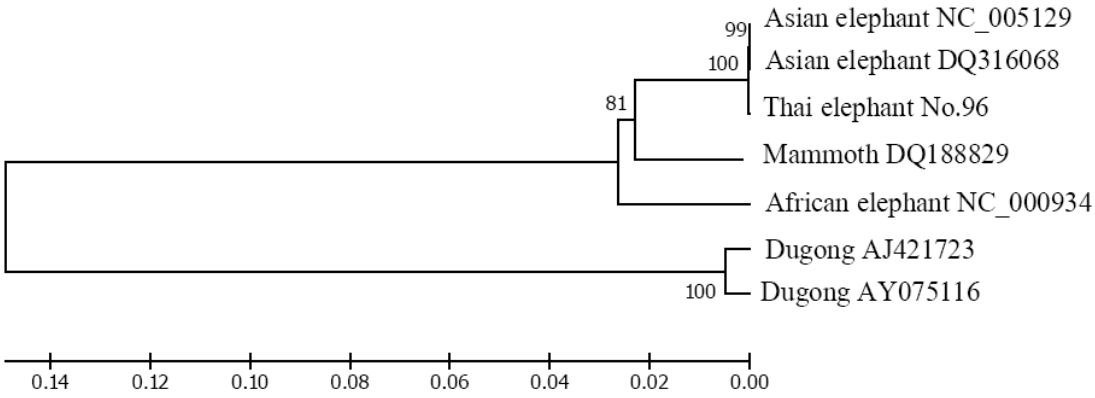
ช่องที่ 3 แสดง PCR product ของ primer คู่ 23A Fw กับ 1A Re จาก band บน



ภาพที่ 6 แสดงผลจากการ Alignment ของลำดับเบสจาก primers ทั้ง 20 คู่ (Fw2 และ Re2 เป็นการทำซ้ำ)

ตารางที่ 4 Pairwise distance : 1, 2 ช้างเอเชีย (accession number NC_005129 and DQ316068), 3 ช้างไทยหมายเลข 96, 4 ช้างแอฟริกา (accession number NC_000934), 5 ช้างแมมมอท (accession number DQ188829) และ 6, 7 พยูน (accession number AJ421723 and AY075116)

	1	2	3	4	5	6	7
1							
2	0.000						
3	0.000	0.000					
4	0.053	0.053	0.053				
5	0.046	0.046	0.046	0.052			
6	0.297	0.297	0.297	0.300	0.299		
7	0.297	0.297	0.297	0.300	0.297	0.010	

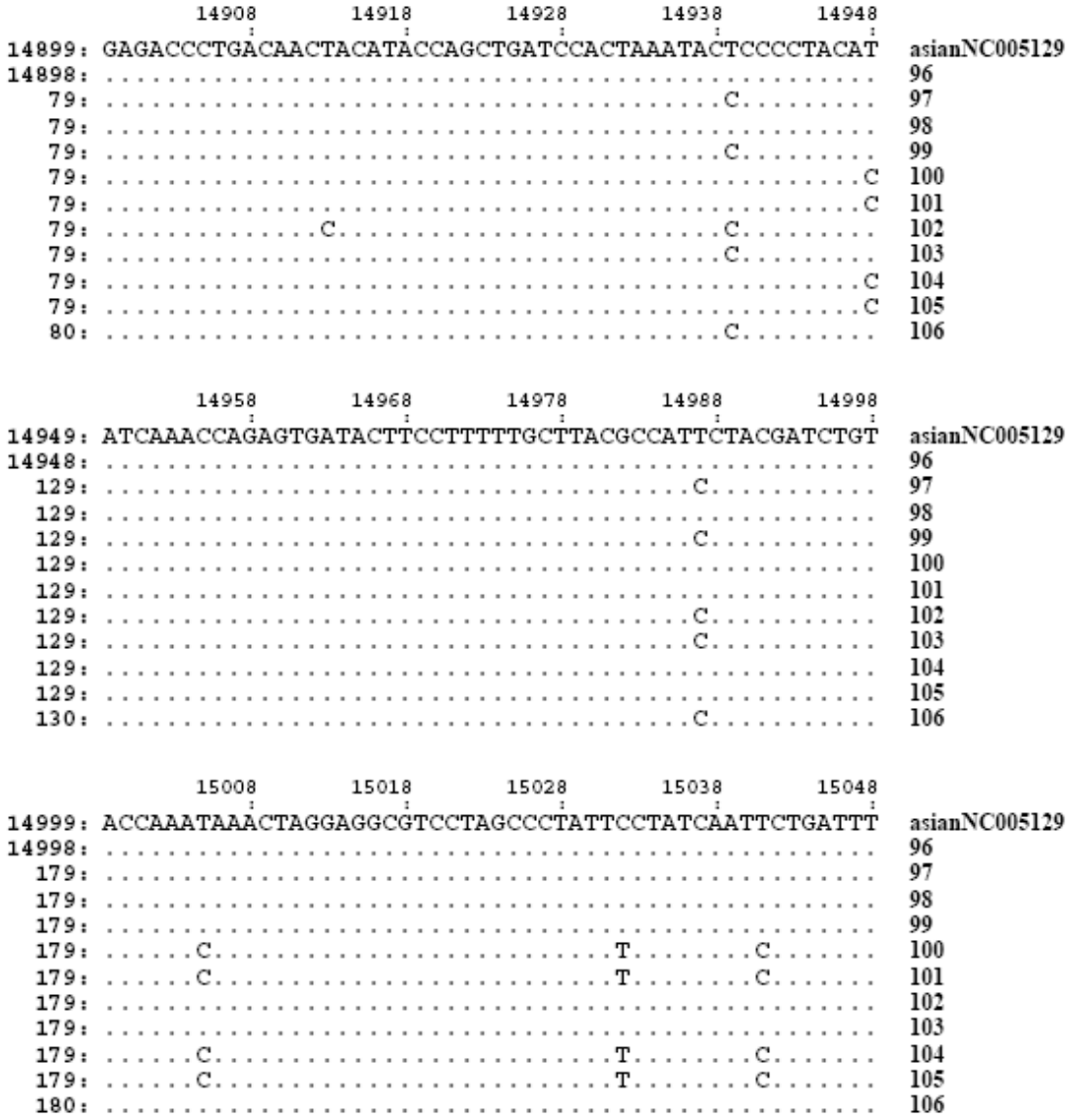


ภาพที่ 7 แสดง Phylognetic tree ของลำดับเบสไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของช้างหมายเลข 96 เปรียบเทียบกับลำดับเบสของช้างเอเชีย (accession number NC_005129 และ DQ316068), ช้างแอฟริกา (accession number NC_000934) และช้างแมมมอท (accession number DQ188829) ที่มีรายงานใน GenBank โดยใช้พยูน (accession number AJ421723 และ AY075116) เป็นสัตว์นอกกลุ่ม (outgroup)

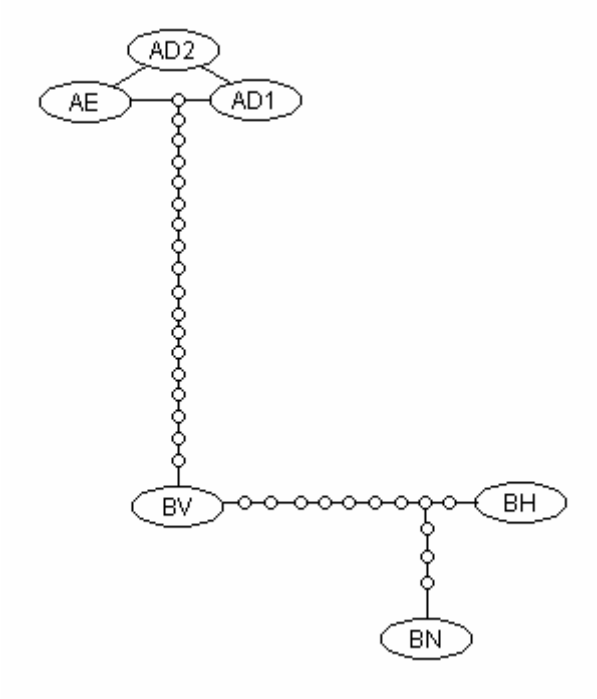
```
            14404       14414       14424       14434       14444
              :           :           :           :           :
14395: CACTCAAACGGAGCATCTATTTTCTTCCTCTGCCTATACACACACATTGG   asian
  124: ..................................................   haplotypeA
  124: ..................C..T..........................   haplotypeB
  124: ..................C..T..........................   haplotypeC
  124: ..................................................   haplotypeD
  124: ..................................................   haplotypeE
  124: ..................C.....T.......................   haplotypeF
  124: ..................................................   haplotypeG
  124: ..................................................   haplotypeH
  124: ..................C..T..........................   96
  124: ..................C..T..........................   97
  124: ..................C..T..........................   98
  124: ..................C..T..........................   99
  124: ..................................................   100
  124: ..................................................   101
  124: ..................C..T..........................   102
  124: ..................C..T..........................   103
  124: ..................................................   104
  124: ..................................................   105
  124: ..................C..T..........................   106

            14454       14464       14474       14484       14494
              :           :           :           :           :
14445: ACGAAACATCTACTATGGATCCTACCTATACTCAGAAACCTGAAATACAG   asian
  174: ..................................................   haplotypeA
  174: ......................T.--..................C....   haplotypeB
  174: ..................................................C....   haplotypeC
  174: G.................................................   haplotypeD
  174: ..................................................C....   haplotypeE
  174: ......................T...........................C....   haplotypeF
  174: ..................................................   haplotypeG
  174: G.................................................C....   haplotypeH
  174: ......................T...........................C....   96
  174: ......................T...........................C....   97
  174: ......................T...........................C....   98
  174: ......................T...........................C....   99
  174: ..................................................   100
  174: ..................................................   101
  174: ..................................................C....   102
  174: ......................T...........................C....   103
  174: ..................................................   104
  174: ..................................................   105
  174: ......................T...........................C....   106
```

ภาพที่ 8 แสดงการเปรียบเทียบลำดับเบสของช้างทั้ง 11 เชือก ในส่วน 5’end cytochrome b เพื่อทำการจัดกลุ่ม (haplotype) โดยเทียบกับ haplotype A-H ของ ปรีดา และคณะ (2546)



ภาพที่ 9 แสดงการเปรียบเทียบลำดับเบสของช้างทั้ง 11 เชือก ในส่วน 3'end cytochrome b ถึง left domain ของ control region เพื่อทำการจัดกลุ่ม (haplotype) โดยเปรียบเทียบกับที่มีรายงานใน GenBank (accession number NC_005129)



ภาพที่ 10 แสดงเครือข่ายของกลุ่ม (haplotypes) ช้างไทยทั้ง 11 เชือก ในส่วน 3’end cytochrome b ถึง left domain ของ control region

เทคนิค PCR และการหาลำดับ nucleotide เป็นเทคนิคที่รวดเร็วในการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอเป้าหมาย จากการหาลำดับเบสทั้งหมดของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอในช้างไทย พบว่ามีความยาวทั้งสิ้น 16847 bp จากการใช้ primers ทั้งหมด 20 คู่ ซึ่ง primer บางคู่นั้นไม่มีความจำเพาะ (non specific primer) ทำให้ได้ PCR product ในขนาดที่ไม่ต้องการ (non-specific band) เพิ่มเข้ามาด้วย โดยเฉพาะในบริเวณปลาย left domain ของ control region ซึ่งเป็นบริเวณที่มีลำดับเบสที่ซ้ำกันเป็นชุดๆ (repeatitive sequence) ทำให้ต้องมีการตัดเจลบริเวณที่ต้องการมาทำให้บริสุทธิ์ นอกจากนี้ในบริเวณดังกล่าวลักษณะของ chromatogram มีบางช่วงที่มีการซ้อนทับกันของ peak ด้วย และเมื่อทำการหาลำดับเบสโดยใช้ primer D-loop Fw (5' CAC CAT CAA CAC CCA AAG CT 3') และ D-loop Re (5' CCT GAA GAA AGA ACC AGA TGC 3') (Lenstra, ติอต่อส่วนตัว) พบว่าลำดับเบสที่ได้จะแตกต่างจากลำดับเบสที่ได้จาก primer คู่ Mito-CB3 กับ 22A Re ซึ่งเมื่อนำลำดับเบสจากคู่ D-loop Fw และ D-loop Re ไปเปรียบเทียบกับรายงานของ Greenwood and Pääbo (1999) พบว่าลำดับเบสมีลักษณะใกล้เคียงกันจึงสันนิษฐานได้ว่า primer คู่ D-loop Fw และ D-loop Re ไม่มีความจำเพาะกับลำดับเบสไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ ทำให้สามารถจับกับลำดับเบสของนิวเคลีย-ดีเอ็นเอได้ด้วย เพราะการสกัดดีเอ็นเอครั้งนี้ไม่ได้แยกสกัดเฉพาะไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอหรือลำดับเบสในบริเวณ tRNA-Pro ถึง left domain ของ control region ของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ อาจเข้ามาแทรก (insert) อยู่ในลำดับเบสของนิวเคลียดีเอ็นเอ (nuclear mitochondrial DNA sequences, *numt*) ซึ่ง *nmut* นี้มักนำมาใช้ประโยชน์ในการทำเป็น phylogenetic marker (Thomas *et al*., 1996) และใช้เป็น outgroups ของการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของไมโตคอนเดรียล-ดีเอ็นเอ (Zischler *et al*., 1995a)

การเปรียบเทียบดูความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree) พบว่าช้างไทยซึ่งเป็นช้างเอเชียมีความใกล้ชิดกับช้างแมมมอทและช้างแอฟริกาตามลำดับ ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับการรายงานของ Krause *et al.* (2006) และ Rogaev *et al.* (2006) ที่ศึกษาลำดับเบสไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอทั้งหมดของช้างแมมมอท ซึ่งการศึกษาลำดับเบสเพียงบางส่วนของ cytochrome b (Yang *et el*., 1996) พบว่าแมมมอทมีความใกล้ชิดกับช้างเอเชียมากกว่าช้างแอฟริกา แต่ Noro *et al.* (1997) ได้ศึกษาในส่วนของ cytochrome b ทั้งหมด (1137 bp) และ 12s ribosomal RNA (961 bp) กลับพบว่าช้างแมมมอทมีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับช้างแอฟริกามากกว่าช้างเอเชีย

นอกจากการศึกษาเพื่อดูความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของช้างแล้ว Fernando *et al.* (2003a) ยังทำการศึกษาในระดับชนิดย่อย (subspecies) โดยศึกษาส่วนของ D-loop และ microsatellite พบว่าช้างที่บอร์เนียว ประเทศอินโดนีเซียน่าจะเป็นชนิดย่อย (subspecies) ใหม่ของช้างเอเชียด้วย ในการศึกษาของ Fleischer *et al.* (2001) ได้ทำการแยกช้างเอเชียและช้างแอฟริกา โดยได้ศึกษาในส่วนของ 3' end cytochrome b, tRNA และ control region และยังได้จัดช้างเอเชียออกเป็น 2 กลุ่มย่อย (clade A and B) Fernando *et al.* (2000) ได้ทำการศึกษาในบริเวณ left domain ของ control region และจัดกลุ่มช้างเอเชียไว้ 17 haplotypes (A-Q) และในปี 2003 ได้รายงานเพิ่มเป็น 25 haplotype เมื่อนำลำดับเบสในส่วน 3' cytochrome b ถึง left domain ของ control region ของช้างทั้ง 11 เชือก ไปเปรียบเทียบกับรายงานของ Fernando *et al.* (2003) (เริ่มศึกษาตั้งแต่ลำดับเบสที่ 15180 ของ accession number NC_005129) พบว่าช้างทั้ง 11 เชือกจัดอยู่ใน haplotype BV (No. 96, 98), BN (No. 97, 99, 103, 106), BH (No. 102), AE (No. 101, 104) และ AD (No. 100, 105) โดยในกลุ่ม AD การศึกษาครั้งนี้พบว่าที่ลำดับเบส 14840 มีความแตกต่างของลำดับเบส ทำให้สามารถแยกออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ AD1 (No.100) และ AD2 (No.105) เมื่อนำช้างทั้ง 6 haplotypes มาสร้างเป็นเครือข่าย (network) ของกลุ่มช้างในภาพที่ 10 พบว่าช้างในกลุ่ม AD1, AD2 และ AE มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกันมากกว่าช้างในกลุ่มอื่นๆ

ดังนั้นเมื่อทราบลำดับเบสทั้งหมดของช้างไทยแล้วในอนาคตจะสามารถทำการเปรียบเทียบลำดับเบสของช้างไทยในตำแหน่งอื่นๆ เพิ่มเติมจากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ใช้ลำดับเบสบางส่วนของยีน cytochrome b ได้ซึ่งอาจทำให้พบ haplotypes ของช้างไทยเพิ่มมากขึ้นจากเดิม 8 haplotypes (ปรีดา และคณะ, 2546) ทั้งนี้การพบ haplotypes ของช้างไทยเพิ่มขึ้นจะเป็นประโยชน์ในการวางแผนการผสมพันธุ์ช้างไทยต่อไปในอนาคต