วิทยานิพนธ์

การจัดจำแนกและศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของ
เป็ดพื้นเมืองไทย ในระดับโมเลกุล

MOLECULAR PHYLOGENETIC STUDY OF THAI
DOMESTIC DUCKS (*Anas platyrhynchos domesticus*)

นางสาวปิยะนันท์ ลีแก้ว

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
พ.ศ. 2550

ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (สรีรวิทยาทางสัตว์)

ปริญญา

สรีรวิทยาทางสัตว์ — **สาขา**

สรีรวิทยา — **ภาควิชา**

เรื่อง การจัดจำแนกและศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของเป็ดพื้นเมืองไทยในระดับโมเลกุล

Molecular Phylogenetic Study of Thai Domestic Ducks (*Anas platyrhynchos domesticus*)

นามผู้วิจัย นางสาวปิยะนันท์ ลีแก้ว

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ ....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์อุคเดช บุญประกอบ, Ph.D.)

กรรมการ ....

(รองศาสตราจารย์อาภัสสรา ชูเทศะ, Dr.rer.nat.)

กรรมการ ....

(รองศาสตราจารย์ทวีศักดิ์ ส่งเสริม, Ph.D.)

กรรมการ ....

(อาจารย์ประชุมพร คงเสรี, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา ....

(รองศาสตราจารย์อาภัสสรา ชูเทศะ, Dr.rer.nat.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

....

(รองศาสตราจารย์วินัย อาจคงหาญ, M.A.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

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

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การจัดจำแนกและศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของเป็ดพื้นเมืองไทยในระดับโมเลกุล

Molecular Phylogenetic Study of Thai Domestic Ducks (*Anas platyrhynchos domesticus*)

โดย

นางสาวปิยะนันท์ ลีแก้ว

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (สรีรวิทยาทางสัตว์)
พ.ศ. 2550

ปิยะนันท์ ลีแก้ว 2550: การจัดจำแนกและศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของเป็ดพื้นเมืองไทยในระดับโมเลกุล ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (สรีรวิทยาทางสัตว์) สาขาสรีรวิทยาทางสัตว์ ภาควิชาสรีรวิทยา ประธานกรรมการที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์อุคเดช บุญประกอบ, Ph.D. 93 หน้า

การศึกษานี้ เพื่อหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระหว่างเป็ดพื้นเมืองไทยสองสายพันธุ์ (เป็ดปากน้ำ (PN), n = 5 ตัว และ เป็ดนครปฐม (NP), n = 5 ตัว) โดยการศึกษาลำดับเบสบริเวณ D-loop control ของไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอ และการระบุหาตำแหน่งของไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ การวิเคราะห์ลำดับเบสของไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอบริเวณ control ขนาด 667 bp พบว่า เป็ดทั้งสองสายพันธุ์มีลักษณะทางพันธุกรรมเหมือนกันในเป็ดทุกตัวที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ผลการวิเคราะห์แผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ สนับสนุนข้อมูลก่อนหน้านี้ที่ว่า เป็ดพื้นเมืองทั้งสองสายพันธุ์จัดอยู่ในสายพันธุ์เดียวกันกับเป็ดป่าหัวเขียว (Mallard, *Anas platyrhynchos*) และแผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่ได้จากการวิเคราะห์ไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอครั้งนี้ยังแสดงให้เห็นว่า เป็ดพื้นเมืองไทยจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับเป็ดป่าหัวเขียว haplotype A ตามรายงานการจำแนกของ Kulikova และคณะ (2005) นอกจากนี้การใช้คู่ไมโครแซทเทลไลท์ไพรเมอร์ 3 คู่ (APH23 CAUD013 และ CAUD019) ร่วมกับพีซีอาร์เพื่อหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระหว่างเป็ดพื้นเมือง 10 ตัว และเป็ดพันธุ์แคมเบลล์ 4 ตัว พบผลผลิตพีซีอาร์ที่มีขนาดเท่ากัน (200 bp) จากคู่ไพรเมอร์ APH23 ในทุกตัวอย่าง ยกเว้นเป็ดพันธุ์แคมเบลล์ อย่างไรก็ตาม พบว่าแถบผลผลิตพีซีอาร์มีความหลากหลายสูงในคู่ไพรเมอร์ CAUD019 ในขณะที่พบแถบของผลผลิตพีซีอาร์ไม่ชัดเจนในคู่ไพรเมอร์ CAUD013 นอกจากนี้การศึกษายังแสดงผลสำเร็จของการสกัดดีเอ็นเอ และเพิ่มปริมาณไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอจากขนเป็ดเพียงหนึ่งเส้น โดยใช้วิธีการย่อยด้วยด่าง ซึ่งเป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็ว และประหยัด ปราศจากขั้นตอนที่อันตราย เพื่อใช้เตรียมไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอ สำหรับนำมาใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสายพันธุ์เป็ด

________________ ________________ ___ / ___ / ___

ลายมือชื่อนิสิต ลายมือชื่อประธานกรรมการ

Piyanan Leekaew 2007: Molecular Phylogenetic Study of Thai Domestic Ducks (*Anas platyrhynchos domesticus*). Master of Science (Animal Physiology), Major Field: Animal Physiology, Department of Physiology. Thesis Advisor: Assistant Professor Ukadej Boonyaprakob, Ph.D. 93 pages.

In this study, the phylogenetic relationships between the two Thai native domestic duck breeds (Parknum (PN), n = 5 and Nakornpathom (NP), n = 5) were explored using the nucleotide sequence of the D-loop control region of mitochondrial DNA (mtDNA) and the PCR analysis of microsatellite loci. Both PN and NP genotypes, based on the 667 bp mtDNA control region sequence were identical for all of the ducks used in the present study. The phylogenetic analysis supports the previous data that the two Thai Native breeds are the same species, known as Mallard (*Anas platyrhynchos*). The mtDNA phylogeny also revealed that the Thai mallard was grouped into group A mtDNA haplotype that correspond to Kulikova *et al.* (2005) classification. In addition, 3 microsatellite primers (APH23, CAUD013 and CAUD019) were used to examine phylogenetic relationships among 10 native ducks and 4 Campbell breed ducks. The PCR products of identifical or similar size (200 bp) were observed with primer pair APH23, in all samples, except those from Campbell duck breeds. However, a high level polymorphism was observed with primer pair CAUD019; whereas, no clear band was detected with primer pair CAUD013. Furthermore this study also showed that successful extraction and amplification of the mtDNA could be obtained from a single duck's feather using alkaline digestion providing a simple, rapid and inexpensive method with no hazardous extraction step for preparing mtDNA for use in the study of genetic diversity of duck breeds.

____________________ ____________________ ___ / ___ / ___

Student's signature Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

กราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์อุคเดช บุญประกอบ ประธานกรรมการที่ปรึกษา เป็นอย่างสูง ในความกรุณาให้ความรู้ คำปรึกษา แนะนำ ช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจให้ตลอดระยะเวลาดำเนินการวิจัยและเขียนวิทยานิพนธ์ ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์อาภัสสรา ชูเทศะ รองศาสตราจารย์ทวีศักดิ์ ส่งเสริม และ อาจารย์ประชุมพร คงเสรี กรรมการที่ปรึกษา ในความกรุณาให้คำปรึกษา แนะนำ และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ธานีรัตน์ สานติวัตร ผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่กรุณาให้คำแนะนำ และตรวจแก้เพื่อความสมบูรณ์แห่งวิทยานิพนธ์ ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านที่ได้ตั้งใจสั่งสอนวิชาความรู้จนประสพความสำเร็จในการศึกษาครั้งนี้

ขอขอบคุณสถานีบำรุงพันธุ์สัตว์ปีก อำเภอกบินทร์บุรี จังหวัดปราจีนบุรี กรมปศุสัตว์ และฟาร์มเป็ด เกษมชัยฟาร์ม ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างเป็ดพื้นเมืองในงานวิจัย และขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย แห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ได้มอบทุนสนับสนุนงานวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณพี่ๆ นักวิทยาศาสตร์ เจ้าหน้าที่ธุรการ ตลอดจนพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ บัณฑิตศึกษาภาควิชาสรีรวิทยา และภาควิชากายวิภาคศาสตร์ทุกท่าน ที่ได้ให้ความความช่วยเหลืออย่างเต็มใจ และคอยเป็นกำลังใจให้ตลอดระยะเวลาการศึกษา

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณผู้ให้กำเนิดทั้งสอง ที่เป็นแรงจูงใจให้ใฝ่หาความรู้ และให้การสนับสนุนในทุกๆ เรื่อง รวมถึงน้องสาวที่คอยดูแลกันมาตลอด และเป็นกำลังใจอันสำคัญจนสำเร็จการศึกษา

ปิยะนันท์ ลีแก้ว

พฤษภาคม 2550

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	4
การตรวจเอกสาร	5
อุปกรณ์และวิธีการ	29
อุปกรณ์	29
วิธีการ	32
ผลและวิจารณ์	46
สรุปและข้อเสนอแนะ	69
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	71
ภาคผนวก	78
ภาคผนวก ก	79
ภาคผนวก ข	90
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	94

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

ตารางที่		หน้า
1	ปริมาณสารสำหรับการเพิ่มปริมาณไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอส่วน control region โดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอร์เรส	35
2	ปริมาณสารสำหรับใช้ในการเชื่อมต่อผลผลิตพีซีอาร์เข้ากับพลาสมิดเวคเตอร์	37
3	ปริมาณสารสำหรับใช้ในการเพิ่มปริมาณไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอร์เรส	41
4	ปริมาณสารสำหรับใช้ในการเตรียมโพลิอะคริลาไมด์เจลเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์	42
5	เปรียบเทียบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้จากวิธีการสกัด 3 แบบ	47
6	เปรียบเทียบเวลาและค่าใช้จ่ายของวิธีการสกัดดีเอ็นเอจากขน 3 แบบ	50
7	จำนวน haplotypes ของเป็ดพื้นเมืองไทย จากการเปรียบเทียบความแตกต่างของชนิดเบสภายในชิ้นไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอบริเวณ control ขนาด 667 bp	52
8	แสดงชนิดของ haplotype ที่พบในเป็ดปากน้ำทั้ง 5 ตัวอย่าง และตำแหน่งที่พบความแตกต่างในสายนิวคลีโอไทด์	53
9	แสดงชนิดของ haplotype ที่พบในเป็ดนครปฐมทั้ง 5 ตัวอย่าง และตำแหน่งที่พบความแตกต่างในสายนิวคลีโอไทด์	53
10	แสดงค่าระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) ของการเปรียบเทียบลำดับเบสของชิ้นไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอบริเวณ control ของเป็ดปากน้ำ	54
11	แสดงค่าระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) ของการเปรียบเทียบลำดับเบสของชิ้นไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอบริเวณ control ของเป็ดนครปฐม	54
12	แสดงค่าระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) ของการเปรียบเทียบลำดับเบสของชิ้นไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอบริเวณ control ของเป็ดพื้นเมืองทั้งสองสายพันธุ์	54
13	ค่าความผันแปรทางพันธุกรรมในไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอ บริเวณ control ของตัวอย่างเป็ดพื้นเมืองทั้งสองสายพันธุ์	55

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
14	แสดงความถี่ในรูปเปอร์เซ็นต์ของชนิดเบสที่เป็นส่วนประกอบในสายนิวคลีโอไทด์ (nucleotide frequencies) ขนาด 667 bp ของไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอบริเวณ control ของเป็ดพื้นเมืองพันธุ์ปากน้ำ และพันธุ์นครปฐม	58
15	ลำดับเบสของไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอบริเวณ control ของเป็ดชนิดอื่นจากฐานข้อมูล National Center for Biotechnology Information (NCBI) ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้	58
16	แสดงความถี่ในรูปเปอร์เซ็นต์ของชนิดเบสที่เป็นส่วนประกอบในสายนิวคลีโอไทด์ (nucleotide frequencies) ขนาด 667 bp ของไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอบริเวณ control ของเป็ดพื้นเมืองพันธุ์ปากน้ำ และพันธุ์นครปฐม และเป็ดป่าหัวเขียว	60
17	ลำดับเบสของไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอบริเวณ control ของเป็ดป่าหัวเขียวจากแหล่งอื่น จากฐานข้อมูลของ National Center for Biotechnology Information (NCBI)	63
18	เปรียบเทียบจำนวนและขนาดของดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ด้วยไมโครแซทเทลไลท์ไพรเมอร์ APH23 CAUD013 และ CAUD019 ระหว่างผลที่ได้จากการศึกษานี้ และผลการศึกษาในเป็ดปักกิ่ง (Peking duck)	65

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	เป็ดป่าหัวเขียว (Mallard, *Anas platyrhynchos*) (ก) เพศผู้ (ข) เพศเมีย	8
2	เป็ดพื้นเมืองไทย (ก) เป็ดไข่พันธุ์นครปฐม (ข) เป็ดไข่พันธุ์ปากน้ำ	8
3	การจัดเรียงยีนที่เป็นองค์ประกอบของไมโตคอนเดรียจีโนม ในสัตว์มีกระดูกสันหลัง	12
4	เปรียบเทียบลักษณะการจัดเรียงยีนของไมโตคอนเดรียจีโนมระหว่างสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (ก) และสัตว์ปีก (ข)	12
5	เปรียบเทียบแผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของนกน้ำโดยการจำแนกระหว่างการวิเคราะห์ protein electrophoretic data และการจำแนกโดยอาศัยการเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและพฤติกรรม	14
6	แผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของเป็ดป่าหัวเขียว และเป็ดดำ (black duck)	15
7	แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของนกน้ำในสกุล Anas โดยอาศัยการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน ND2 ร่วมกับ cytocrome *b* จากไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอ (ก) และ (ข) ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	17
8	แผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของนกน้ำในอันดับ Anseriformes โดยอาศัยการเปรียบเทียบลำดับเบสของไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอบริเวณ control	18
9	แผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของนกเป็ดน้ำในสกุล Anas โดยการวิเคราะห์ลำดับเบสของ nuclear intron ร่วมกับไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอบริเวณ control region	20
10	โครงสร้างและส่วนประกอบของขนนก	27
11	ลักษณะขนอ่อนที่ถูกดึงออก มาจากขุมขนผิวหนัง	27
12	แหล่งของดีเอ็นเอภายในเส้นขน	28
13	แสดงแผนที่พลาสมิดเวคเตอร์ pCR® 4-TOPO (Invitrogen)	38
14	แสดงปฏิกิริยาการต่อชิ้นผลผลิตพีซีอาร์เข้าสู่พลาสมิดเวคเตอร์ pCR® 4-TOPO (Invitrogen)	38
15	สถานที่เก็บตัวอย่างเป็ดพื้นเมือง 2 สายพันธุ์ และเป็ดพันธุ์กากีแคมเบลล์	45

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
16	คุณลักษณะของดีเอ็นเอที่สกัดได้จากขนเป็ด 3 วิธี	47
17	ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 710 bp ที่สังเคราะห์ด้วยคู่ไพรเมอร์ L78 และ H774	49
18	ผลผลิตพีซีอาร์จากดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยวิธีการย่อยด้วยอัลคาไลน์ (alkaline extraction) แล้วผ่าน หรือไม่ผ่าน การแยกให้บริสุทธิ์ด้วย phenol-chloroform	50
19	แสดงลำดับเบสของผลผลิตพีซีอาร์ (ขนาด 667 bp) แบบ haplotype 1 ที่ได้จากไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอบริเวณ control ของเป็ดพื้นเมืองไทย	51
20	Consensus sequence ของไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอบริเวณ control ของตัวแทนเป็ดพื้นเมืองไทย	57
21	เปรียบเทียบ consensus sequence ของไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอ บริเวณ control ของเป็ดพื้นเมืองไทยทั้งสองสายพันธุ์ ด้วยโปรแกรม clustal_W	59
22	แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระหว่างเป็ดพื้นเมืองไทยพันธุ์ปากน้ำและพันธุ์นครปฐม และเป็ดชนิดอื่นที่อยู่ในสกุล Anas	60
23	เปรียบเทียบ consensus sequence ของไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอ บริเวณ control ของเป็ดพื้นเมืองไทยทั้งสองสายพันธุ์ และเป็ดป่าหัวเขียว (AY112938) ด้วยโปรแกรม clustal_W	61
24	แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระหว่างเป็ดพื้นเมืองไทยและเป็ดป่าหัวเขียว haplotype A และ B	62
25	แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระหว่างเป็ดพื้นเมืองไทย 5 haplotypes และเป็ดป่าหัวเขียวจากแหล่งอื่น	64
26	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากเทคนิคพีซีอาร์ที่สังเคราะห์ด้วยคู่ไมโครแซทเทลไลท์ไพรเมอร์ APH23 ในเป็ด 3 สายพันธุ์	66
27	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากเทคนิคพีซีอาร์ที่สังเคราะห์ด้วยคู่ไมโครแซทเทลไลท์ไพรเมอร์ CAUD013 ในเป็ด 3 สายพันธุ์	67
28	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากเทคนิคพีซีอาร์ที่สังเคราะห์ด้วยคู่ไมโครแซทเทลไลท์ไพรเมอร์ CAUD019 ในเป็ด 3 สายพันธุ์	86

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่ **หน้า**

ก1	ลำดับเบสของไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอบริเวณ control ของเป็ดพื้นเมืองไทยทั้งสองสายพันธุ์ (ยาว 710 bp) ตำแหน่งที่ขีดเส้นใต้คือไพรเมอร์ L78 และ H774	80
ก2	เปรียบเทียบลำดับเบสของไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอ บริเวณ control ระหว่างเป็ดพื้นเมืองไทยทั้งสองสายพันธุ์	83
ก3	เปรียบเทียบลำดับเบสของไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอ บริเวณ control ของเป็ดพื้นเมืองไทยทั้งสองสายพันธุ์ กับเป็ดสายพันธุ์อื่น	86

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

APS	=	ammonium persulfate
bp	=	base pair
CoA	=	coenzyme A
COX	=	cytochrome c oxidase
CR	=	control region
cyt b	=	cytochrome b
D-loop	=	displacement loop
DNA	=	deoxyribonucleic acid
E.coli	=	*Escherichia coli*
EDTA	=	ethylenediaminetetraacetic acid
LB	=	Luria-Bertani media
mg	=	milligram
ml	=	milliliter
mRNA	=	messenger RNA
mtDNA	=	mitochondrial DNA
NaCl	=	sodium chloride
NADH	=	nicotinamide adinine dinucleotide (reduced)
NaOH	=	sodium hydroxide
ND	=	NADH dehydrogenase
ng	=	nano(10^{-9})gram
OD	=	optical density
PBS	=	phosphate buffer solution
PCR	=	polymerase chain reaction
RAPD	=	random amplified polymorphic DNA
RFLP	=	restriction fragment length polymorphism
RNA	=	ribonucleic acid
rRNA	=	ribosomal ribonucleic acid
SDS	=	sodium dodecyl sulfate

SNPs	=	single nucleotide polymorphism
SSR	=	simple sequence repeat
STR	=	short tandem repeat
TEMED	=	N,N,N',N'-tetramethyletyethyenediamine
TBE	=	tris borate, EDTA
μl	=	micro (10^{-6}) litter

การจัดจำแนกและศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของเป็ดพื้นเมืองไทย ในระดับโมเลกุล

Molecular Phylogenetic Study of Thai Domestic Ducks

(*Anas platyrhynchos domesticus*)

คำนำ

สิ่งมีชีวิตนานาชนิดที่มีลักษณะแตกต่างกันนั้น เป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงระหว่างวิวัฒนาการโดยส่วนใหญ่เกิดจากการคัดเลือกตามธรรมชาติ เพื่อให้สามารถอยู่รอดภายใต้สภาพแวดล้อมที่แตกต่างกัน การศึกษาชีววิทยาที่มีมาแต่อดีตอาศัยการจำแนกสิ่งมีชีวิตออกเป็นสายพันธุ์หรือสปีชีส์ (species) และจัดกลุ่มเข้าเป็นหมวดหมู่ตามรูปร่างลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยยึดถือความคล้ายคลึงหรือความแตกต่างของลักษณะเฉพาะอย่างใดอย่างหนึ่งเป็นเกณฑ์ตัดสิน แต่ในปัจจุบัน นักชีววิทยาสามารถจำแนกสายพันธุ์หรือสปีชีส์โดยอาศัยข้อมูลทางพันธุกรรม (วิสุทธิ์, 2530) ซึ่งในแง่วิวัฒนาการประชากรที่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมเหล่านี้อาจนำไปสู่การวิวัฒนาการเป็นสิ่งมีชีวิตชนิดใหม่ (speciation) สิ่งสำคัญที่สุดคือความหลากหลายของประชากรเป็นหลักประกันความอยู่รอดของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ เมื่อเกิดการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อม (อุทัยรัตน์, 2543)

การศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตในระดับพันธุกรรม อาศัยการวิเคราะห์เปรียบเทียบลักษณะการจัดเรียงลำดับเบสของดีเอ็นเอ หรือลักษณะการจัดเรียงลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนระหว่างสิ่งมีชีวิตแต่ละตัว แล้วคำนวณหาความสัมพันธ์ที่ใกล้ชิดกันหรือความแตกต่างกันทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตนั้นว่ามีความใกล้ชิดหรือห่างกันตามสายวิวัฒนาการอย่างไร (Nei and Kumar, 2000) โดยส่วนใหญ่แสดงออกมาอยู่ในรูปแผนภูมิการแสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ซึ่งช่วยให้มีความเข้าใจเกี่ยวกับกระบวนการปรับตัวในระดับโมเลกุลของการเปลี่ยนแปลงระหว่างการเกิดวิวัฒนาการ (Jermann *et al*., 1995)

ปัจจุบันการสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากลำดับเบสในดีเอ็นเอกลายเป็นข้อปฏิบัติมาตรฐานสำหรับงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต (Peters *et al.*, 2005) โดยการวิเคราะห์จากทั้งจีโนม (genome) หรือบางส่วนของดีเอ็นเอ (Wilson *et al.*, 1997) ทำให้สามารถจัดจำแนกสิ่งมีชีวิตออกเป็นระดับต่างๆได้ (อาณาจักร ไฟลัม วงศ์ สกุล สายพันธุ์) โดยดูจากความแตกต่างของยีนหรือส่วนของดีเอ็นเอ ซึ่งการศึกษาเกี่ยวกับความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตลักษณะนี้ทำให้สามารถมองเห็นความแตกต่างและแยกได้ชัดเจน (Goodwin *et al.*, 1996) เช่นการจัดจำแนกสัตว์ปีกในสกุล Anas (นกเป็ดน้ำ) ออกจากกันได้มากกว่า 26 สายพันธุ์ (Patton and Avise, 1986) หรือการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์ของเป็ดที่อยู่แต่ละแห่งของโลก (Omland, 1994; McCracken *et al.*, 2001) นอกจากนี้ยังใช้ศึกษาวิวัฒนาการและความสัมพันธ์ซึ่งเกี่ยวข้องกับนกบางชนิดที่สูญพันธุ์ไปแล้วได้ (Moum *et al.*, 2002)

เป็ดจัดเป็นสัตว์เศรษฐกิจที่สำคัญอีกชนิดหนึ่ง ซึ่งถือเป็นแหล่งอาหารโปรตีนของคนไทยมาช้านาน ขนเป็ดยังสามารถใช้ทำเครื่องนุ่งห่ม ทำลูกแบดมินตันและอื่นๆอีกมากมาย (พินิจ, 2530) จากความต้องการของมนุษย์ดังกล่าว เป็นสาเหตุให้มีการนำพันธุ์เป็ดจากต่างประเทศเข้ามาเลี้ยงเพื่อปรับปรุงพันธุ์และเพิ่มผลผลิตและเป็นเหตุให้เป็ดพื้นเมืองที่มีอยู่ดั้งเดิมเริ่มหายไป สำหรับเป็ดพันธุ์พื้นเมืองไทยแม้ว่ายังไม่มีความชัดเจนถึงประวัติความเป็นมา แต่เป็นที่ยอมรับกันว่ามีเหลืออยู่ 2 พันธุ์ ซึ่งแบ่งเรียกตามลักษณะและตามแหล่งที่เคยเลี้ยงกันมากในอดีตคือ เป็ดไข่พันธุ์นครปฐม และเป็ดไข่พันธุ์ปากน้ำ ทั้งนี้เชื่อว่าเป็ดทั้งสองสายพันธุ์มีบรรพบุรุษมาจากเป็ดป่าหัวเขียว (Mallard duck) ซึ่งเป็นสัตว์ปีกในสกุล Anas ที่มีมากกว่า 40 สายพันธุ์ และส่วนใหญ่สามารถผสมพันธุ์ข้ามสายพันธุ์จนเกิดลูกผสมหรือพันธุ์ใหม่ๆมากมาย ดังเช่นที่เกิดกับเป็ดทั้งสองสายพันธุ์ของไทยที่ได้รับการปรับปรุงพันธุ์เพื่อเพิ่มผลผลิต โดยการผสมข้ามกับพันธุ์ต่างประเทศจนแทบไม่พบพันธุ์พื้นเมืองแท้หลงเหลืออยู่ในปัจจุบัน เว้นแต่ฝูงที่ได้รับการอนุรักษ์ไว้ ณ สถานีบำรุงพันธุ์สัตว์ กรมปศุสัตว์เท่านั้น

ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจลำดับเบสส่วน control region ของไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอ (mitochondrial DNA; mtDNA) ของเป็ดพื้นเมืองไทยทั้งสองสายพันธุ์และเปรียบเทียบลำดับเบสของไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอดังกล่าวกับเป็ดสายพันธุ์อื่นที่อยู่ในสกุล Anas ด้วยกัน เพื่อศึกษาโครงสร้างความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระดับโมเลกุล และใช้เทคนิคไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ (microsatellite DNA) เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและเครื่องหมายโมเลกุล (molecular marker) บางส่วนของเป็ดพื้นเมืองไทยดังกล่าว นอกจากนี้ได้

พัฒนาวิธีการสกัดดีเอ็นเอจากไมโตคอนเดรียที่ง่าย รวดเร็ว และประหยัด ข้อมูลที่ได้จะเป็นประโยชน์ต่อการต่อยอดความรู้ทางพันธุกรรมของเป็ดพื้นเมืองไทย ตลอดจนอาจนำไปใช้ในการวางแผนการจัดการที่เหมาะสมเพื่อที่จะอนุรักษ์แหล่งพันธุกรรมเป็ดพื้นเมืองไว้เพื่อใช้ประโยชน์ต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาวิธีการสกัดดีเอ็นเอจากไมโตคอนเดรียของเป็ดด้วยวิธีที่ง่าย รวดเร็ว ประหยัด และก่อให้เกิดอันตรายต่อสัตว์น้อยที่สุด

2. เพื่อศึกษาเปรียบเทียบลำดับเบสส่วน control region ของไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอ และวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระดับโมเลกุลระหว่างเป็ดพื้นเมืองไทยสองสายพันธุ์ (พันธุ์นครปฐมและพันธุ์ปากน้ำ) และเป็ดพันธุ์อื่นในสกุล Anas เดียวกัน

3. เพื่อศึกษาเครื่องหมายโมเลกุลทางพันธุกรรมบางส่วนของเป็ดพื้นเมืองไทย โดยอาศัยลักษณะ microsatellite DNA

การตรวจเอกสาร

การจัดอนุกรมวิธานของสัตว์ปีก (class Aves) โดย Sibley and Monroe (1990) จัดเป็ดและนกเป็ดน้ำ อยู่ในอันดับ Anseriformes ซึ่งนกในอันดับ Anseriformes นี้ ประกอบด้วย 4 วงศ์ (family) 48 สกุล (genus) 161 สายพันธุ์ (species) ในขณะที่โอภาส (2541) รายงานว่าเป็ดในประเทศไทยมีอยู่ 2 วงศ์ คือ วงศ์เป็ดแดง (family Dendrocygnidae) และวงศ์นกเป็ดน้ำ (family Anatidae) อย่างไรก็ตาม ปฐม (2529) ระบุว่า เป็ดบ้าน (domestic duck) ที่เลี้ยงกันอยู่ในปัจจุบันจัดอยู่ในวงศ์นกเป็ดน้ำ สกุล Anas และเชื่อว่ามีบรรพบุรุษมาจากเป็ดป่าหัวเขียว (Mallard duck, *Anas platyrhynchos*)

เป็ดป่าหัวเขียวมีลักษณะภายนอกระหว่างเพศผู้ (ภาพที่ 1 (ก)) และเพศเมีย (ภาพที่ 1 (ข)) แตกต่างกันชัดเจน (sexual dimorphism) พบปริมาณหนาแน่นในซีกโลกเหนือ ชอบหากินตามแหล่งน้ำ มีความสามารถในการลอยเหนือน้ำและว่ายน้ำได้ดีมาก เป็ดป่าหัวเขียวจะจับคู่ผสมพันธุ์กันในฤดูผสมพันธุ์ (ประมาณเดือนกุมภาพันธ์ถึงเดือนกรกฎาคม) มีตับไข่ประมาณ 10-12 ฟอง แต่จากการคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงขนาดและรูปร่างของร่างกาย ทำให้มีตับไข่ยาวมากขึ้น นอกจากนี้เป็ดหลายชนิดสามารถผสมพันธุ์ข้ามกันจนเกิดลูกผสมสายพันธุ์ใหม่ๆ มากมาย จึงเป็นเหตุให้มีการแปรปรวนด้านขนาด ลักษณะรูปร่าง และสีขนแตกต่างกันไป นอกจากนี้การปรับปรุงพันธุ์ตามความต้องการของมนุษย์ทำให้เกิดลักษณะพิเศษเฉพาะตัวขึ้น และได้รับการคัดเลือกเป็นพันธุ์สำหรับเลี้ยงเพื่อให้เนื้อหรือให้ไข่เพียงอย่างเดียว เช่น เป็ดพันธุ์ปักกิ่ง เป็ดพันธุ์แคมเบลล์ เป็ดลูกผสมต่างๆ เป็นต้น ทั้งนี้จากหลักฐานที่พบในปัจจุบันว่า เขตที่มีการเลี้ยงเป็ดหนาแน่นที่สุดในโลกอยู่ในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และเอเชียตะวันออกไกล จึงสันนิษฐานว่าบริเวณนี้เป็นแหล่งที่เริ่มนำเป็ดมาเลี้ยงเป็นแห่งแรกของโลก แม้ว่ามีหลักฐานทางประวัติศาสตร์ของกรีกและโรมันแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่างคนและเป็ดที่ใกล้ชิดกัน แต่ยังไม่มีหลักฐานบ่งชี้ถึงประวัติศาสตร์การเพาะเลี้ยงและบำรุงพันธุ์ จึงทำให้เชื่อได้ว่าเป็นเพียงการขุนเป็ดป่าเพื่อการบริโภคเท่านั้น (พินิจ, 2530)

เป็ดพันธุ์พื้นเมืองของประเทศไทย

ประเทศไทยมีการเลี้ยงเป็ดมาเป็นเวลานาน แหล่งที่มีการเลี้ยงกันมากคือ แถบชายทะเลในภาคกลางได้แก่ จังหวัดชลบุรี ฉะเชิงเทรา นครปฐม ราชบุรี และสมุทรปราการ (นิตย์, 2517) พันธุ์

เป็ดที่เลี้ยงส่วนใหญ่มักเป็นเป็ดลูกผสมระหว่างพันธุ์พื้นเมืองกับพันธุ์ต่างประเทศ โดยเฉพาะพันธุ์แคมเบลล์ จากการที่มีการผสมระหว่างเป็ดพื้นเมืองกับเป็ดพันธุ์ต่างประเทศมาเป็นเวลานาน เป็ดที่เลี้ยงกันอยู่ในปัจจุบันจึงเป็นเป็ดพันธุ์ลูกผสมเกือบทั้งหมด เป็ดพื้นเมืองของไทยที่คงเหลืออยู่พบได้เฉพาะในสถานีบำรุงพันธุ์สัตว์ของกรมปศุสัตว์เท่านั้น ทั้งนี้กรมปศุสัตว์ได้ทำการอนุรักษ์และพัฒนาสายพันธุ์เป็ดพื้นเมืองดังกล่าวอย่างต่อเนื่องนานกว่า 30 ปี เพื่อให้เป็นเป็ดที่สามารถเลี้ยงง่าย ต้านทานโรค แข็งแรง เหมาะสำหรับเกษตรกรรายย่อยในชนบท และใช้เป็นแหล่งพันธุกรรมสัตว์พื้นเมือง (กระจ่าง, 2541)

เป็ดพันธุ์พื้นเมืองไทย (Thai native ducks) ที่เหลืออยู่ในปัจจุบันเป็นเป็ดพันธุ์ไข่ และแบ่งออกเป็น 2 พันธุ์ตามลักษณะภายนอกที่เห็นและแหล่งที่เคยเลี้ยงกันมากได้แก่

เป็ดไข่พันธุ์นครปฐม เลี้ยงกันมากในเขตจังหวัดนครปฐม สมุทรสงคราม และจังหวัดชายทะเลภาคใต้ของประเทศไทย เป็ดนครปฐมเป็นเป็ดที่มีลำตัวขนาดกลาง มีเนื้อค่อนข้างมาก ลักษณะรูปร่างภายนอกคล้ายคลึงกับเป็ดป่าหัวเขียวมาก กล่าวคือ ตัวเมียมีขนสีลายกาบอ้อย ปากสีเทา เท้าสีส้ม ตัวผู้มีสีเขียวแก่ไปตั้งแต่คอไปถึงหัว คอควั่นขาว อกสีแดง ลำตัวสีเทา ปากสีเทา (ภาพที่ 2 (ก)) ตัวผู้โตเต็มที่หนักประมาณ 3.0-3.5 กิโลกรัม ตัวเมียหนัก 2.5-3.0 กิโลกรัม เริ่มให้ไข่เมื่ออายุประมาณ 6 เดือน

เป็ดพื้นเมืองพันธุ์นครปฐม ปัจจุบันหาพันธุ์แท้ไม่พบอีกแล้วในประเทศไทย ส่วนที่เหลืออยู่กรมปศุสัตว์ได้มาจากการรวบรวมพันธุ์จากหมู่บ้านต่างๆ บริเวณเขตชายแดนไทย-มาเลเซีย ในจังหวัดนราธิวาส ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2533 โดย ม.ล. สงบ สุขประดิษฐ์ ซึ่งดำรงตำแหน่งหัวหน้าสถานีบำรุงพันธุ์สัตว์ในขณะนั้น เป็นผู้รวบรวมส่งให้สถานีบำรุงพันธุ์สัตว์บางปะกง จำนวน 20 ตัว เป็นเป็ดตัวผู้ 5 ตัว และตัวเมีย 15 ตัว ขณะนี้ย้ายมาอยู่ที่ สถานีบำรุงพันธุ์สัตว์อำเภอกบินทร์บุรี จังหวัดปราจีนบุรี และอยู่ในช่วงการดำเนินการผสมพันธุ์ ขยายพันธุ์ และทดสอบหาข้อมูลเบื้องต้นอยู่จำนวน 200 ตัว

เป็ดไข่พันธุ์ปากน้ำ เลี้ยงกันมากในเขตจังหวัดสมุทรปราการ (ปากน้ำ) สมุทรสาคร ฉะเชิงเทรา และชลบุรี ตลอดจนจังหวัดที่อยู่ชายฝั่งทะเลอื่นๆ เป็นเป็ดพันธุ์เล็ก ทั้งตัวเมียและตัวผู้มีปากสีดำ และลำตัวสีดำ เฉพาะตัวผู้มีขนสีเขียวเข้มที่หัวและลำคอ ขนาดเล็กกว่าเป็ดนครปฐม (ภาพที่ 2 (ข)) เริ่มให้ไข่เมื่ออายุ 5-6 เดือน เกษตรกรนิยมเลี้ยงไว้เพื่อผลิตทั้งไข่และเนื้อ

ตัวเมียจะเลี้ยงเป็นเป็ดไข่ก่อน จนเมื่อหยุดไข่ หรือแก่จะขายเป็นเป็ดเนื้อ ส่วนตัวผู้จะเลี้ยงปล่อยทุ่งเป็นเป็ดเนื้อ

ปัจจุบันไม่พบเป็ดปากน้ำพันธุ์แท้ในจังหวัดต่างๆ ที่เคยมีการเลี้ยงกันแล้ว ทั้งนี้ เนื่องจากตั้งแต่ปี พ.ศ. 2514-2515 ประเทศไทยมีการนำเข้าเป็ดพันธุ์แคมป์เบลล์สีกากีจากประเทศอังกฤษ ซึ่งเป็นเป็ดพันธุ์ไข่ และให้ไข่ดกกว่าพันธุ์พื้นเมือง แต่พันธุ์แคมป์เบลล์สีกากีแท้จะเลี้ยงยากในสภาพแวดล้อมของประเทศไทย เกษตรกรจึงนิยมผสมเป็ดปากน้ำกับเป็ดพันธุ์แคมป์เบลล์สีกากีเพื่อให้ได้เป็ดลูกผสมที่ให้ไข่ดก และทนทานต่อสภาพแวดล้อม ทำให้มีการเลี้ยงเป็ดลูกผสมอย่างกว้างขวาง เกษตรกรจะเก็บเฉพาะเป็ดลูกผสม และทำการขยายพันธุ์ลูกผสมอย่างต่อเนื่อง เป็นสาเหตุให้จำนวนของเป็ดปากน้ำลดจำนวนลงอย่างรวดเร็ว กรมปศุสัตว์ได้เล็งเห็นความสำคัญ จึงได้ทำการรวบรวมเก็บรักษาและขยายพันธุ์ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2511 ที่สถานีสัตว์ปีกบางปะกง ซึ่งปัจจุบันเปลี่ยนชื่อใหม่เป็นสถานีบำรุงพันธุ์สัตว์บางปะกง โดยในระยะแรกยังไม่มีเกณฑ์การคัดเลือกที่ชัดเจน จนในปี พ.ศ. 2531 จึงได้เริ่มการคัดเลือกพันธุ์ตามโครงการปรับปรุงพันธุ์ของกรมปศุสัตว์จนถึงปัจจุบัน โดยมีวัตถุประสงค์ในการคัดเลือกเพื่อให้ได้เป็ดพันธุ์ไข่ที่มีลักษณะไข่ดก ไข่เร็ว มีขนาดไข่ใหญ่ และขนาดตัวเล็ก เริ่มจากฝูงแม่เป็ดจำนวนประมาณ 500-600 ตัว พ่อพันธุ์จำนวน 100-200 ตัว ทำการคัดเลือกแม่เป็ดไว้ขยายพันธุ์ในชั่วต่อๆ ไป จำนวน 45-50 แม่ พ่อพันธุ์ 45-50 ตัว แล้วทำการผสมในอัตราส่วน 1 : 1 โดนวิธีผสมเทียม เพื่อผลิตลูกขึ้นมาทดแทนให้ได้ลูกเพศเมีย 500-600 ตัว ลูกตัวผู้ 100-200 ตัว แล้วจะทำการคัดเลือกพันธุ์อีก ดำเนินการเช่นนี้ทุกๆ ชั่วอายุ การคัดพันธุ์จะเน้นในด้านการให้ไข่ดก อายุเริ่มไข่น้อย น้ำหนักตัวเมื่อให้ไข่ฟองแรกต่ำ น้ำหนักไข่ 60-65 กรัม/ฟอง ขนสีดำสนิทตลอดทั้งตัว ไม่มีจุดด่างบนหน้าอก และจะคัดเลือก โดยใช้ข้อมูลระยะสั้นของการไข่ 4 เดือนแรก เป็นบรรทัดฐานในแต่ละชั่วอายุ

ปัจจุบันเป็ดพันธุ์ปากน้ำที่เหลืออยู่ ถูกนำมาเลี้ยงและรักษาพันธุ์ไว้ที่สถานีบำรุงพันธุ์สัตว์อำเภอกบินทร์บุรี จังหวัดปราจีนบุรี และมีบางส่วนนำออกมาเลี้ยงในฟาร์มเอกชน จังหวัดนครปฐม

แม้มีความเข้าใจว่าเป็ดพื้นเมืองของไทยสืบสายพันธุ์มาจากเป็ดป่าหัวเขียว (Mallard) และจัดหมวดหมู่ตามอนุกรมวิธาน โดยอาศัยลักษณะเด่นที่พบเห็นจากภายนอกอยู่ในสายพันธุ์เดียวกันคือ *Anas platyrhynchos domesticus* แต่ยังไม่พบข้อมูลทางพันธุกรรมแสดงหลักฐานความสัมพันธ์ในเชิงวิวัฒนาการของเป็ดพื้นเมืองไทยทั้งสองสายพันธุ์และนกเป็ดน้ำชนิดอื่น ทั้งนี้เป็ดพื้นเมืองถือเป็นทรัพยากรทางชีวภาพที่มีคุณค่า และถือเป็นต้นทุนอย่างหนึ่งของประเทศ โดยเฉพาะการ

นำไปใช้ประโยชน์ด้านเกษตรกรรม จึงควรมีการศึกษาวิวัฒนาการและลักษณะทางพันธุกรรมของเป็ดพื้นเมืองไทยทั้งสองสายพันธุ์ เพื่อการคุ้มครองและใช้ประโยชน์ทรัพยากรทางชีวภาพดังกล่าวอย่างยั่งยืน

(ก)

(ข)

ภาพที่ 1 เป็ดป่าหัวเขียว (Mallard, *Anas platyrhynchos*) (ก) เพศผู้ (ข) เพศเมีย
ที่มา : Wilson (2005)

(ก)

(ข)

ภาพที่ 2 เป็ดพื้นเมืองไทย (ก) เป็ดไข่พันธุ์นครปฐม (ข) เป็ดไข่พันธุ์ปากน้ำ
ที่มา : กลุ่มงานสัตว์ปีก กองบำรุงพันธุ์สัตว์ กรมปศุสัตว์ (2548)

ความหลากหลายทางชีวภาพและการศึกษาวิวัฒนาการด้านพันธุกรรม

ความหลากหลายทางชีวภาพ (biodiversity) เกิดขึ้นจากความสามารถในการปรับตัวของสิ่งมีชีวิตเพื่อให้สามารถอยู่รอดในสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไปและแบ่งได้ 3 ระดับ (ปรีชา, 2543) คือความหลากหลายระดับพันธุกรรม (genetic diversity) ความหลากหลายระดับชนิดพันธุ์ (species diversity) และความหลากหลายในระบบนิเวศ (ecosystem diversity) แต่เดิมการศึกษาและจัดจำแนกความหลากหลายทางชีวภาพเพื่อจัดกลุ่มสิ่งมีชีวิตเป็นหมวดหมู่อาศัยการพิจารณารูปร่างลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphological analysis) เพียงอย่างเดียว แต่ปัจจุบันมีการอาศัยข้อมูลในระดับโมเลกุลช่วยเพื่อให้เกิดความถูกต้องมากขึ้น โดยเฉพาะการจำแนกสิ่งมีชีวิตกลุ่มย่อยที่มีลักษณะภายนอกคล้ายคลึงกันมากหรือจำแนกสิ่งมีชีวิตที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน

การพิจารณาความเหมือนหรือแตกต่างในระดับดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตมีข้อดีกว่าการเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยา และการตรวจสอบเครื่องหมายโปรตีน (protein marker) เพราะลักษณะทางสัณฐานวิทยาส่วนใหญ่ผันแปรตามสภาพแวดล้อม จึงอาจเป็นผลให้การจัดหมวดหมู่ผิดพลาดได้ และการตรวจสอบเครื่องหมายโปรตีนมีข้อจำกัดคือ จำนวนยีนที่ตรวจสอบได้ยังมีน้อย ไม่กระจายครอบคลุมทั้งจีโนม และศึกษาได้เฉพาะยีนที่มีการแสดงออกเท่านั้น จึงต้องเลือกเนื้อเยื่อและระยะเวลาที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ นอกจากนี้โปรตีนยังสูญเสียสภาพธรรมชาติได้ง่ายจึงต้องวิเคราะห์ผลในเวลาจำกัด และโอกาสที่จะตรวจพบความแตกต่างในระดับโปรตีนยังมีน้อยกว่าการตรวจสอบระดับดีเอ็นเอ เนื่องจากความแตกต่างในระดับนิวคลีโอไทด์ของยีนอาจไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงในระดับกรดอะมิโนของโปรตีนสำหรับยีนนั้น นอกจากนี้โมเลกุลของดีเอ็นเอมีความเสถียรกว่าจึงเก็บไว้ได้นาน และสามารถวิเคราะห์จากตัวอย่างที่ถูกเก็บไว้เป็นเวลานานแล้วได้ นอกจากนี้ดีเอ็นเอเป็นองค์ประกอบที่มีอยู่ในเซลล์เกือบทุกเซลล์ในปริมาณเกือบเท่ากัน จึงสามารถตรวจสอบดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อ หรือจากระยะการเจริญเติบโต หรือสภาพทางสรีรวิทยาใดๆ ได้ และสามารถตรวจสอบดีเอ็นเอที่เป็นยีนหรือไม่ใช่ยีนได้ จึงไม่มีข้อจำกัดเรื่องการแสดงออกของยีน (สุรินทร์, 2545) ปัจจุบันมีวิธีตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอหลายแบบ และที่นิยมใช้ได้แก่ เทคนิคอาร์เอฟแอลพี (RFLP, Restriction Fragment Length Polymorphism) เทคนิคอาร์เอพีดี (RAPD, Randomly Amplified Polymorphic DNA) เทคนิคเอเอฟแอลพี (AFLP, Amplified Fragment Length Polymorphism) สนิปส์ (SNPs, Single Nucleotide Polymorphism) ไมโครแซทเทลไลท์ (Microsatellite DNA; SSR, Simple Sequence Repeat; STR, Short Tandem Repeat) รวมถึงการศึกษาพันธุกรรมจากดีเอ็นเอในออร์กาเนลล์เช่น คลอโรพลาสดีเอ็นเอ หรือ

ไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอ (mtDNA, mitochondrial DNA) โดยเฉพาะการเปรียบเทียบลำดับเบสของนิวคลีโอไทด์ในไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอเป็นที่นิยมใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเป็ด

ไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอ (mitochondrial DNA)

ไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายในการศึกษาเกี่ยวกับความหลากหลายทางพันธุกรรม และการหาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการระดับโมเลกุล เนื่องจากมีข้อดีคือ จีโนมมีขนาดเล็ก มีอัตราการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสสูงมากกว่านิวเคลียดีเอ็นเอ 5-10 เท่า สาเหตุเนื่องมาจากในไมโตคอนเดรียขาดเอ็นไซม์ที่ช่วยในกระบวนการซ่อมแซมสายดีเอ็นเอเมื่อเกิดการจำลองตัวเองผิดพลาดรวมถึงเมื่อสายดีเอ็นเอถูกทำลายด้วยปัจจัยต่างๆ (Castro *et al.*, 1998) ดังนั้นลักษณะทางพันธุกรรมของไมโตคอนเดรียดีเอ็นเออาจเกิดความผันแปรไปได้เมื่อสิ่งมีชีวิตดำรงเผ่าพันธุ์ผ่านไปเพียง 4-5 รุ่น จึงเหมาะสำหรับการใช้จำแนกสิ่งมีชีวิตที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมากหรือสิ่งมีชีวิตในสปีชีส์เดียวกัน แต่สิ่งที่ควรคำนึงถึงการใช้ไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอคือ ไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอจะได้รับการถ่ายทอดลักษณะผ่านทางสายแม่เท่านั้น

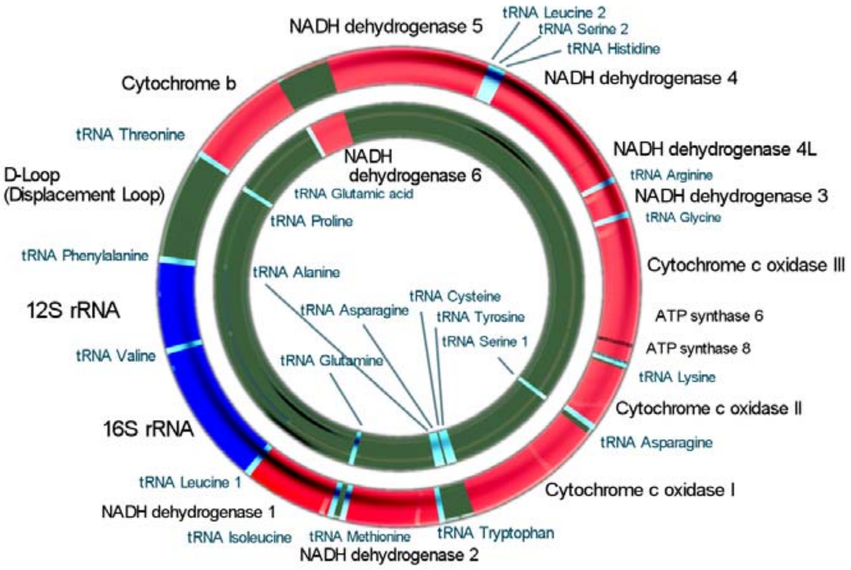
จีโนมของไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอเป็นดีเอ็นเอสายคู่ลักษณะเป็นวงกลมแบบปิด มีขนาดแตกต่างกันไปในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด โดยทั่วไปในสัตว์มีกระดูกสันหลังมีขนาดอยู่ระหว่าง 15-20 กิโลเบส (Shadel and Clayton, 1997; Castro *et al.*, 1998; Cyan, 2005) ประกอบด้วยยีนทั้งหมด 37 ชนิด ได้แก่ ribosomal RNA 2 ชนิดคือ 12S RNA และ 16S RNA, tRNA 22 ชนิด และโปรตีน 13 ชนิดสำหรับขบวนการ oxidative phosphorylation (complex I 7 subunit; NADH dehydrogenase subunit 1, 2, 3, 4, 4L, 5 และ 6, complex III 1 subunit; cytochrome b, complex IV 3 subunit; cytochrome c oxidase subunit I, II, III, complex V 2 subunit; ATPase 6 และ ATPase 8) และส่วนที่ควบคุมการคัดลอกและการจำลองดีเอ็นเอเรียกว่า control region (ภาพที่ 3) สำหรับบริเวณที่นิยมใช้ในการวิเคราะห์พบได้ทั้งในส่วน mtDNA control region, mtDNA protein coding genes, mitochondrial tRNA และ mitochondrial ribosomal RNA (Loew, 2000)

ไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอทั้งสองสายมีปริมาณนิวคลีโอไทด์ที่มีเบสชนิด กวานีน (guanine; G) และไซโตซีน (cytosine; C) แตกต่างกัน จึงสามารถแยกจากกันได้โดยอาศัยความแตกต่างของความหนาแน่น แบ่งได้เป็น heavy หรือ H-strand และ light หรือ L-strand โดยสาย H-strand มี

กวานีนอยู่มาก ส่วนสาย L-strand มีไซโตซีนมาก (Lehtonen, 2002; Fernandez-silva *et al.*, 2003) สาย H-strand กำหนดการแปลรหัส rRNAs tRNAs 14 ชนิด และโปรตีนอีก 12 ชนิด ยกเว้น ND6 ซึ่งถูกกำหนดการแปลรหัสโดยสาย L-strand กับ tRNAs ที่เหลืออีก 8 ชนิด

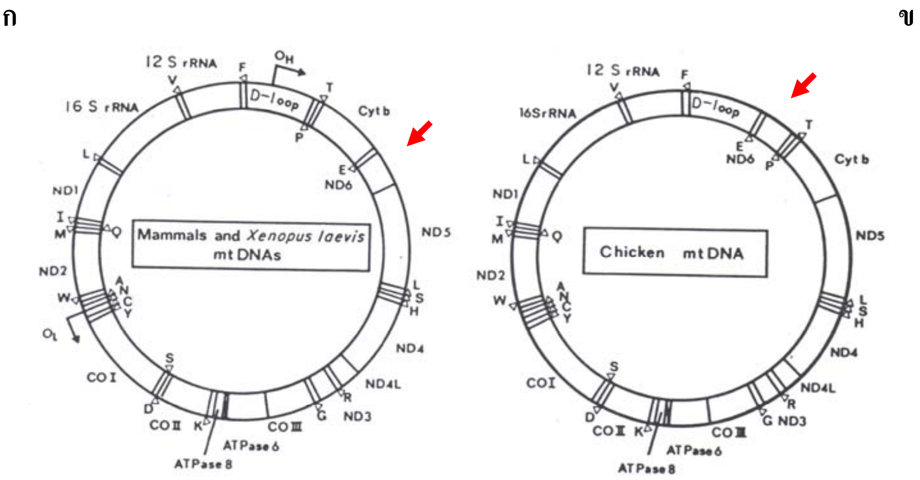
ลักษณะสำคัญที่เด่นชัดอีกอย่างหนึ่งของไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอคือ ยีนและส่วนที่กำหนดการแปลรหัสไปเป็นโปรตีนทั้งหมดอยู่ต่อเนื่องกัน หรืออยู่ห่างกันเพียง 2-3 เบส โดยปราศจากส่วน intron และบางยีนมีส่วนที่เหลื่อมกัน (overlap) ได้แก่ ATPase 6 และ 8 (ประมาณ 4-6 นิวคลีโอไทด์) และ ND4 กับ ND4L (ประมาณ 7 นิวคลีโอไทด์) การสังเคราะห์อาร์เอ็นเอหรือถอดรหัสยีนในไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอต้องอาศัยโพลินิวคลีโอไทด์ทั้งสองสายเป็นแม่แบบและถอดรหัสตลอดทั้งสาย จากนั้นแต่ละสายจะถูกเอ็นไซม์ตัดออกให้ได้ mRNA tRNA และ rRNA ซึ่งแตกต่างจากยีนในนิวเคลียสที่ถอดรหัสจากดีเอ็นเอแม่แบบเพียงสายเดียวและถอดรหัสเฉพาะยีนที่ต้องการ (ลัดดา, 2547)

การศึกษาไมโตคอนเดรียจีโนมของไก่ (*Gallus gallus*) โดย Desjardins and Morais (1990) พบว่าไก่มีไมโตคอนเดรียจีโนมขนาด 16,775 bp และมีลักษณะแตกต่างจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม 2 บริเวณ โดยบริเวณแรกคือ ตำแหน่งของยีน ND6 และ $tRNA^{Glu}$ ในไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอของสัตว์ปีกอยู่ติดกับบริเวณ D-loop แต่ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมส่วนที่ติดอยู่กับ D-loop เป็น $tRNA^{Pro}$ $tRNA^{Thr}$ และ cytochrome b genes ตามลำดับก่อน แล้วจึงเป็น $tRNA^{Glu}$ และ ND6 genes (ภาพที่ 4) และบริเวณที่สองคือไมโตคอนเดรียของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมมีจุดเริ่มต้นในการถอดรหัสของสาย L-strand อยู่ระหว่าง $tRNA^{Cys}$ และ $tRNA^{Asn}$ ในขณะที่สัตว์ปีกไม่เป็นไปตามนี้ แต่ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดเกี่ยวกับจุดเริ่มต้นในการถอดรหัสไมโตคอนเดรียในสัตว์ปีก ต่อมาในปี ค.ศ. 1993 Ramirez และคณะ รายงานผลการศึกษาลำดับเบสบางส่วน (6,478 bp) ของไมโตคอนเดรียจีโนมของเป็ดปักกิ่ง (Peking duck) พบว่าบริเวณที่ศึกษาดังกล่าวกำหนดการสร้างโปรตีน 8ชนิด tRNA 11 ชนิด และบางส่วนของ ribosomal subunit และส่วน control region มีลักษณะการจัดเรียงตัวของยีนใกล้เคียงกับของไก่ แต่แตกต่างจากสัตว์มีกระดูกสันหลังชนิดอื่น ตามที่ได้กล่าวมาแล้ว



ภาพที่ 3 การจัดเรียงยีนที่เป็นองค์ประกอบของไมโตคอนเดรียจีโนม ในสัตว์มีกระดูกสันหลัง

ที่มา : Cyan (2005)



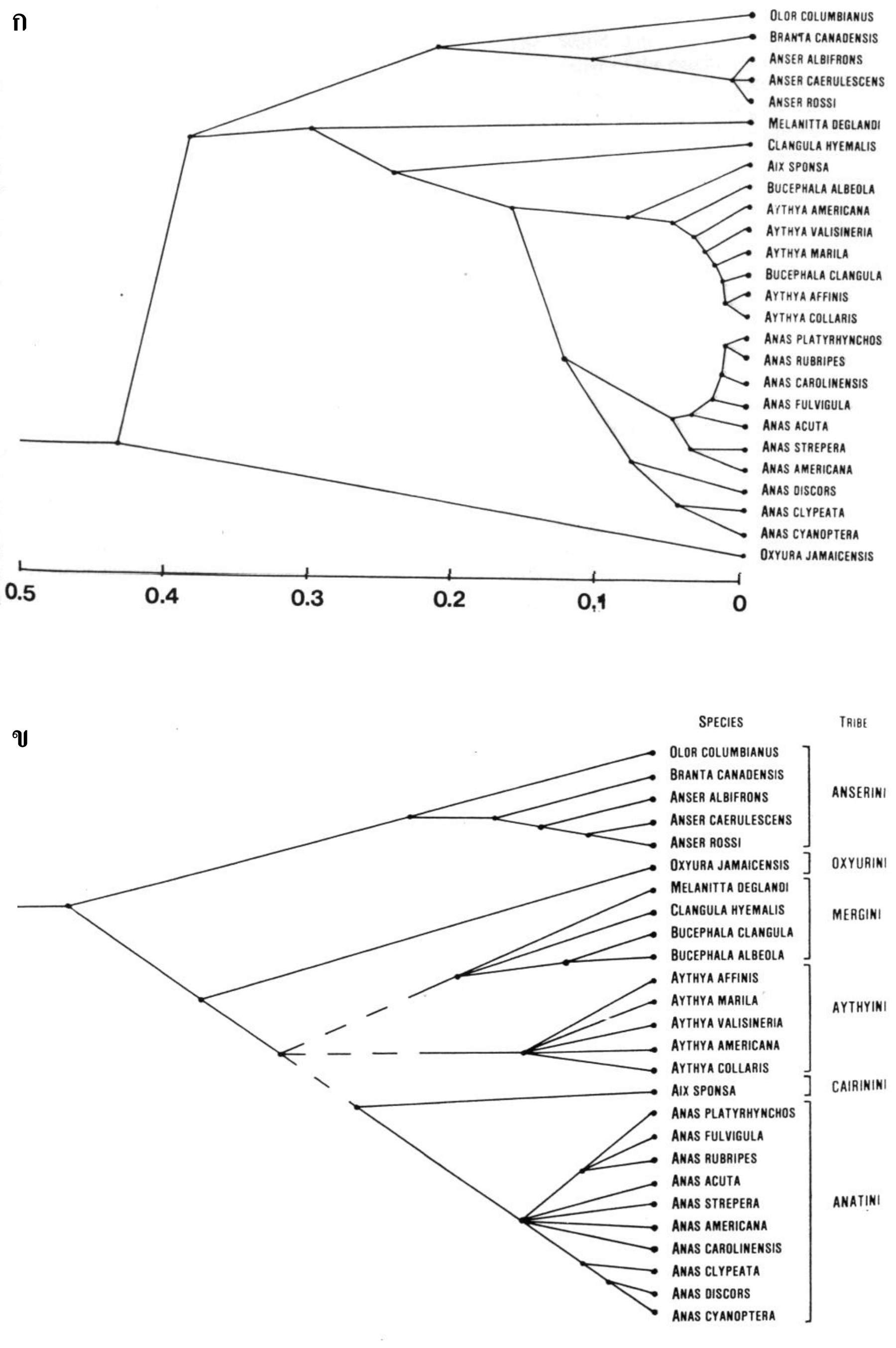
ภาพที่ 4 เปรียบเทียบลักษณะการจัดเรียงยีนของไมโตคอนเดรียจีโนมระหว่างสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (ก) และสัตว์ปีก (ข) ซึ่งในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมพบยีนที่ติดอยู่กับ D-loop คือ $tRNA^{Pro}$ $tRNA^{Thr}$ cytochrome b ตามลำดับ แล้วต่อด้วยยีน $tRNA^{Glu}$ และ ND6 ขณะที่ในสัตว์ปีกพบยีน ND6 และ $tRNA^{Glu}$ อยู่ติดกับ D-loop โดยตรง

ที่มา : Desjardins and Morais (1990)

การใช้ประโยชน์ไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอเพื่อศึกษาวิวัฒนาการระดับพันธุกรรมในสัตว์ปีกประเภทนกน้ำ (waterfowl)

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการ (phylogenetic analysis) ของสิ่งมีชีวิตเพื่อการจัดแบ่งหมวดหมู่ โดยอาศัยการเปรียบเทียบความเหมือนหรือความแตกต่างของการเรียงลำดับเบสของดีเอ็นเอ (DNA sequence) หรือลำดับกรดอะมิโน (amino acid sequence) ของโปรตีน เป็นที่ยอมรับในปัจจุบันว่ามีประสิทธิภาพมากเพราะการเรียงลำดับของสารชีวโมเลกุลดังกล่าวเป็นลักษณะจำเพาะของสิ่งมีชีวิตแต่ละตัว ทำให้สามารถจัดจำแนกสิ่งมีชีวิตออกจากกัน โดยอาศัยความเหมือนหรือแตกต่างของการเรียงลำดับสารชีวโมเลกุลดังกล่าว (Jermann *et al.*, 1995) ประกอบกับเทคนิคสมัยใหม่ทางพันธุวิศวกรรม เช่น พีซีอาร์ (PCR, polymerase chain reaction) สามารถเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอและนำไปตรวจวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยเครื่องอัตโนมัติได้ ทำให้สามารถวิเคราะห์ได้จากจีโนม (genome) หรือบางส่วนของดีเอ็นเอ ดังนั้นข้อมูลพันธุกรรมจึงเป็นเครื่องมือสำคัญสำหรับการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต และเป็นที่นิยมใช้เพื่อการวิเคราะห์ความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ โดยเฉพาะสัตว์ปีกประเภทนกน้ำ (waterfowl) เนื่องจากสามารถจัดจำแนกสปีชีส์ได้ชัดเจนและง่ายต่อการทำความเข้าใจ (Omland, 1997) และงานวิจัยในต่างประเทศมีการศึกษากันอย่างกว้างขวาง รวมถึงสัตว์ปีกในสกุล Anas ด้วย

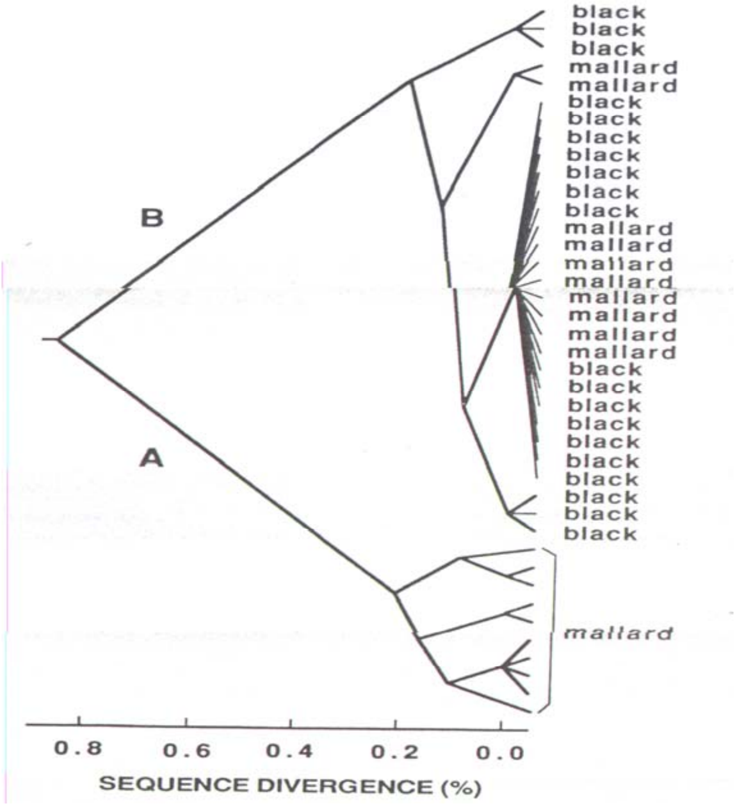
แต่เดิม Patton and Avise (1986) ศึกษาวิวัฒนาการระดับพันธุกรรมของนกน้ำจำนวน 26 สปีชีส์ โดยอาศัยการเปรียบเทียบข้อมูลของ protein electrophoretic data และจัดจำแนกนกน้ำเป็น 2 กลุ่มใหญ่ และ 6 กลุ่มย่อย (ภาพที่ 5ก) ซึ่งสอดคล้องกับการจัดจำแนกโดยอาศัยการเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและพฤติกรรมที่รายงานโดย Delacour and Mayr (1945) และ Johnsgard (1968) (ภาพที่ 5ข) ดังนั้นจึงให้ความเห็นว่า การศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการสามารถใช้ข้อมูลทางพันธุกรรมมาเป็นประโยชน์สำหรับการจัดจำแนกชนิดและสกุลของสัตว์ปีกดังกล่าวได้



ภาพที่ 5 เปรียบเทียบแผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของนกน้ำโดยการจำแนกระหว่าง (ก) การจำแนกโดยอาศัยการวิเคราะห์ protein electrophoretic data ของ Patton and Avise (1986) และ (ข) การเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและพฤติกรรมของ Delacour and Mayr (1945) และ Johnsgard (1968)

ที่มา : Patton and Avise (1986)

Avise *et al*. (1990) เป็นบุคคลกลุ่มแรกๆที่ใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลเพื่อศึกษาและจำแนกชนิดของเป็ดในระดับพันธุกรรมโดยใช้เทคนิค Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) แล้วเปรียบเทียบรูปแบบการแสดงออกของลักษณะการตัดดีเอ็นเอจากไมโตคอนเดรียด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ซึ่งการศึกษาครั้งนี้ได้แสดงให้เห็นถึงการแบ่งกลุ่มสายวิวัฒนาการของเป็ดป่าหัวเขียว (Mallard, *Anas platyrhynchos*) เป็น 2 กลุ่ม คือ type A haplotype ประกอบด้วยกลุ่มของเป็ดป่าหัวเขียวทั้งหมด และ type B haplotype ที่ประกอบด้วยกลุ่มของเป็ดป่าหัวเขียวและเป็ดดำ (*A. rubripes*) อยู่ร่วมกัน จึงเป็นหลักฐานที่แสดงให้เห็นว่าวิวัฒนาการของเป็ดป่าหัวเขียว และเป็ดดำ มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมาก ดังภาพที่ 6

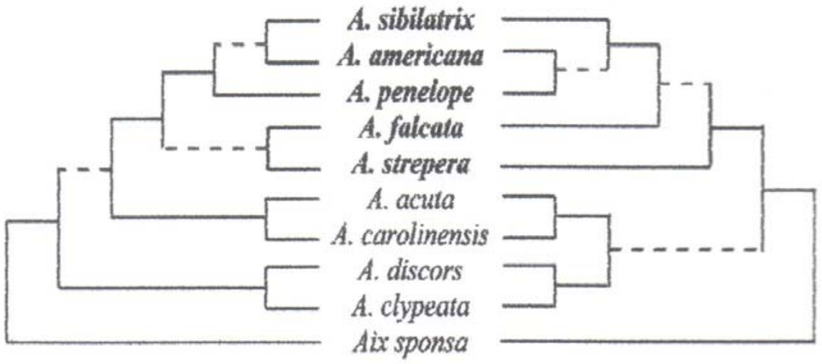


ภาพที่ 6 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของเป็ดป่าหัวเขียว และเป็ดดำ (black duck) โดยการวิเคราะห์ไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิค RFLP แล้วคำนวณหาค่าระยะห่างทางพันธุกรรมและสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยวิธี UPGMA โดยกำหนดให้เป็ดแต่ละตัวเป็นตัวแทนในการศึกษา

ที่มา : Avise *et al*., (1990)

Johnson and Sorenson (1998) ศึกษาวิวัฒนาการระดับโมเลกุลของเป็ดกลุ่ม dabbling duck (Anatini) โดยการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน 2 ชนิดคือ cytochrome *b (cyt b)* และ NADH dehydrogenase subunit 2 (ND2) ภายในไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอที่ได้มาจากเป็ดแต่ละชนิด พบว่าแผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่สร้างขึ้นจากความเหมือนหรือแตกต่างของลำดับเบสจากยีน *cyt b* ให้ผลไม่แตกต่างจากที่สร้างจากยีน ND2 นอกจากนี้พบว่าความผันแปรทางพันธุกรรมที่เกิดขึ้นภายในยีนทั้งสองมีอัตราการเกิดและลักษณะที่เปลี่ยนแปลงไปคล้ายคลึงกัน กล่าวคือพบเป็นส่วนใหญ่ว่ามีการแทนที่ของกรดอะมิโน isoleucine ด้วย valine และการแทนที่ของกรดอะมิโน threonine ด้วย alanine ทั้งนี้เข้าใจว่าเป็นผลมาจากการแทนที่เบส adenine (A) ด้วย guanine (G) ในตำแหน่งแรกของ codon ดังนั้นจึงแสดงให้เห็นว่าการจัดจำแนกกลุ่มของเป็ด dabbling duck โดยอาศัยลักษณะทางพันธุกรรมของยีน *cyt b* และ ND2 ให้ผลใกล้เคียงกัน และเป็นประโยชน์ต่อการจัดจำแนกสายพันธุ์ในระดับชนิด (species) ของเป็ดดังกล่าว

นอกจากนี้ในปี ค.ศ. 1999 การศึกษาของ Johnson และ Sorenson แสดงให้เห็นว่า การจัดกลุ่มเป็ดภายในแผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ โดยการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน cytochrome *b* และยีน NADH dehydrogenase subunit 2 (ND2) ในไมโตคอนเดรียของเป็ดกลุ่ม dabbling ducks (tribe Anatini) ให้ผลการวิเคราะห์บางส่วนของการ แตกต่างจากผลของการใช้วิธีเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphological phylogeny) ของ Livezey (1991) ยกตัวอย่างเช่น การจำแนกของ Livezey โดยอาศัยลักษณะภายนอกและพฤติกรรมจัดให้นกเป็ดน้ำ *A. penelope* และ *A. Americana* อยู่ในกลุ่มที่ใกล้ชิดกันและห่างออกจากนกเป็ดน้ำ *A. sibilatrix* ขณะที่ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนทั้งสองดังกล่าวจัดให้นกเป็ดน้ำ *A. americana* และนกเป็ดน้ำ *A.sibilatrix* อยู่ในกลุ่มใกล้ชิดกันและห่างออกจาก *A. penelope* (ภาพที่7)

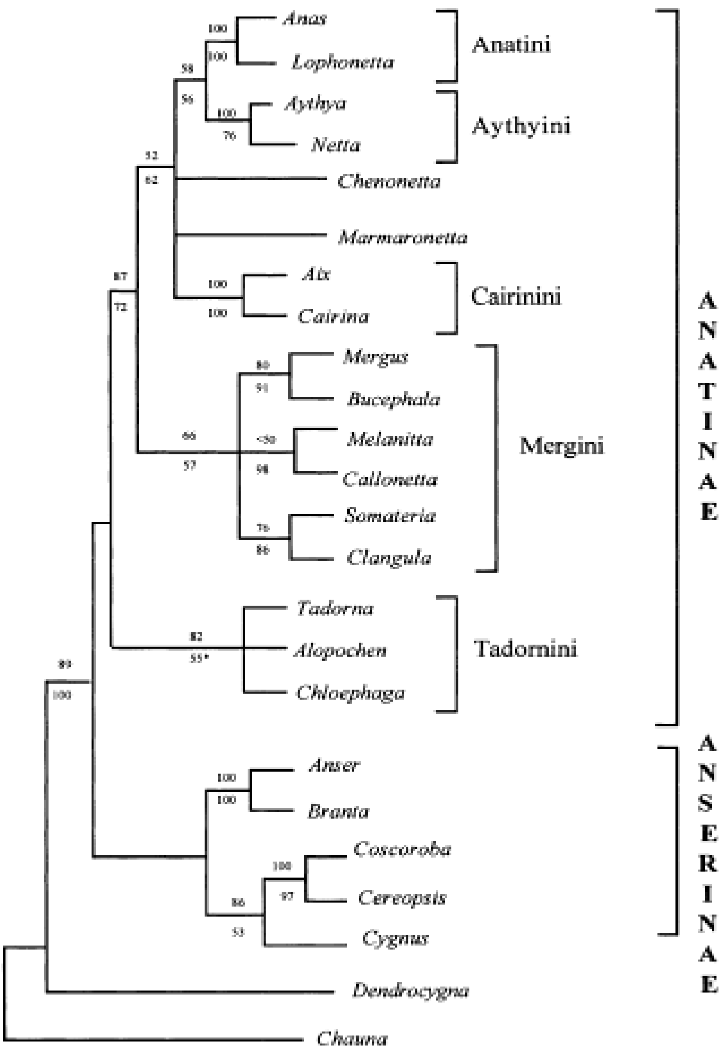


ภาพที่7 แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของนกน้ำสกุล Anas โดยอาศัย (ก) การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน ND2 ร่วมกับ cytochrome *b* จากไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอ (Johnson and Sorenson, 1999) และ (ข) ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Livezey, 1991) สปีชีส์ที่ใช้อักษรตัวหนาคือนกเป็ดน้ำและเส้นประในแขนงแสดงถึงความแตกต่างจากการจัดจำแนกทั้งสองวิธี

ที่มา : Johnson and Sorenson (1999)

Donne-Goussé *et al.* (2002) ศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของสัตว์ปีกในอันดับ Anseriformes จำนวน 45 ชนิด 24 สกุลด้วยการจัดจำแนกกลุ่มโดยอาศัยการเปรียบเทียบความเหมือนหรือแตกต่างลำดับนิวคลีโอไทด์ของไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอ 3 ตำแหน่งคือ control region หรือยีน cytochrome *b* หรือยีน NADH dehydrogenase subunit 2 (ND2) จากนกแต่ละชนิด และพบว่าการสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ โดยอาศัยการเปรียบเทียบบริเวณ control ให้ความชัดเจนของการแบ่งกลุ่ม และให้ผลสอดคล้องกับการสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ ที่มีรายงานไว้โดย Livezey (1997) ดีกว่าการสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยอาศัยการเปรียบเทียบบริเวณของยีน *cyt b* หรือ ND2 นอกจากนี้การจัดแบ่งกลุ่มโดยอาศัยการเปรียบเทียบลักษณะทางพันธุกรรมดังกล่าว สามารถแบ่งนกในอันดับ Anseriformes ออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ (clades) ที่สอดคล้องกับการแบ่งทางสัณฐานวิทยา ที่แต่เดิมได้แบ่งไว้เป็น 2 วงศ์ย่อย (subfamily) คือ Anatinae และ Anserinae โดยมีการแยกนกสกุล Chauna และ Dendrocygna ออกมาจากนกทั้งสองกลุ่ม ในช่วงแรกของการจัดอันดับ (ภาพที่ 8) และจากการศึกษานี้เป็ดสกุล Anas ได้รับการจัดไว้ในอันดับ (order) Anseriformes วงศ์ย่อย (subfamily) Anatinae เผ่า (tribe) Anatini จากผลการศึกษาดังกล่าว Donne-Goussé และคณะ (2002) ได้สรุปว่าการเปรียบเทียบลำดับ

เบสของไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอบริเวณ control เป็นเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพสำหรับการจัดจำแนกกลุ่มของนก จึงมีประโยชน์อย่างยิ่งต่อการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของนก ทั้งในระดับชนิด (species) และระดับวงศ์ (family)

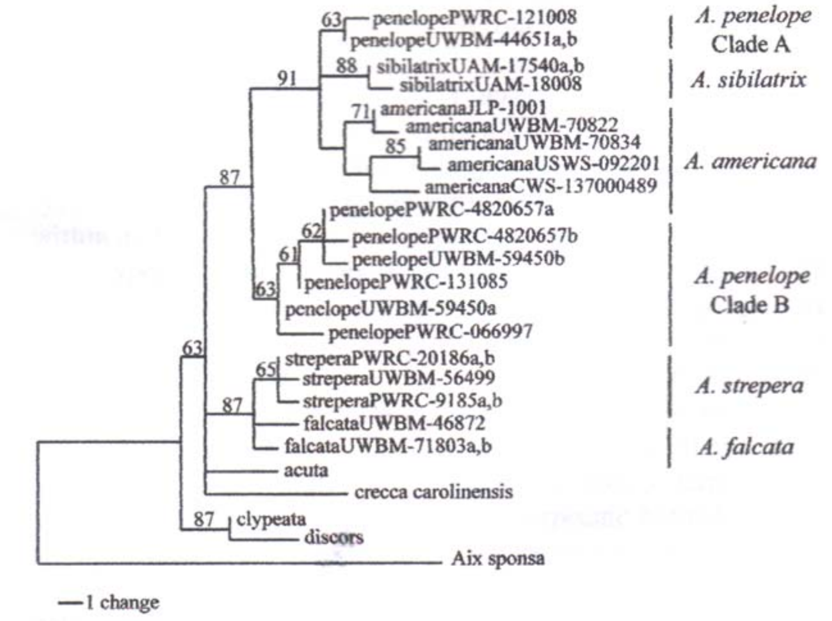


ภาพที่ 8 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของนกน้ำในอันดับ Anseriformes โดยอาศัยการเปรียบเทียบลำดับเบสของไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอบริเวณ control

ที่มา : Donne-Goussé *et al.* (2002)

Kulikova *et al.* (2004) ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเป็ด eastern spot-billed (*Anas zonorrhyncha*) และเป็ดป่าหัวเขียว (Mallard, *Anas platyrhynchos*) ในประเทศรัสเซีย ด้วยการเปรียบเทียบลำดับเบสในส่วนไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอบริเวณ control (mtDNA control region) และ ornithine decarboxylase intron six (ODC-6) และพบว่าสามารถแยกเป็ดออกได้เป็นสองกลุ่มคือ haplotype A และ haplotype B สอดคล้องกับการศึกษาของ Avise และคณะ (1990) ก่อนหน้านี้ โดยกลุ่ม A ประกอบด้วยเป็ด eastern spot-billed 22 ตัว และเป็ดป่าหัวเขียวจากเอเชีย 78 ตัว และกลุ่ม B ประกอบด้วยเป็ด eastern spot-billed 14 ตัว และเป็ดป่าหัวเขียวจากเอเชีย 4 ตัว และยังพบว่าเป็ด eastern spot-billed มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับเป็ด North America's Mottled เป็ด American black และเป็ด Mexican ด้วย

Peters *et al.* (2005) ศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของนกเป็ดน้ำในวงศ์ Anatidae สกุล Anas ทั้งหมด 5 สปีชีส์ โดยเปรียบเทียบลำดับเบสของไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอบริเวณ control และลำดับเบสของนิวเคลียดีเอ็นเอบริเวณ nuclear intron Z-chromosome-linked chromo-helicase binding protein gene (CHD1Zb และ CHD1Za) พร้อมทั้งเปรียบเทียบผลการศึกษาที่ได้ร่วมกับการจัดจำแนกกลุ่มโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการวิเคราะห์ในส่วน mtDNA protein coding gene ที่เคยมีการรายงานไว้ก่อนหน้านี้(Livezey, 1991; Johnson and Sorenson, 1999) และพบว่าการจัดจำแนกความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยอาศัยการเปรียบเทียบลำดับเบสจาก nuclear intron ร่วมกับไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอบริเวณ control สามารถสร้างแผนภูมิที่มีการจัดรูปแบบแขนง (branch) ได้ชัดเจนดีกว่าการจัดจำแนกด้วยการเปรียบเทียบลำดับเบสจาก mtDNA protein coding gene หรือการเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาอย่างใดอย่างหนึ่ง และยังพบว่าการวิเคราะห์โดยใช้ลำดับเบสส่วน nuclear intron ร่วมกับไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอแสดงผลการจำแนกนกเป็ดน้ำที่อยู่ในสปีชีส์เดียวกันออกเป็นกลุ่มได้ค่อนข้างชัดเจน (ภาพที่ 9)



ภาพที่ 9 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของนกเป็ดน้ำในสกุล Anas โดยการวิเคราะห์ลำดับเบสของ nuclear intron ร่วมกับไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอบริเวณ control region

ที่มา : Peters *et al.* (2005)

Kulikova *et al*. (2005) วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเป็ดป่าหัวเขียว (Mallard, *Anas platyrhynchos*) ที่แพร่กระจายอยู่ตามแหล่งที่อยู่อาศัยต่างๆในโลก ด้วยวิธีการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอบริเวณ control พบว่าสามารถจำแนกความแตกต่างของเป็ดป่า Mallard ออกได้เป็นสองกลุ่มคือ haplotype A และ haplotype B สอดคล้องกับการศึกษาของ Avise และคณะ (1990) โดย haplotype A พบมากบริเวณรัสเซียตะวันตก เอเชียตอนเหนือและหมู่เกาะ Aleutian ส่วน haplotype B พบบริเวณหมู่เกาะ Alaska ประเทศสหรัฐอเมริกาเป็นส่วนใหญ่ และสามารถพบได้ในเขตเอเชียตอนหนือและหมู่เกาะ Aleutian เพียงเล็กน้อย แต่ไม่พบในเขตรัสเซียตะวันออก

อย่างไรก็ตามการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของเป็ดไม่สามารถใช้การสุ่มเลือกตัวอย่างเป็ดเพียงตัวใดตัวหนึ่งเพื่อนำดีเอ็นเอจากไมโตคอนเดรียมาใช้เป็นตัวแทนของกลุ่ม (species) ได้ เนื่องจากในระยะ 2-3 ล้านปีที่ผ่านมา เป็ดสกุล Anas มีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมก่อให้เกิดลักษณะที่แตกต่างไปจากบรรพบุรุษได้อย่างรวดเร็ว และอาจเป็นไปได้ว่าช่วงเวลา

ดังกล่าวไม่พอเพียงต่อการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสในไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอ ให้เกิดการแยกกลุ่มเดี่ยว (monophyly) ระหว่างเป็ดชนิดที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน อีกประการหนึ่งคือ เป็ดสกุล Anas หลายชนิดมีการกระจายตัวไปทั่วโลกอย่างกว้างขวาง จึงอาจเป็นสาเหตุให้ไม่สามารถตรวจพบลักษณะทางพันธุกรรมบางอย่างของบรรพบุรุษที่มีการเก็บจำไว้ (cryptic lineages) จากตัวอย่างที่สุ่มเลือกมาเพียงหนึ่งตัว นอกจากนี้เป็ดสกุล Anas มีความสามารถในการผสมข้ามสายพันธุ์ (hybridization) และให้ลูกที่สามารถสืบพันธุ์ต่อไปได้ (Rhymer and Simberloff, 1996) ซึ่งการเกิด interspecific hybridization ได้เป็ดลูกผสมดังกล่าว อาจเป็นเหตุผลที่สามารถอธิบายถึงการเกิดความสัมพันธ์แบบ polyphyly ของการจัดกลุ่มเป็ดตามที่มีรายงานไว้โดย Kulikova *et al.* (2004) หรือ McCracken *et al.* (2001) หรือ Rhymer *et al.* (1996) และอาจเป็นผลให้การวิเคราะห์ผิดพลาดได้หากมีการสุ่มใช้ตัวอย่างเพียงตัวเดียว ดังนั้นจึงควรมีการสุ่มเลือกตัวอย่างเป็ดแต่ละชนิดเป็นจำนวนหลายๆตัว เพื่อให้ได้ผลสรุปที่เป็นตัวแทนของประชากรเป็ดชนิดนั้นๆได้ (Perters *et al.*, 2005)

ไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ (microsatellite DNA)

ไมโครแซทเทลไลท์ เป็นกลุ่มดีเอ็นเอที่มีเบสซ้ำ (repetitive DNA) แบบต่อเนื่อง (tandem repeat) ตั้งแต่ 1-6 เบส พบได้ในจีโนมของสิ่งมีชีวิตทั้งยูคารีโอทและโปรคารีโอท กระจายอยู่ทั้งในส่วนของ coding region และ non-coding region (Huang *et al.*, 2005) เนื่องจากไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอมีลักษณะเป็นลำดับเบสซ้ำขนาดสั้นๆไม่ซับซ้อน จึงมีชื่อเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า simple sequence repeat (SSR) หรือ short tandem repeat (STR) โดยส่วนใหญ่เบสซ้ำเหล่านี้มีลำดับเบสที่จำเพาะ (unique sequence) อยู่บริเวณปลาย 3′ และ 5′ ของเบสซ้ำดังกล่าว จากลักษณะเฉพาะนี้สามารถออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับบริเวณนี้ได้ เรียกว่า microsatellite primer หรือ SSR primer เมื่อไพรเมอร์เหล่านี้เพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอส่วนที่เป็นเบสซ้ำต่อเนื่องที่อยู่ระหว่าง forward และ reverse primers ทำให้เกิดขนาดของผลผลิตพีซีอาร์ที่มีขนาดจำเพาะ และมีขนาดหลากหลาย อันเป็นผลมาจากจำนวนครั้งของเบสซ้ำที่ไม่เท่ากันของสัตว์แต่ละตัว จึงสามารถนำมาพัฒนาเป็นเครื่องหมายโมเลกุลได้ (Brown *et al.*, 1996)

เอกลักษณ์และคุณสมบัติเด่นเฉพาะตัวที่ทำให้ไมโครแซทเทลไลท์กลายเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ดีที่สุดตัวหนึ่งในการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (สุรีพร, 2546) คือ

1. ลักษณะที่มีหลายอัลลีลในโลกัส (muti-alletic nature) ทำให้ตรวจสอบความแตกต่างได้มากกว่าเครื่องหมายโมเลกุลชนิดอื่น

2. มีการถ่ายทอดลักษณะที่เป็นแบบข่มไม่สมบูรณ์ (co-dominant transmittion)

3. ตรวจสอบได้ง่ายด้วยเทคนิคพีซีอาร์ และต้องการดีเอ็นเอเพียงเล็กน้อย

4. พบได้ครอบคลุมทั้งจีโนม

จากจุดเด่นดังกล่าวทำให้มีการประยุกต์ใช้เทคนิคไมโครแซทเทลไลท์ในการจำแนกสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตอย่างแพร่หลาย อย่างไรก็ตามแม้ไมโครแซทเทลไลท์จะเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ให้ข้อมูลทางพันธุกรรมได้มากมาย แต่พบว่ามีข้อจำกัดที่สำคัญคือ การพัฒนาหรือค้นหาไมโครแซทเทลไลท์ไพรเมอร์มีค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูงมาก จึงเป็นอุปสรรคสำหรับการศึกษาสิ่งมีชีวิตที่ไม่มีข้อมูลลำดับเบสใน GenBank

การใช้ประโยชน์ไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอเพื่อการศึกษาวิวัฒนาการด้านพันธุกรรมในสัตว์ปีกประเภทนกน้ำ (waterfowl)

ปัจจุบันการศึกษาเกี่ยวกับพันธุกรรมของสัตว์ปีกประเภทนกน้ำ ได้มีการนำไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอมาประยุกต์ใช้เป็นเครื่องมือในการศึกษาอย่างแพร่หลาย เนื่องจากมีขนาดสั้นไม่ซับซ้อนมีความหลากหลายในรูปแบบสูง (high polymorphism) และได้มีการพัฒนา microsatellite markers ที่จำเพาะเจาะจงกับเป็ดมาใช้ประโยชน์แล้ว

Maak *et al.* (2003) รายงานผลการศึกษาลักษณะไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ 18 แบบ ในเป็ดปักกิ่ง (Peking duck) และพัฒนา microsatellite primers เพื่อทดลองวิเคราะห์กับเป็ดชนิดอื่นได้แก่ เป็ดป่าหัวเขียว (Mallard) เป็ดเทศ (muscovy duck) และนกน้ำสกุลอื่นๆ ในวงศ์ Anatinae และ Anserinae พบว่าไพรเมอร์ทั้ง 18 คู่สามารถเพิ่มปริมาณไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอในเป็ดปักกิ่งแบบ polymorphic 17 คู่ และ monomorphic 1 คู่ จำนวนอัลลิลอยู่ในช่วง 1-6 และมีค่าเฉลี่ยอัลลิล 3.5 ต่อตำแหน่ง ขณะที่ไพรเมอร์ทุกคู่สามารถเพิ่มปริมาณไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอในเป็ดป่าหัวเขียวได้เป็นแบบ polymorphic ทั้งหมด มีจำนวนอัลลิลอยู่ในช่วง 2-8 อัลลิล แต่สามารถเพิ่ม

ปริมาณไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอได้เพียง 17 คู่ในเป็ดเทศ และมีไพรเมอร์เพียง 11 คู่ที่ให้ผลแบบ polymorphic อย่างไรก็ตามคู่ไพรเมอร์ส่วนใหญ่ไม่สามารถใช้เพิ่มปริมาณไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ (ไม่เกิดผลผลิตพีซีอาร์) ในนกน้ำชนิดอื่นที่อยู่ในวงศ์ย่อย (subfamily) Anatinae และ Anserinae หรือให้ผลผลิตที่แตกต่างกันตามชนิดของนก และลักษณะไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นส่วนใหญ่เป็นแบบ monomorphic ดังนั้นไมโครแซทเทลไลท์ไพรเมอร์ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้มีความจำเพาะต่อการใช้ศึกษาความหลากหลายในระดับสกุลของเป็ด แต่ไม่เหมาะสำหรับนำไปใช้ในนกน้ำชนิดอื่น

Slavénaité *et al.* (2004) ทำการศึกษาเปรียบเทียบ genomic DNA ของเป็ด Mallard (*Anas platyrhynchos*) โดยใช้ไมโครแซทเทลไลท์ไพรเมอร์ที่จำเพาะของไก่ พบว่าการใช้ไมโครแซทเทลไลท์ไพรเมอร์ ของไก่ 3 คู่ ได้แก่ ALD-115 ALD-209 และ ALD-231 สามารถนำมาประยุกต์ใช้เพื่องานวิจัยด้านพันธุศาสตร์ประชากรของสัตว์ปีกวงศ์นกเป็ดน้ำ (Anatidae) ในแง่ของโครงสร้างของประชากรและการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรม แม้ว่าเครื่องหมายทางพันธุกรรมเหล่านี้ไม่สามารถระบุตำแหน่งที่แน่ชัดและอาจไม่มีผลต่อลักษณะความหลากหลาย แต่สามารถใช้เป็นข้อมูลประกอบการคัดเลือกลักษณะที่ดีในการปรับปรุงสายพันธุ์

Huang *et al.* (2005) ทำการวิจัยเพื่อค้นหา microsatellite markers ที่จำเพาะสำหรับเป็ดเพื่อนำมาพัฒนา universal microsatellite primers และใช้ระบุหาตำแหน่งที่มีลักษณะเหมือนกัน (homologous loci) ในไก่ นกยูงและห่าน โดยการสร้าง microsatellite-enriched library ด้วยวิธี selective hybridization ไพรเมอร์ที่ออกแบบได้ 35 คู่ ถูกนำมาเพิ่มปริมาณไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอในสัตว์ปีก 4 ชนิดคือ เป็ดปักกิ่ง ไก่ ห่าน และนกยูง ด้วยวิธี multiplex PCR ผลที่ได้พบว่าไพรเมอร์ทั้ง 35 คู่สามารถเพิ่มปริมาณไมโครแซเทลไลท์ดีเอ็นเอในเป็ดปักกิ่งได้เป็นแบบ polymorphic 28 คู่ และแบบ monomorphic 7 คู่ มีจำนวนอัลลิลในส่วนของ polymorphic ทั้งหมด 117 อัลลิล มีค่าตั้งแต่ 2-14 เฉลี่ย 4.18 ต่อตำแหน่ง ค่าความถี่ของทั้ง 117 อัลลิล มีค่าตั้งแต่ 0.02-0.98 ค่า heterozygosity สูงสุด 0.97 และต่ำสุด 0.04 และมี 11 ตำแหน่งที่มีค่า heterozygosity มากกว่า 0.5 คิดเป็น 46.43% ค่า polymorphism information content (PIC) ของ polymorphic ทั้ง 28 ตำแหน่งมีค่าตั้งแต่ 0.04-0.88 เฉลี่ย 0.42 สำหรับผลในสปีชีส์อื่นๆพบว่า ในไก่มีคู่ไพรเมอร์ 2 คู่ที่ให้ผลผลิตเป็น specific monomorphic ในห่านมีคู่ไพรเมอร์ 14 คู่ที่ให้ผลผลิตเป็น specific fragment โดยมีผลผลิตเป็น polymorphic 5 คู่ และ monomorphic 9 คู่ และไม่พบผลผลิตที่จำเพาะในนกยูง เมื่อเปรียบเทียบลำดับเบสในบริเวณ flanking และ repeat สรุปได้ว่าทั้งไก่และห่านมี homologous loci

เดียวกันกับในเป็ด microsatellite markers ที่วิเคราะห์ได้จากการศึกษาครั้งนี้สามารถนำไปใช้เป็นเครื่องมือในการศึกษาการสร้างแผนที่ยีน และการศึกษาด้านวิวัฒนาการในเป็ดและห่านได้

การสกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction)

การศึกษาโครงสร้างและการทำหน้าที่ของยีนชนิดใดชนิดหนึ่ง หรือการศึกษาถึงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการและความหลากหลายระดับโมเลกุลของสิ่งมีชีวิตต้องการตัวอย่างดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์และมีคุณภาพดี การสกัดดีเอ็นเอออกมาจากตัวอย่างจึงเป็นประเด็นหนึ่งที่ต้องคำนึงถึงในการศึกษา ซึ่งวิธีการสกัดดีเอ็นเอมีอยู่หลายวิธี แต่ละวิธีก็มีความเหมาะสมกับชนิดของเนื้อเยื่อหรือเซลล์แต่ละชนิด และงานที่จะต้องนำไปใช้ สำหรับวิธีการสกัดดีเอ็นเอที่นิยมคือการย่อยด้วย proteinase K ร่วมกับ Sodium dodecyl sulfate (SDS) เพื่อทำให้ผนังเยื่อหุ้มเซลล์และออร์แกเนลล์ต่างๆแตก ทำให้ดีเอ็นเอถูกปล่อยออกมา จากนั้นจะนำสารละลายมาปั่นแยกเพื่อเอาเศษของเซลล์ออก เหลือเพียงดีเอ็นเอละลายอยู่ในส่วนของน้ำ นำส่วนน้ำมาตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยเกลือและอัลกอฮอล์ แล้วจึงนำตะกอนของดีเอ็นเอมาละลายในน้ำหรือบัฟเฟอร์ เพื่อนำไปศึกษาในขั้นต่อไป วิธีการสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ proteinase K ร่วมกับ SDS นี้จะได้ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพดี และมีปริมาณมาก ดีเอ็นเอที่สกัดได้มีลักษณะเป็น double strand ซึ่งเหมาะสำหรับการนำมาวิเคราะห์ต่อโดยวิธีพีซีอาร์ และ อาร์เอฟแอลพี (restriction fragment length, RFLP) (Rascati, 2003)

นอกจากวิธีการย่อยด้วย proteinase K ร่วมกับ SDS ที่กล่าวมาแล้ว ปัจจุบันมีการคิดค้นวิธีการสกัดดีเอ็นเอแบบใหม่ขึ้นมามากมายเพื่อเป็นการลดต้นทุนและประหยัดเวลา การสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี rapid simple alkaline extraction หรือ sodium hydroxide (NaOH) extraction เป็นอีกวิธีการหนึ่งที่สามารถนำมาใช้สกัดดีเอ็นเอได้ โดยวิธีการคือ การให้ความร้อนสูง (ประมาณ 98-100 องศาเซลเซียส) เพื่อให้เซลล์ของตัวอย่างที่อยู่ในโซเดียมไฮดรอกไซด์แตก และโซเดียมไฮดรอกไซด์ทำให้โปรตีนต่างๆเสียสภาพ และทำลายอาร์เอ็นเอ จากนั้นสารละลายที่ได้จะถูกทำให้เป็นกลางด้วย Tris-HCl buffer (Rascati, 2003) ก่อนแยกดีเอ็นเอออกจากสารละลายด้วยวิธี phenol-chloroform extraction ตามปกติ

ในปี ค.ศ. 2002 Malagó และคณะ ศึกษาการคัดแยกเพศของนกกระจอกเทศด้วยเทคนิค พีซีอาร์ การศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยได้สกัดดีเอ็นเอจากขนนกโดยวิธี rapid simple alkaline extraction โดยให้ความร้อน 75 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แก่ขนที่จุ่มอยู่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ แล้วทำให้สารละลายเป็นกลางด้วย Tris-HCl จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบสำหรับเทคนิคพีซีอาร์ทันที ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มีความถูกต้อง น่าเชื่อถือ ถือเป็นวิธีที่ประหยัด ปลอดภัย และง่ายต่อการปฏิบัติ

Graffy and Foran (2005) ศึกษาการสกัดไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอจากตัวอย่างผมมนุษย์ด้วยวิธี simple alkaline digestion โดยทำการย่อยตัวอย่างรากผมด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่อุณหภูมิห้องและทำการเขย่าด้วยเครื่อง vortex mixture หรือ rocker ตลอดเวลาจนกระทั่งเส้นผมละลาย จากนั้นเติม Tris-HCl เพื่อทำให้สารละลายเป็นกลาง ก่อนนำสารละลายไปกรองผ่าน spin column และล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยสารละลาย TE buffer ในปริมาณที่เหมาะสม การสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีนี้สามารถเพิ่มปริมาณไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ได้เป็นผลสำเร็จคิดเป็น 90 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสูงกว่าเมื่อเทียบกับวิธีการสกัดด้วยวิธีบดด้วยโกร่ง (glass grinding/organic extraction method) ที่มีเปอร์เซ็นต์สำเร็จเพียง 73 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้การย่อยด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่อุณหภูมิห้องใช้เวลาประมาณ 6-7 ชั่วโมง ซึ่งเร็วกว่าการบดด้วยโกร่งที่ใช้เวลาถึง 22-24 ชั่วโมง ผลการศึกษาครั้งนี้บ่งถึงความสำเร็จในการสกัดไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอโดยวิธี alkaline extraction จากเส้นผม เพื่อนำมาเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ซึ่งวิธีการนี้สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการศึกษาทางนิติเวช

อย่างไรก็ตามการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีการย่อยด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์จะได้ดีเอ็นเอที่แยกเป็นสายเดี่ยว แตกต่างจากการสกัดด้วยวิธีการย่อยด้วย proteinase K ร่วมกับ SDS ที่จะได้ดีเอ็นเอเป็นลักษณะดีเอ็นเอสายคู่ ดังนั้นดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดด้วยวิธี alkaline extraction จึงเหมาะสำหรับการนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่สนใจด้วยเทคนิคพีซีอาร์ระดับหนึ่ง

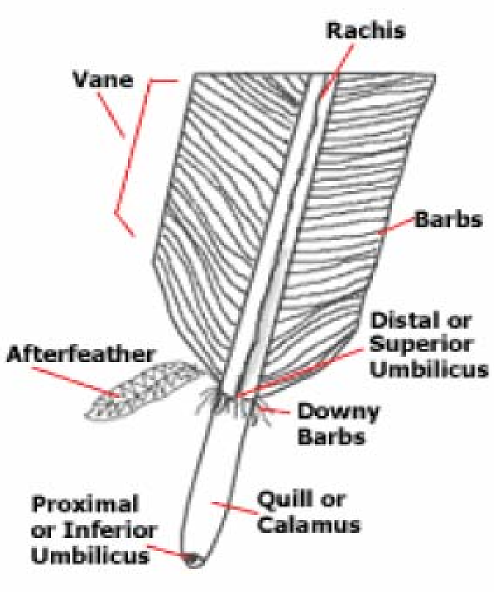
แหล่งของตัวอย่างที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ

ตัวอย่างเนื้อเยื่อจากสัตว์ที่นำมาใช้สกัดดีเอ็นเอเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่สำคัญในการที่จะสกัดดีเอ็นเอให้ได้ปริมาณมากและมีคุณภาพดี เนื้อเยื่อที่สามารถนำมาใช้สกัดดีเอ็นเอมีอยู่หลายชนิด เช่น เลือด เนื้อเยื่อจากอวัยวะต่างๆ รวมถึงขนหรือผม ทั้งนี้ตัวอย่างที่นำมาใช้นั้นควรเป็นตัวอย่างที่เก็บ

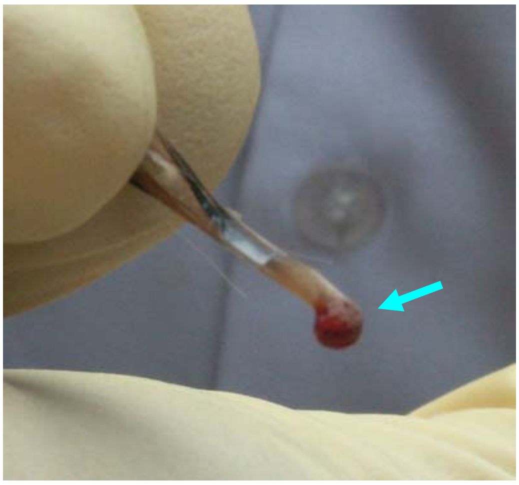
มาขณะสัตว์มีชีวิตหรือตายใหม่ๆ และใช้ปริมาณเพียงเล็กน้อยเท่านั้น การเก็บรักษาตัวอย่างก่อนนำมาทำการสกัดดีเอ็นเอนั้นขึ้นอยู่กับชนิดของตัวอย่างที่ใช้ เนื้อเยื่อนิยมแช่ไว้ในไนโตรเจนเหลว และเก็บแช่แข็งที่อุณหภูมิ - 80 องศาเซลเซียส สำหรับเลือดต้องใส่สารป้องกันการแข็งตัวและเก็บที่อุณหภูมิต่ำ แต่ถ้าต้องการแยกดีเอ็นเอจากไมโตคอนเดรีย เนื้อเยื่อที่ไม่ได้แช่แข็งจะให้ปริมาณดีเอ็นเอที่มากกว่า (สุรินทร์, 2545)

ขนนกหรือผมของมนุษย์สามารถนำมาใช้เป็นตัวอย่างในการสกัดดีเอ็นเอได้ ตัวอย่างขนนกถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายเกี่ยวกับการคัดแยกเพศของนก (Grant, 2001; Malago *et al*., 2002) เนื่องจากเป็นแหล่งของตัวอย่างที่เก็บได้ง่าย โดยเฉพาะนกป่าซึ่งทำการเก็บตัวอย่างได้ค่อนข้างยาก แม้ว่าดีเอ็นเอที่ได้จากขนมีปริมาณน้อยเมื่อเทียบกับตัวอย่างเลือดหรือเนื้อเยื่อ (Gilbert *et al*., 2005) แต่ปัจจุบันเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมสมัยใหม่เช่น พีซีอาร์ สามารถเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอเพื่อนำไปตรวจวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยเครื่องอัตโนมัติได้ (Morin, 1994; Taberlet and Jean, 1991)

รายงานการศึกษาด้านพันธุกรรมสัตว์ปีกหลายฉบับแสดงให้เห็นว่า ขนนกเป็นตัวอย่างของดีเอ็นเอที่ดี และประสบผลสำเร็จในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ได้ผลเป็นที่น่าพอใจ (Horrath *et al*., 2005) ลักษณะทางกายวิภาคของขนนก (ดังแสดงในภาพที่ 10) ส่วน calamus ถูกยึดด้วยเซลล์ของผิวหนังชั้นนอก (epidermis) ซึ่งเป็นชั้นที่ทำหน้าที่สร้างขนเส้นใหม่เมื่อมีการผลัดเปลี่ยนขน (molting) ระยะที่ขนกำลังเจริญงอกออกมา ภายใน calamus บรรจุเซลล์ pulp ซึ่งเป็น recticulum ของ mesoderm อย่างหลวมๆ และมี axial artery vein หล่อเลี้ยง ดังนั้นเมื่อขนถูกดึงออก ผิวหนังส่วน epidermis นี้จะฉีกขาดที่ส่วนฐานของ follicle ในบริเวณของ epidermal collar และมีเศษเซลล์ของ dermis หลุดปนมากับเลือดด้วย (ภาพที่ 11) (วิโรจน์, 2538) ซึ่งเซลล์ที่ได้จากทั้ง pulp เศษเซลล์ และเลือดที่ปะปนมานี้ถือเป็นแหล่งของดีเอ็นเอจากขน

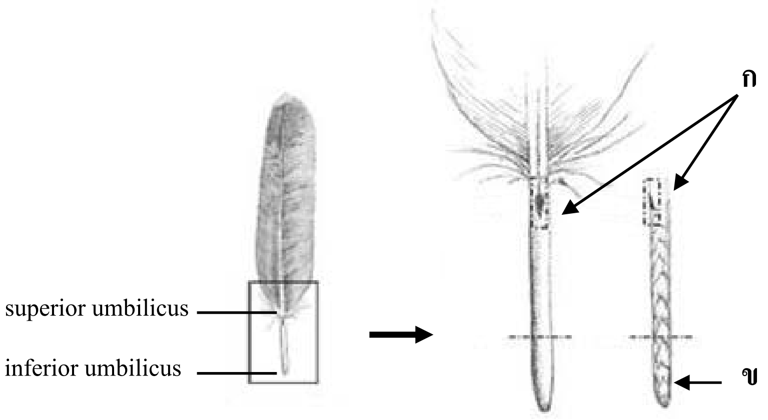


ภาพที่ 10 โครงสร้างและส่วนประกอบของขนนก
ที่มา: Nash (2006)



ภาพที่ 11 ลักษณะขนอ่อนที่ถูกดึงออกมาจากขุมขน พบ pulp cells และเลือดภายใน calamus (ศรชี้)

อย่างไรก็ตามขนที่เจริญเต็มที่แล้ว เซลล์ของ pulp จะตาย และหลอดเลือดถูกดูดซึมหดมาทาง inferior umbilicus ทำให้มองเห็น calamus มีลักษณะเป็นท่อกลวง ดีเอ็นเอจากนิวเคลียสส่วนใหญ่ยังถูกทำลายไปในระหว่างกระบวนการ keratinization (Graffy, 2005) ทำให้เข้าใจว่าไม่เหมาะที่จะใช้ขนแก่ในการสกัดดีเอ็นเอ แต่ Horrath และคณะ (2005) แสดงให้เห็นว่าบริเวณ calamus ของขนแก่ยังมีส่วนของ epidermis หลงเหลืออยู่ในช่องว่าง และบริเวณ superior umbilical อาจมีลิ่มเลือด (blood clot) หลงเหลืออยู่ (ภาพที่ 12) จึงสามารถใช้เป็นแหล่งตัวอย่างสำหรับการสกัดดีเอ็นเอได้เช่นเดียวกัน นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าตัวอย่างขนนกเป็นแหล่งตัวอย่างที่ดีสำหรับการสกัดดีเอ็นเอจากไมโตคอนเดรีย (Leeton, 1993; Payne and Sorenson, 2003; Gillbert, 2005)



ภาพที่ 12 แหล่งของดีเอ็นเอภายในเส้นขน (ก) ลิ่มเลือด (blood clot) ภายใน superior umbilical และ (ข) เซลล์ในบริเวณ basal tip ของ calamus ภายใน inferior umbilical

ที่มา : Horrath *et al.* (2005)

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

ภาคสนาม

1. เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องมือและอุปกรณ์สำหรับใช้ในการเก็บตัวอย่างขนเป็ดพื้นเมืองได้แก่ กรรไกร หลอดเก็บตัวอย่างขนาด 1.5 ซีซี สำลี forceps ถุงมือยาง ถังเก็บความเย็น

2. สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการเก็บตัวอย่างขนได้แก่ เอทธิลอัลกอฮอล์ 70%

ห้องปฏิบัติการ

1. เครื่องมือและอุปกรณ์

1.1 เครื่องปั่นแยกความเร็วสูง (high speed microcentrifuge) ที่ควบคุมอุณหภูมิได้รุ่น Centrifuge 17RS (Heraeus SEPATECH) และ รุ่น Z 233 MK-2 (HERMLE)

1.2 เครื่องปั่นแยกความเร็วสูง (high speed microcentrifuge) รุ่น SIGMA 201M (LABORZENTRIFUGEN)

1.3 เครื่องปั่นแยกสารปริมาณน้อย (microcentrifuge) รุ่น GMC-260 (LabTech)

1.4 Heating block รุ่น Test tube heater SHT1 (STUART SCIENTIFIC)

1.5 ปิเปตอัตโนมัติ (autopipette) รุ่น Pipetman (p10 p20 p200 และ p1000) (GILSON)

1.6 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Helios Alpha 9423 UVA 1002E (Thermo electronic corporation)

1.7 เครื่องสังเคราะห์ดีเอ็นเอ GeneAmp® PCR system 9700 (Appiled Biosystems)

1.8 ชุดเครื่องมืออะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟเรซิสได้แก่ชุด electrophoresis chamber รุ่น AE 6100 บริษัท ATTA (ญี่ปุ่น) และรุ่น DNA SUB CELL™ (Bio-RAD)

1.9 ชุดเครื่องมือโพลีอะครีลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟเรซิสได้แก่ electrophoresis chamber กระจก และหวี รุ่น Mini protean-2 (Bio-RAD)

1.10 เครื่องแปลงกระแสไฟฟ้า รุ่น Power PAC 300 (Bio-RAD)

1.11 เครื่องให้กำเนิดแสงอุลตราไวโอเล็ต (UV transilluminator) พร้อมกล้องดิจิตอล KODAK และโปรแกรม KODAK1-D Image Analysis Software

1.12 เครื่องชั่งละเอียด รุ่น B 120S บริษัท Sartorius (Germany)

1.13 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น GC 842 บริษัท Shott (Germany)

1.14 เครื่องเขย่าตั้งอุณหภูมิได้ (incubator shaker) รุ่น IM550R บริษัท Clayson

1.15 vortex mixure รุ่น G 560E vortex-2 Genie™ (Scientific Industries)

1.16 ตู้ -20 องศาเซลเซียส รุ่น SHF 230SAD บริษัท SANDEN INTERCOOL (Thailand)

1.17 ตู้บ่มเชื้อปรับอุณหภูมิได้ รุ่น EB 208S (Jouan)

1.18 ขวดรูปชมพู่ (flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร และจานเพาะเลี้ยงเชื้อ ซึ่งนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

1.19 Laminar flow พร้อมอุปกรณ์สำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อได้แก่ เข็มเขี่ยเชื้อ แท่งแก้วสำหรับ spread plate ตะเกียงอัลกอฮอล์

1.20 คอมพิวเตอร์และโปรแกรมคอมพิวเตอร์ MEGA (Molecular Evolution Genetic Analysis) version 3.1 (Kumar *et al*., 2004) โปรแกรม DnaSP 4.10 (Rozas *et al*., 2003) โปรแกรม ClustalW (http://www.ebi.ac.uk/clustalw/) โปรแกรม Blastn (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blastn) และโปรแกรม CAP3 Sequence Assembly (http://pbil.univ-lyon1.fr/cap3.php)

2. สารเคมี

2.1 สารเคมีสำหรับการสกัดดีเอ็นเอได้แก่ Lysis buffer (ประกอบด้วย 20 mg/ml Proteinase K, 10% SDS, 3 M Sodium acetate (pH 5.2), 0.2 N NaOH, 0.04 M Tris-HCl pH 7.5, ชุดสกัดดีเอ็นเอ QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN), Phenol-Chloroform-Isoamyl alcohol (25:24:1) v/v, 3 M Sodium acetate pH 5.2, Phosphate buffer solution (PBS) pH 7.4, และเอทธิลอัลกอฮอล์

2.2 สารเคมีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้แก่ dNTPs, Magnesium chloride ($MgCl_2$), PCR buffer, *Taq* DNA polymerase, Primer, ultrapure distilled H_2O

2.3 สารเคมีสำหรับวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสได้แก่ Agarose powder (SIGMA), TBE buffer, Ethidium bromide, 10X BlueJuice Gel Loading buffer (Invitrogen) , DNA marker 1Kb Plus Ladder™ (invitrogen)

2.4 สารเคมีสำหรับวิธีโพลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟเรซิสได้แก่ Acrylamide, bis-acrylamide, ammonium persulfate, TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine), TBE buffer, acetic acid, 10X BlueJuice Gel Loading buffer (Invitrogen), DNA marker 1Kb Plus Ladder™ (invitrogen), ชุดสีย้อม silver stain (STERLING™ Rapid Silver Stain)

2.5 สารเคมีสำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียและการโคลนดีเอ็นเอได้แก่ ampicillin powder, tryptone, yeast extract, sodium chloride (NaCl), sodium hydroxide (NaOH), Agar powder, TOPO cloning Kits (Invitrogen), ชุดสกัด plasmid (QIAprep Miniprep, QIAgen)

วิธีการ

1. การเก็บตัวอย่าง

สุ่มเลือกเป็ดพื้นเมืองไทย (Thai domestic duck) สายพันธุ์ปากน้ำ สายพันธุ์นครปฐม *(Anas platyrhynchos domesticus)* และสายพันธุ์กากีแคมเบลล์ ที่ได้รับการอนุรักษ์ไว้ ณ สถานีบำรุงพันธุ์สัตว์ กรมปศุสัตว์ และแหล่งเลี้ยงในเขตจังหวัดภาคกลาง เพื่อเป็นตัวอย่างสำหรับการศึกษาใช้ Forceps ถอนขนบริเวณหน้าอกหรือใต้ปีก เลือกเก็บขนที่มีลักษณะที่เพิ่งงอกใหม่ และตัดเอาส่วนปลายเหนือจากโคนขึ้นมาประมาณ 3-5 มิลลิเมตร และเก็บในหลอดเก็บตัวอย่างที่บรรจุเอธิลอัลกอฮอล์ 70% โดยเก็บขนหนึ่งขนต่อหนึ่งตัวอย่าง หลีกเลี่ยงการสัมผัสกับตัวอย่างโดยตรง และระมัดระวังการปนเปื้อนจากนั้นเก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ 4°C จนกว่าได้รับการสกัดดีเอ็นเอ

2. การสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดทางการค้า QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN)

นำหลอดที่บรรจุตัวอย่างในเอธิลอัลกอฮอล์ 70% มาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 15,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที แล้วเทส่วนน้ำทิ้งไป จากนั้นเติม 1X PBS ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 15,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนน้ำทิ้ง และทำซ้ำเช่นนี้ อีก 1 รอบ เติมสารละลายบัฟเฟอร์ ATL ปริมาตร 180 ไมโครลิตรและ QIAGEN proteinase K ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยใช้ vortex mixure แล้วอุ่นด้วยความร้อนในเครื่อง test tube heater ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง และเขย่าทุก 15 นาที จากนั้นใช้ forceps คีบเอาขนเป็ดออก แล้วเติมบัฟเฟอร์ AL ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex mixure นาน 15 วินาที และอุ่นด้วยความร้อนในเครื่อง test tube heater ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมเอธิลอัลกอฮอล์ 95% ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex mixure นาน 15 วินาที จากนั้นดูดสารละลายใส่ลงใน QIAprep spin column ที่วางอยู่ใน collection tube นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8,000 rpm

เป็นเวลา 1 นาที เปลี่ยน collection tube ใหม่ แล้วเติมบัพเฟอร์ AW1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 rpm นาน 1 นาที เปลี่ยน collection tube ใหม่ แล้วเติมบัพเฟอร์ AW2 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 rpm นาน 3 นาที เปลี่ยน collection tube ใหม่อีกครั้ง แล้วเติมบัพเฟอร์ AE ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บสารละลายดีเอ็นเอที่ 8,000 rpm นาน 1 นาที เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้งาน

3. การสกัดดีเอ็นเอโดยวิธีการย่อยด้วย proteinase K ร่วมกับ SDS

นำหลอดที่บรรจุตัวอย่างในเอธิลอัลกอฮอล์ 70% มาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 15,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที แล้วเทส่วนน้ำทิ้งไป จากนั้นเติม 1X PBS ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 15,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนน้ำทิ้ง และทำซ้ำเช่นนี้ อีก 1 รอบ เติม lysis buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วย 10% SDS, 20 mg/ml proteinase K และ 3 M sodium acetate pH 5.2 แล้วอุ่นด้วยความร้อนในเครื่อง test tube heater ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และเขย่าทุก 15 นาที จากนั้นใช้ forceps คีบเอาขนเป็ดออก ทำการแยกดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ โดยเติม Phenol-Chloroform-Isoamyl alcohol (25:24:1) ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันด้วย vortex mixure และวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 rpm ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที เพื่อแยกชั้นฟีนอลและน้ำ ใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายส่วนบนใส่หลอดไมโครทิวบ์ใหม่ แยกดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้นโดยการสกัดด้วย Phenol-Chloroform-Isoamyl alcohol (25:24:1) อีก 1 รอบ จากนั้นเติม 3 M sodium acetate ปริมาตร 40 ไมโครลิตร และเอธิลอัลกอฮอล์ 100% ที่แช่เย็นแล้ว ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixure แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำหลอดตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วเทส่วนน้ำทิ้ง จากนั้นเติมเอธิลอัลกอฮอล์ 70% ที่แช่เย็นแล้ว ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนน้ำทิ้ง คว่ำหลอดบนกระดาษซับแห้ง หรือปล่อยให้แห้งในอากาศ แล้วละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยน้ำที่ปราศจาก DNase (Distilled water GIBCO™ Invitrogen) จากนั้นเก็บดีเอ็นเอที่ละลายดีแล้วที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้งาน

4. การสกัดดีเอ็นเอโดยวิธี Alkaline extraction (Malago *et al*., 2002)

นำหลอดที่บรรจุตัวอย่างในเอธิลอัลกอฮอล์ 70% มาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 15,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที แล้วเทส่วนน้ำทิ้งไป จากนั้นเติม 1X PBS ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 15,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนน้ำทิ้ง และทำซ้ำเช่นนี้ อีก 1 รอบ เติม 0.2 N NaOH ปริมาตร 20 ไมโครลิตร แล้วอุ่นด้วยความร้อนใน test tube heater ที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ใช้ forceps คีบเอาขนเป็ดออก จากนั้นเติม 0.04 M Tris-HCl (pH 7.5) ปริมาตร 180 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันออก ทำการแยกดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ โดยเติม Phenol-Chloroform-Isoamyl alcohol (25:24:1) ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันด้วย vortex mixure และวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 rpm ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที เพื่อแยกชั้นฟีนอลและน้ำ ใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายส่วนบนใส่หลอดไมโครทิวบ์ใหม่ แยกดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้นโดยการสกัดด้วย Phenol-Chloroform-Isoamyl alcohol (25:24:1) อีก 1 รอบ จากนั้นเติม 3 M sodium acetate ปริมาตร 40 ไมโครลิตร และเอธิลอัลกอฮอล์ 100% ที่แช่เย็นแล้ว ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixure แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำหลอดตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วเทส่วนน้ำทิ้ง จากนั้นเติมเอธิลอัลกอฮอล์ 70% ที่แช่เย็นแล้ว ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนน้ำทิ้ง คว่ำหลอดบนกระดาษซับแห้ง หรือปล่อยให้แห้งในอากาศ แล้วละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยน้ำที่ปราศจาก DNase (Distilled water GIBCO™ Invitrogen) จากนั้นเก็บดีเอ็นเอที่ละลายดีแล้วที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้งาน หรือนำสารละลายที่เติม Tris-HCl (pH 7.5) ไปใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบสำหรับปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยตรง

5. การตรวจสอบคุณภาพและวัดปริมาณดีเอ็นเอ

นำสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นประมาณ 600 เท่า วัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ของสารละลายดีเอ็นเอที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร (A_{260}) และ 280 นาโนเมตร (A_{280}) จากนั้น นำค่าการดูดกลืนแสงมาคำนวณหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอด้วยสูตรคำนวณดังนี้

ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) = A_{260} x 50 x dilution factor

1.0 O.D. = 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ของดีเอ็นเอสายคู่)

โดยพิจารณาความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอด้วยการคำนวณสัดส่วนระหว่าง OD_{260}/OD_{280}

6. การเพิ่มปริมาณไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอบริเวณ control region โดยเทคนิคพีซีอาร์

เตรียมสารละลาย (master mix) เพื่อเพิ่มปริมาณไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ปริมาณสารสำหรับการเพิ่มปริมาณไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอส่วน control region โดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอร์เรส

ส่วนประกอบ	ปริมาตร/ปฏิกิริยา
10X PCR Buffer minus Mg^{2+} (Invitrogen)	5 µl
50 mM $MgCl_2$ (Invitrogen)	1.5 µl
10 mM dNTP mix (Invitrogen)	1 µl
Platinum® *Taq* DNA Polymerase (50 u/µl)	0.25 µl
Forward primer (10 pmol/µl)	0.5 µl
Reverse primer (10 pmol/µl)	0.5 µl
DNase free H_2O (Distilled water GIBCO™ Invitrogen)	39.25 µl
ปริมาตรรวม	48 µl

คู่ไพรเมอร์มีลำดับเบสดังนี้

Forward (L78) 5´-GTT ATT TGG TTA TGC ATA TCG TG-3´ (Sorenson and Fleischer, 1996)

Reverse (H774) 5´-CCA TAT ACG CCA ACC GTC TC-3´ (Sorenson *et al.,* 1999)

เติม template DNA 2 ไมโครลิตร จากแต่ละตัวอย่างลงในแต่ละหลอดที่มี master mix ปริมาตร 48 ไมโครลิตร เพื่อทำให้สารละลายในแต่ละหลอดมีปริมาตรรวมเท่ากับ 50 ไมโครลิตร จากนั้นผสมสารละลายในแต่ละหลอดเบาๆ จากนั้นปั่นให้สารละลายรวมกันที่ก้นหลอดด้วยการปั่นในเครื่องเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 6,300 rpm เป็นเวลา 5-10 วินาที เพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอร์เรสใช้เครื่อง GeneAmp® PCR system 9700 (Appiled Biosystems) โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาของแต่ละขั้นตอนตาม Kulikova และคณะ (2005) ดังนี้

Preheat	ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส	นาน 7 นาที	
Denaturation	ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส	นาน 1 นาที	45 รอบ
Annealing	ที่อุณหภูมิ 52 องศาเซลเซียส	นาน 30 วินาที	
Extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	นาน 1 นาที	
Final extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	นาน 7 นาที	

นำผลผลิตพีซีอาร์มาตรวจด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเลคโทรโฟเรซิส

7. การแยกผลผลิตพีซีอาร์ ด้วยอะกาโรสเจลอิเลคโทรโฟเรซิส

เตรียมอะกาโรสเจลเข้มข้น 0.7 % โดยละลายผงอะกาโรสน้ำหนัก 0.28 กรัมในบัฟเฟอร์ TBE ปริมาตร 40 มิลลิลิตรอุ่นด้วยไมโครเวฟ และเขย่าเบาๆ เพื่อให้ผงอะกาโรสละลายหมด ตั้งทิ้งไว้ 10 นาทีเพื่อให้เย็นลง (อุณหภูมิประมาณ 50-55 องศาเซลเซียส) แล้วเทลงในถาดเตรียมเจล เสียบหวีลงตรงตำแหน่งที่กำหนด เพื่อให้เกิดร่องสำหรับหยอดตัวอย่าง และตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 30 นาทีเพื่อให้เจลแข็งตัว เมื่อเจลแข็งตัวแล้ววางลงในตำแหน่งที่กำหนดของเครื่องอิเลคโทรโฟเรซิส แล้วเติม TBE buffer ให้ท่วมเจล จากนั้นดึงหวีออก จากนั้นทำการผสมผลผลิตพีซีอาร์จากแต่ละตัวอย่างจำนวน 10 ไมโครลิตร เข้ากับ loading buffer ปริมาตร 1 ไมโครลิตร แล้วหยอดลงไปในร่องหวีบนแผ่นเจล ต่อกระแสไฟฟ้าเข้ากับเครื่องอิเลคโทรโฟเรซิส โดยใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้าคงที่ 100 โวลต์ เป็นเวลาประมาณ 30 นาที เจลที่ได้ด้วย ethidium bromide เป็นเวลา 30 นาที แล้วล้าง ethidium bromide ส่วนเกินบนเจล โดยเปิดก๊อกน้ำให้ไหลเบาๆ ประมาณ 5-10 นาที ตรวจแถบดีเอ็นเอ (ผลผลิตพีซีอาร์) บนแผ่นเจลภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต แล้วถ่ายภาพด้วยกล้องดิจิตอล โดยใช้โปรแกรม KODAK1-D Image Analysis Software

8. การโคลนนิ่ง

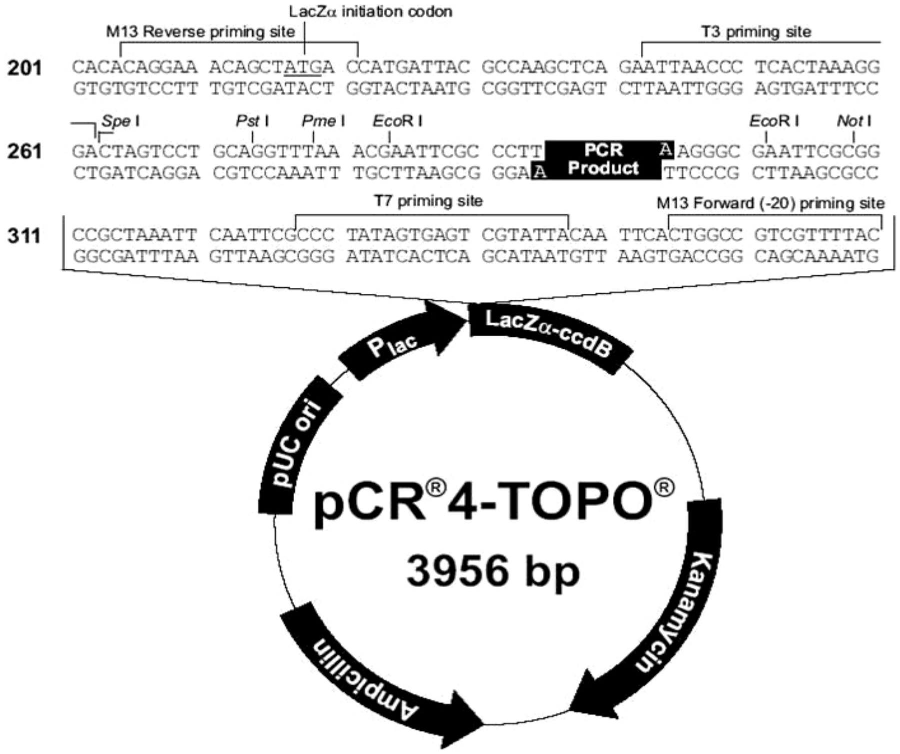
8.1 การเชื่อมต่อผลผลิตพีซีอาร์เข้ากับพลาสมิดเวคเตอร์ด้วยชุด TOPO TA cloning® (Invitrogen) ตามคำแนะนำของบริษัทดังนี้

เตรียมส่วนผสมดังตารางที่ 2 ผสมให้เข้ากันและทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นนำส่วนผสมที่ได้วางไว้บนน้ำแข็งเป็นเวลา 1-2 นาที ก่อนนำเข้าสู่เชื้อ *E. coli*

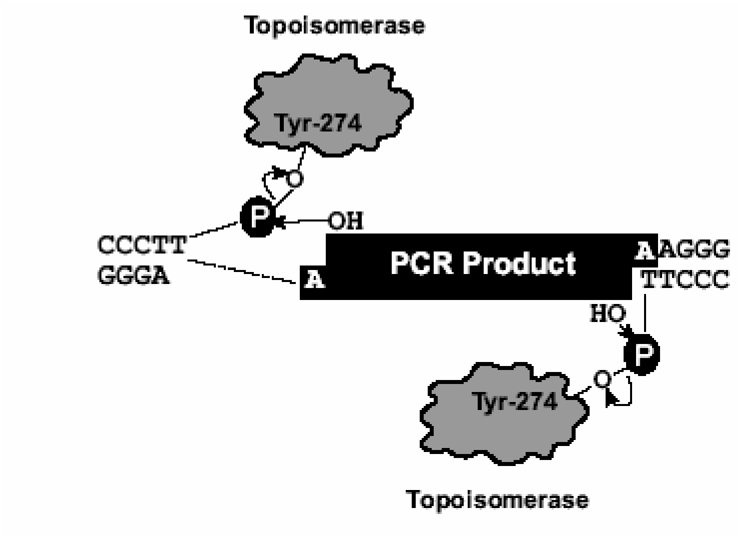
ตารางที่ 2 ปริมาณสารสำหรับใช้ในการเชื่อมต่อผลผลิตพีซีอาร์เข้ากับพลาสมิดเวคเตอร์

ส่วนประกอบ	ปริมาตร
PCR product (mtDNA control region)	2 µl
Salt solution	1 µl
Sterile water	2 µl
pCR® 4-TOPO vector	1 µl
ปริมาตรรวม	6 µl

การเชื่อมต่อผลผลิตพีซีอาร์เข้ากับพลาสมิดเวคเตอร์ อาศัยประโยชน์จากเอ็นไซม์ *Taq* polymerase ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ ที่มีการเติมเบสอะดีนิน (adeneine, A) ให้ผลผลิตพีซีอาร์ทางด้านปลาย 3′ เมื่อสร้างผลผลิตพีซีอาร์เสร็จสิ้น ซึ่งทำให้เหมาะกับ plasmid vector pCR®4-TOPO (Invitrogen) เนื่องจากปลายเปิดของเวคเตอร์ เป็นแบบ overhanging 3′ เป็น T residue ทำให้สามารถแทรกผลผลิตพีซีอาร์เข้าสู่เวคเตอร์ได้ (ภาพที่ 13) โดยอาศัยเอ็นไซม์ Topoisomerase I ซึ่งสกัดได้จาก Vaccinia virus ซึ่งจะจับกับดีเอ็นเอสายคู่ที่ตำแหน่งจำเพาะ และตัดพันธะ phosphodiester ในแต่ละสายหลังลำดับเบส 5′- CCTT พลังงานที่ได้จากการแยกพันธะ phosphodiester จะถูกอนุรักษ์ไว้ โดยการสร้างพันธะโควาเลนท์ระหว่างปลาย 3′ ของหมู่ phosphate ของสายดีเอ็นเอที่ถูกตัด และปลาย tyrosyl (Tyr – 274) ของ Topoisomerase I จากนั้นพันธะ phospho-tyrosyl ระหว่างดีเอ็นเอและเอ็นไซม์ ภายหลังจะต่อกับปลาย 5′ hydroxyl ของดีเอ็นเอสายเดิมที่ถูกตัด เป็นปฏิกิริยาผันกลับ และปล่อย Topoisomerase I ให้หลุดออก (ภาพที่ 14)



ภาพที่ 13 แสดงแผนที่พลาสมิดเวคเตอร์ pCR®4-TOPO (Invitrogen)



ภาพที่ 14 แสดงปฏิกิริยาการต่อชิ้นผลผลิตพีวีอาร์เข้าสู่พลาสมิดเวคเตอร์ pCR®4-TOPO (Invitrogen)

8.2 การทรานสฟอร์เมชัน (Transformation)

ใช้วิธี heat-shock โดยนำคอมพิเทนต์เซลล์ (competent *E. coli* Mach1 TM-T1R ของบริษัท Invitrogen) เติมพลาสมิด (สารละลายในข้อ 8.1) ใช้ปิเปตผสมเบาๆ แล้ววางบนน้ำแข็งนาน 20 นาที จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และนำกลับไปแช่ในน้ำแข็งทันที เป็นเวลา 2 นาที เติมอาหารเลี้ยงเชื้อ (S.O.C. medium) ปริมาตร 250 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส และเขย่า เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นจึงแบ่งเซลล์ 10-50 ไมโครลิตร ไปเกลี่ยลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (LB media) ซึ่งมียาปฏิชีวนะ (ampicillin ความเข้มข้น 50 mg/ml) เพื่อใช้ประโยชน์ในการคัดเลือก positive clone บ่มจานอาหารที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

8.3 การเพิ่มจำนวนเชื้อ *E. coli*

เลือกโคโลนีเดี่ยว (single colony) ของเชื้อ *E. coli* ที่ได้จากข้อ 8.2 จำนวน 2 โคโลนีต่อตัวอย่าง เขี่ยเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani (LB) ชนิดกึ่งแข็ง แล้วบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเลือกโคโลนีเดี่ยวของเชื้อ *E. coli* จากแต่ละ plate เลี้ยงในอาหาร LB ชนิดเหลว ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยมีรอบการเขย่า 200 รอบต่อนาที

8.4 การสกัดพลาสมิด

รวบรวมเชื้อที่เพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนของเหลวทิ้ง แล้วสกัดพลาสมิดจากเชื้อแบคทีเรีย โดยใช้ชุดสกัด QIAprep Miniprep (QIAGEN, Germany) โดยย่อดังนี้ ละลายตะกอนเซลล์ด้วยบัฟเฟอร์ P1 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร เติมบัพเฟอร์ P2 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมา 4-6 ครั้งแล้ว เติมบัพเฟอร์ N3 ปริมาตร 350 ไมโครลิตรทันที ผสมโดยการกลับหลอดไปมา 4-6 ครั้ง แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายส่วนบนใส่ลงใน QIAprep spin column ที่วางอยู่ใน collection tube นำไปปั่นเหวี่ยงเป็นที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เทของเหลวทิ้ง เติมบัพเฟอร์ PB ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เทของเหลวทิ้ง เติมบัพเฟอร์ PE ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เทของเหลวทิ้ง แล้วปั่นเหวี่ยงอีกครั้งเป็นเวลา 1 นาทีเพื่อกำจัดของเหลวที่ค้างอยู่ จากนั้นย้ายคอลัมน์ไปใส่ในหลอดใหม่ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมน้ำที่

ปราศจาก DNase ปริมาตร 30-50 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เพื่อเก็บสารละลายดีเอ็นเอ เก็บรักษาดีเอ็นเอที่ - 20 องศาเซลเซียส

8.5 การหาลำดับเบส

พลาสมิดที่สกัดได้จากข้อ 8.4 ส่งไปหาลำดับเบสด้วยวิธี dideoxy chain termination โดยใช้ Big Dye Terminator Cycle Sequencing kit (PerkinElmer) และเครื่องมือที่ใช้ เป็นรุ่น automated seqencer ABI 377 ณ หน่วย KU vector สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

9. การวิเคราะห์ผล

ลำดับเบสของไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอบริเวณ control region ที่ได้จากกระบวนการหาลำดับเบส (ข้อ 8.5) นำมาวิเคราะห์เปรียบเทียบกับลำดับเบสของคู่ไพรเมอร์ L78 และ H774 ด้วยโปรแกรม Blast 2 sequence (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi) เพื่อระบุหาตำแหน่งลำดับเบสของผลผลิตพีซีอาร์ที่ถูกต้อง จากนั้นเปรียบเทียบลำดับเบสของเป็ดพื้นเมืองที่ได้กับลำดับเบสของนกน้ำชนิดอื่นในตำแหน่งเดียวกันซึ่งมีข้อมูลรายงานตาม GenBank database แบบ multiple sequence alignment ด้วยโปรแกรม Clustal_W (http://www.ebi.ac.uk/clustalw/) ทำการคัดลอกผลการเปรียบเทียบใส่ลงในไฟล์ Microsoft word แล้วเปลี่ยนนามสกุลไฟล์ให้เป็นสกุล meg (filename.meg) จากนั้นนำผลการเปรียบเทียบลำดับเบสมาวิเคราะห์ต่อด้วยโปรแกรม MEGA 3.1 (Kumar *et al.*, 2004) โดยเลือกใช้ Kimura 2-parameter modelในการคำนวณค่าระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) และเลือกวิธี Neighbor-joining ในการสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) พร้อมทั้งตรวจสอบแขนง (branch) ของแผนภูมิความสัมพันธ์ด้วยวิธีการคำนวณหาค่า bootstrap และใช้ file ข้อมูลดังกล่าวมาวิเคราะห์หา ค่าความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide diversity, π) ค่า haplotype diversity (h) และตรวจสอบค่าระยะห่างทางพันธุกรรมที่คำนวณได้ โดยใช้ Tajima’s D test ด้วยโปรแกรม DnaSP 4.10

10. การเพิ่มปริมาณไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอโดยเทคนิคพีซีอาร์

เตรียมสารละลาย (master mix) เพื่อเพิ่มปริมาณไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ปริมาณสารสำหรับใช้ในการเพิ่มปริมาณไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอร์เรส

ส่วนประกอบ	ปริมาตร/ปฏิกิริยา
10X PCR buffer (with 20mM $MgCl_2$)	2 µl
dNTP Mixture (2.5mM each)	2 µl
Forward primer (10 pmol/µl)	1 µl
Reverse primer (10 pmol/µl)	1 µl
i-Taq™DNA polymerase (5U/µl)	0.5 µl
DNase free H_2O (Distilled water GIBCO™ Invitrogen)	12.5 µl
ปริมาตรรวม	19 µl

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายใช้คู่ไพรเมอร์ทั้งหมด 3 คู่ คือ APH23 (Maak *et al*., 2003) CAUD013 (Huang *et al*., 2005) และ CAUD019 (Huang *et al*., 2005) มีลำดับเบส ดังนี้

APH23; Forward primer คือ 5′-TCC TCT GCT CTA GTT GTG ATG G-3′
Reverse primer คือ 5′-CCT CAG CAG TCT TCC TCA GTG-3′

CAUD013; Forward primer คือ 5′-ACA ATA GAT TCC AGA TGC TGA A-3′
Reverse primer คือ 5′-ATG TCT GAG TCC TCG GAG C-3′

CAUD019; Forward primer คือ 5′-CTT AGC CCA GTG AAG CAT G-3′
Reverse primer คือ 5′-GCA GAC TTT TAC TTA TGA CTT-3′

โดยการเตรียม master mix แบ่งเป็น 3 หลอดสำหรับแต่ละคู่ไพรเมอร์

เติม template DNA 1 ไมโครลิตร จากแต่ละตัวอย่างลงในแต่ละหลอดที่มี master mix ปริมาตร 19 ไมโครลิตร เพื่อทำให้สารละลายในแต่ละหลอดมีปริมาตรรวมเท่ากับ 20 ไมโครลิตร จากนั้นผสมสารละลายในแต่ละหลอดเบาๆ จากนั้นปั่นให้สารละลายรวมกันที่ก้นหลอดด้วยการปั่นในเครื่องเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 6,300 rpm เป็นเวลา 5-10 วินาที เพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอร์เรสใช้เครื่อง GeneAmp® PCR system 9700 (Appiled Biosystems) โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาของแต่ละขั้นตอน ดังนี้

Preheat	ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส	นาน 5 นาที	
Denaturation	ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส	นาน 40 วินาที	30 รอบ
Annealing	ที่อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส	นาน 1 นาที	
Extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	นาน 1 นาที	
Final extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	นาน 10 นาที	

นำผลผลิตพีซีอาร์มาตรวจด้วยวิธีโพลิอะคริลาไมด์เจลอิเลคโทรโฟเรซิส

11. การแยกไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอด้วยโพลิอะคริลาไมด์เจลอิเลคโทรโฟเรซิส

เตรียมชุดกระจกสำหรับเตรียมเจล โดยทำความสะอาดกระจกทั้งสองแผ่นด้วยเอธิลอัลกอออล์ 70% แล้วนำกระจกทั้งสองแผ่นมาประกอบเข้าชุด โดยวาง specer ไว้ทั้งสองข้าง เพื่อให้เกิดช่องว่างระหว่างกระจกทั้งสอง ทำการเตรียมเจลโพลิอะคริลาไมด์ความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ โดยมีส่วนผสมดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ปริมาณสารสำหรับใช้ในการเตรียมโพลิอะคริลาไมด์เจลเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์

ส่วนประกอบ	ปริมาตร
30% acrylamide : bis (19:1)	2.4 ml
5X TBE	2.4 ml
H_2O	7.2 ml
10% APS	200 µl
TEMED	8.5 µl

ผสม 30% acrylamide: bis (19:1) 5X TBE และ น้ำ ในบีกเกอร์ เขย่าเบาๆให้เข้ากัน แล้วเติม 10% APS และ TEMED ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันอย่างรวดเร็ว ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ รีบเทเจลลงในช่องว่างระหว่างกระจกจนเต็ม แล้วใส่หวีลงไปด้านบน ปล่อยให้เจลแข็งตัวประมาณ 30-40 นาที เมื่อเจลแข็งตัวดีแล้ว ดึงหวีออก และประกอบกระจกเข้ากับชุดอิเลคโทรโฟเรซิส เติมบัฟเฟอร์ TBE ลงในช่องด้านบนและด้านล่าง ระวังอย่าให้มีฟองอากาศอยู่ใต้กระจก จากนั้นดูดสารละลายผลผลิตพีซีอาร์จำนวน 3 ไมโครลิตร ผสม loading buffer 1 ไมโครลิตร แล้วหยอดลงไปในร่องแผ่นเจลที่เตรียมไว้ แล้วต่อกระแสไฟฟ้าเข้ากับเครื่องอิเลคโทรโฟเรซิส โดยใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้าคงที่ประมาณ 100 โวลต์ เป็นเวลาประมาณ 30 นาที แล้วปล่อยให้ดีเอ็นเอเคลื่อนที่ไปตามระยะที่ต้องการ โดยดูจากสีที่ผสมอยู่ในสารละลาย แล้วจึงปิดเครื่อง นำกระจกออกจากเครื่อง แยกกระจกทั้งสองแผ่นออกจากกัน แล้วแยกแผ่นออกจากกระจกแผ่นหลัง จากนั้นย้อมเจลด้วยชุดสี STERLING™ Rapid Silver Stain โดยทำการผสมส่วนประกอบ (ภาคผนวก ข) ตามคำแนะนำในคู่มือ จากนั้นนำแผ่นเจลมาแช่ในสารละลาย fixative 1 นาน 25 นาที เขย่าเบาๆ บนเครื่องเขย่า จากนั้นย้ายลงไปแช่ในสารละลาย fixative 2 นาน 5 นาที แล้วล้างเจลในน้ำกลั่น 15 นาที สองรอบ โดยเขย่าตลอดเวลา ผสม Staining solution A และ Staining solution B เข้าด้วยกัน ราดลงบนแผ่นเจล เขย่าเบาๆ บนเครื่องเขย่า ประมาณ 10-15 นาที หรือจนกว่าจะเห็นแถบดีเอ็นเอชัดเจน หยุดปฏิกิริยาโดยนำแผ่นเจลใส่ในสารละลาย 5% acetic acid 3-5 นาที แล้วล้างแผ่นเจลด้วยน้ำกลั่นอีกครั้งประมาณ 2-3 นาที นำแผ่นเจลไปถ่ายภาพด้วยกล้องดิจิตอล

12. การวิเคราะห์ผลจากเทคนิคไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ

วิเคราะห์ภาพแถบดีเอ็นเอบนโพลิอะครีลาไมด์เจล ด้วยโปรแกรม Kodak 1D Image Analysis Software โดยเปรียบเทียบความเหมือนหรือความแตกต่างของตำแหน่งแถบดีเอ็นเอที่ได้จากแต่ละตัวอย่างของไพรเมอร์แต่ละชุด

13. สถานที่ทำการทดลอง

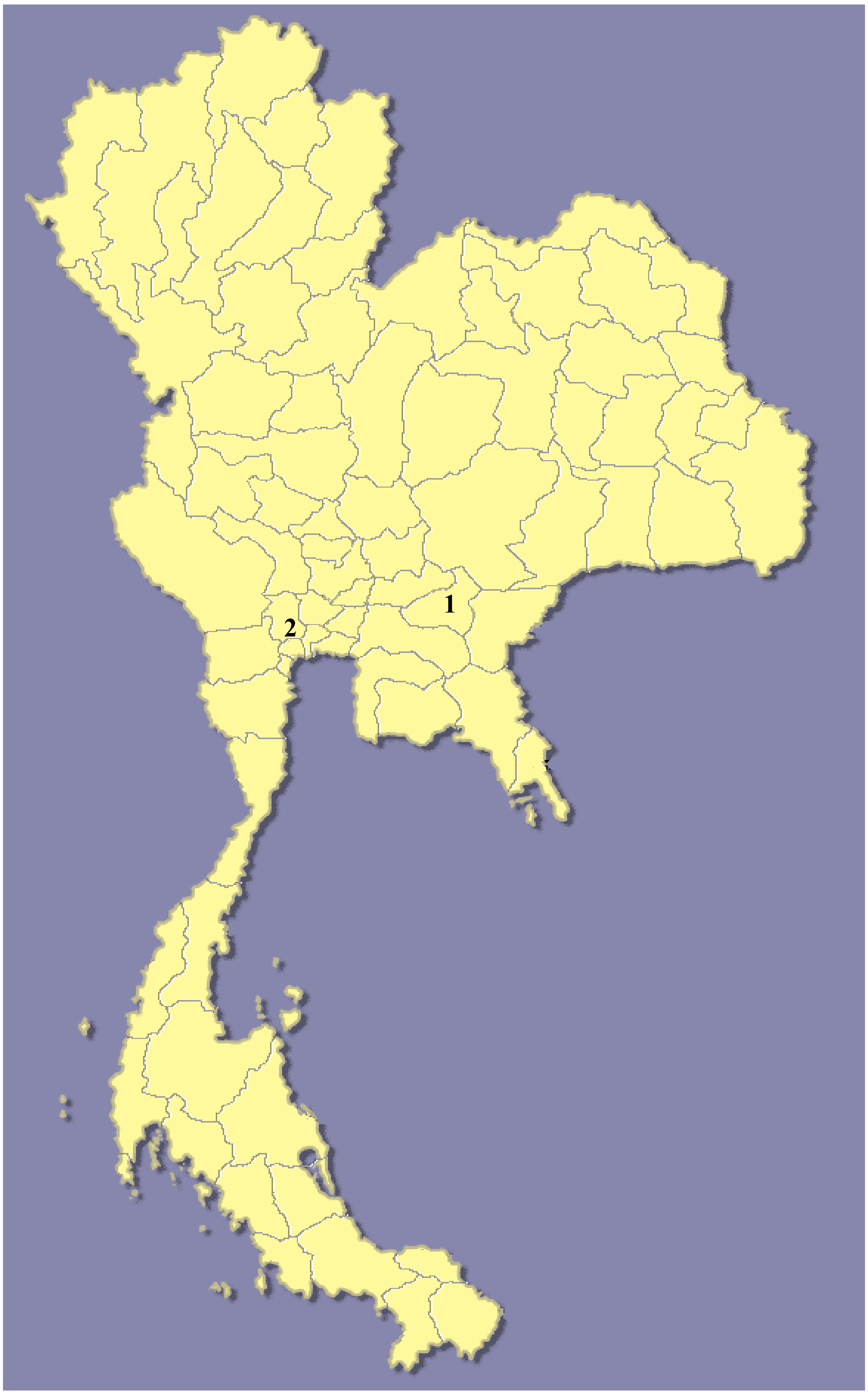
1. เก็บตัวอย่างขนเป็ดจากสถานีบำรุงพันธุ์สัตว์ปีก อำเภอกบินทร์บุรี จังหวัดปราจีนบุรี และแหล่งเลี้ยงในเขตจังหวัดภาคกลางได้แก่ จังหวัดนครปฐม (ภาพที่ 15)

2. สกัดดีเอ็นเอ เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ และวิเคราะห์ผลโดยการสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ ที่ห้องปฏิบัติการ ภาควิชาสรีรวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน กรุงเทพมหานครฯ

3. ตรวจสอบหาลำดับเบส ณ หน่วย KU vector สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

14. ระยะเวลาในการทดลอง

เริ่มทำการทดลอง เดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2548
สิ้นสุดการทดลอง เดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2550



1 สถานีบำรุงพันธุ์สัตว์ปีก อำเภอกบินทร์บุรี จังหวัดปราจีนบุรี

2 ฟาร์มเอกชน แหล่งเลี้ยงในเขตภาคกลาง จังหวัดนครปฐม

ภาพที่ 15 สถานที่เก็บตัวอย่างเป็ดพื้นเมือง 2 สายพันธุ์ และเป็ดพันธุ์กากีแคมเบลล์

ผลและวิจารณ์

1. การสกัดดีเอ็นเอ

ผลการสกัดดีเอ็นเอ 3 วิธีคือ การใช้ชุดสกัดทางการค้า QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) การย่อยด้วยเอนไซม์ proteinase K ร่วมกับ SDS และการย่อยด้วยอัลคาไลน์ (alkaline extraction) โดยใช้ 0.2N NaOH แล้วปรับให้เป็นกลางด้วย Tris-HCl pH 7.5 พบว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้มีคุณภาพแตกต่างกันคือ ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากชุดสกัด QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) มีคุณภาพดีที่สุด รองลงมาคือดีเอ็นเอที่ได้จากการย่อยด้วย proteinase K ร่วมกับ SDS และดีเอ็นเอที่ได้จากการย่อยด้วยอัลคาไลน์ ตามลำดับ (ภาพที่ 16) แต่เมื่อตรวจสอบความเข้มข้นสารละลายดีเอ็นเอด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร แล้วคำนวณตามสูตร

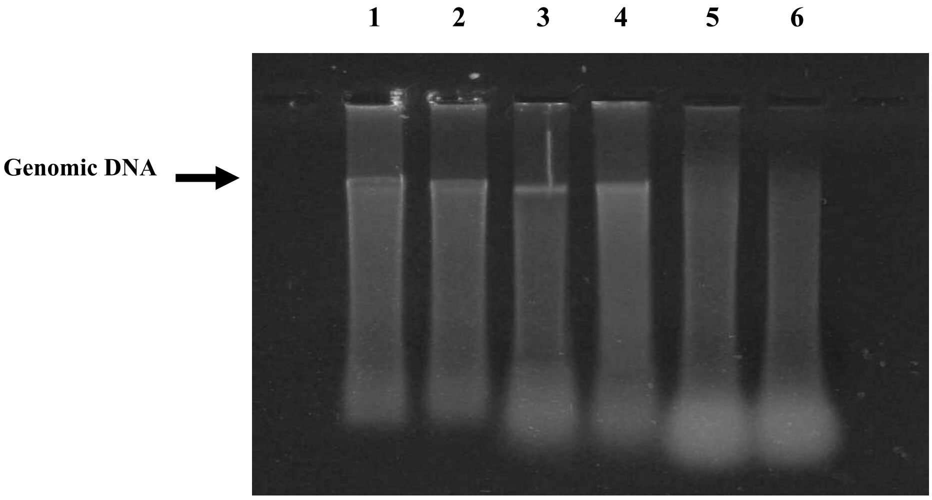
ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) = A_{260} x 50 x dilution factor

พบว่า สารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้จากวิธีการย่อยด้วย proteinase K ร่วมกับ SDS มีความเข้มข้นของดีเอ็นเอสูงกว่าการสกัดด้วยชุดสกัด QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) และการย่อยด้วยอัลคาไลน์ คือมีค่าเฉลี่ย 300±204.45ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, 198±78.23 ไมโครกรัมต่อมิลิลิตร และ 132±62.21ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม การเทียบอัตราส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ตที่ 260 และ 280 นาโนเมตร (A260/A280) พบว่ามีค่าเฉลี่ยจากแต่ละวิธีอยู่ที่ 1.56±0.26 (proteinase K) 2.03±0.74 (QIAGEN Kit) และ 1.42±0.30 (alkaline extraction) ดังแสดงในตารางที่ 5 แสดงให้เห็นว่าดีเอ็นเอที่ได้จากการย่อยด้วย proteinase K ร่วมกับ SDS หรือ จากการย่อยด้วยอัลคาไลน์ อาจมีการปนเปื้อนของโปรตีน ขณะที่ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากชุดสกัด QIAamp DNA Mini Kit อาจมีการปนเปื้อนของอาร์เอ็นเอ

ตารางที่ 5 เปรียบเทียบคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอที่สกัดได้จากวิธีการสกัด 3 แบบ

วิธี	ความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ[a] (A260/A280)	ปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้[a] (µg/ml)
QIAamp DNA mini Kit (n=5)	2.03±0.74	198±78.23
proteinase K (n=10)	1.56±0.26	300±204.45
alkaline extraction (n=10)	1.42±0.30	132±62.21

[a] mean ± SD



ภาพที่ 16 คุณลักษณะของดีเอ็นเอที่สกัดได้จากขนเป็ด 3 วิธีคือ สกัดด้วย QIAamp DNA Mini Kit (ลำดับที่ 1-2) สกัดด้วย proteinase K ร่วมกับ SDS (ลำดับที่ 3-4) และสกัดด้วย 0.2 N NaOH แล้วปรับให้เป็นกลางด้วย Tris-HCl (ลำดับที่ 5-6)

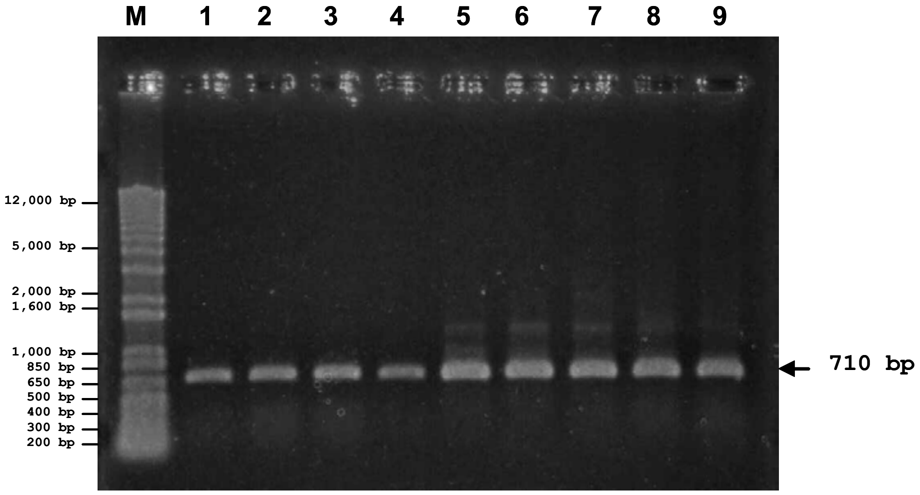
ดังนั้น การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอที่ได้ขึ้นอยู่กับวิธีการสกัด โดยพบว่าการย่อยด้วย 0.2N NaOH แล้วปรับให้เป็นกลางด้วย Tris-HCl (pH 7.5) ให้ผลผลิตดีเอ็นเอที่มีคุณภาพและปริมาณด้อยกว่าวิธีอื่น ทั้งนี้ เป็นผลมาจากโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ที่อาจหลงเหลือมาจากขั้นตอนการสกัดมีผลต่อการทำลายดีเอ็นเอบางส่วน อย่างไรก็ตาม ดีเอ็นเอที่หลงเหลืออยู่เพียงพอต่อการใช้เป็นต้นแบบสำหรับการเพิ่มจำนวนชิ้นของไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอ

ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ แต่อาจไม่เหมาะสำหรับใช้เพื่อการศึกษานิวเคลียดีเอ็นเอ ทั้งนี้ เพราะไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอมีขนาดเล็ก และแต่ละเซลล์มีมากกว่า 1 copy (2-10 copies) จึงไม่ถูกทำลายไปจนหมดระหว่างกระบวนการสกัด ขณะที่นิวเคลียดีเอ็นเอมีขนาดใหญ่และมีเพียง 1 copy ต่อเซลล์ จึงง่ายต่อการถูกทำลาย และให้ผลสำเร็จต่อการเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ยากกว่าไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอ

แม้ว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้จากขนมีปริมาณและคุณภาพด้อยกว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเนื้อเยื่อชนิดอื่น เพราะกรดนิวคลีอิกส่วนใหญ่ภายในขนถูกทำลายระหว่างกระบวนการ keratinization (Graffy and David, 2005) แต่จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าขนเป็นแหล่งของไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอที่มีคุณภาพ และชนิดของขนที่เลือกใช้มีผลต่อคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอด้วย โดยพบว่าขนอ่อนที่เพิ่งงอกขึ้นมาใหม่มีความเหมาะสมสำหรับนำมาใช้สกัดดีเอ็นเอมากที่สุด เพราะมีจำนวนเซลล์ที่เป็นแหล่งดีเอ็นเอเป็นจำนวนมาก ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Morin และคณะ (1994) ที่พบว่าขนนกที่เหมาะสำหรับการนำมาใช้สกัดดีเอนเอควรเป็นขนอ่อนที่เพิ่งงอกใหม่หลังจากการผลัดขน นอกจากนี้ ขนที่หลุดร่วงจากตัวสัตว์แล้วยังสามารถใช้เป็นแหล่งของดีเอ็นเอที่มีคุณภาพได้เช่นกัน (ไม่ได้แสดง) เพราะขนบางเส้นยังมีเซลล์จากลิ่มเลือด (blood clot) หลงเหลืออยู่ในก้านขนบริเวณ superior umbilicus และอาจยังมีเซลล์ของ epidermis ติดอยู่ในบริเวณ calamus จึงสามารถนำมาใช้สกัดดีเอนเอได้ (Horrath *et al*., 2005) จึงแนะนำให้เลือกเก็บตัวอย่างขนที่มีขนาดใหญ่ สะอาด และมองเห็นลิ่มเลือด ชัดเจน

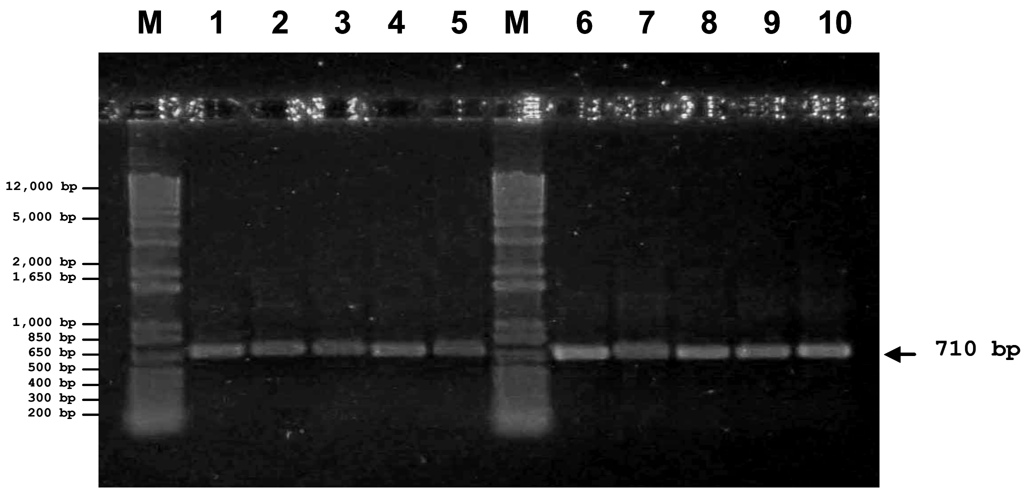
2. การเพิ่มปริมาณไมโตคอนเดรียบริเวณ control ด้วยเทคนิคพีซีอาร์

ผลผลิตพีซีอาร์ที่เกิดจากการเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอต้นแบบจากขนที่ผ่านการสกัดทั้ง 3 วิธี คือ การใช้ชุดสกัด QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) การย่อยด้วยเอนไซม์ proteinase K ร่วมกับ SDS และการย่อยด้วยอัลคาไลน์ ให้ขนาดของผลผลิตเหมือนกัน (710 bp) เมื่อใช้คู่ไพรเมอร์ L78 (5′-GTT ATT TGG TTA TGC ATA TCG TG-3′) และ H774 (5′-CCA TAT ACG CCA ACC GTC TC-3′) และตรวจด้วยเทคนิคอิเลคโทรโฟเรซิสบน 1 % เจลอะกาโรส ซึ่งสอดคล้องกับขนาดของชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายที่ควรเกิดขึ้นด้วยคู่ไพรเมอร์ดังกล่าวจากไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอบริเวณ control ของไก่ตามรายงานของ Desjardins and Morais (1990) แสดงให้เห็นว่า ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มีขนาดถูกต้อง (ภาพที่ 17)



ภาพที่ 17 ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 710 bp ที่สังเคราะห์ด้วยคู่ไพรเมอร์ L78 และ H774 โดย M คือ DNA marker 1Kb Plus Ladder™ (invitrogen) Lane 1-2 ใช้ดีเอ็นเอต้นแบบจากการสกัดด้วย QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) Lane 3-4 ใช้ดีเอ็นเอต้นแบบจากการสกัดด้วย proteinase K ร่วมกับ SDS และ Lane 5-9 ใช้ดีเอ็นเอต้นแบบจากการสกัดด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์แล้วปรับให้เป็นกลางด้วย Tris-HCl (pH 7.5)

การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิคพีซีอาร์และคู่ไพรเมอร์ L78 และ H774 จากตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้จากการย่อยขนด้วยอัลคาไลน์ (alkaline extraction) ให้ผลผลิตพีซีอาร์ที่มีขนาด 710 bp ทุกตัวอย่าง (37/37 ตัวอย่าง) ทั้งชุดที่ผ่าน (20 ตัวอย่าง) และไม่ผ่าน (17 ตัวอย่าง) ขั้นตอนการแยกดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ด้วย phenol-chloroform (ภาพที่ 18) แสดงให้เห็นว่า ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากขนด้วยอัลคาไลน์ดังกล่าว สามารถนำไปใช้ในการเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอของไมโตคอนเดรียด้วยเทคนิคพีซีอาร์ได้โดยตรง จึงเป็นการลดขั้นตอนที่อันตราย และประหยัดค่าใช้จ่ายจากการใช้ phenol-chloroform ทั้งนี้ จากการคำนวณเวลาและค่าใช้จ่ายของวิธีการสกัดดีเอ็นเอทั้ง 3 แบบ พบว่า การสกัดดีเอ็นเอด้วยอัลคาไลน์ และไม่ผ่านขั้นตอนการใช้ phenol-chloroform มีราคาค่าใช้จ่ายต่อตัวอย่างน้อยกว่าการใช้ชุดสกัด QIAamp DNA Mini Kit (2,500 เท่า) การย่อยด้วยเอนไซม์ proteinase K ร่วมกับ SDS (1,300 เท่า) และการย่อยด้วยอัลคาไลน์ที่ผ่าน phenol-chloroform (560 เท่า) และยังใช้เวลาสำหรับการสกัดเท่ากับการใช้ชุดสกัด QIAamp DNA Mini Kit และน้อยกว่าวิธีอื่น ดังแสดงไว้ในตารางที่ 6



ภาพที่ 18 ผลผลิตพีซีอาร์จากดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยวิธีการย่อยด้วยอัลคาไลน์ (alkaline extraction) แล้วผ่าน (Lane 1-5) หรือไม่ผ่าน (Lane 6-10) การแยกให้บริสุทธิ์ด้วย phenol-chloroform (M= 1Kb Plus DNA marker)

ตารางที่ 6 เปรียบเทียบเวลาและค่าใช้จ่ายของวิธีการสกัดดีเอ็นเอจากขน 3 แบบ

วิธีการ	Phenol-chloroform extraction	ราคา/ตัวอย่าง (บาท)	เวลา (นาที)
QIAamp DNA mini Kit	No	150	20
proteinase K	Yes	80	200
alkaline extraction	Yes	34	120
	No	0.06	20

ดังนั้น การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า การใช้ขนเป็นแหล่งดีเอ็นเอสามารถลดอันตราย และก่อให้เกิดความเจ็บปวดต่อสัตว์น้อยที่สุด นอกจากนี้ ยังพบว่าการสกัดดีเอ็นเอจากขนด้วยวิธีการย่อยด้วยอัลคาไลน์ (alkaline extraction) ที่ไม่ผ่านขั้นตอนการใช้ phenol-chloroform สามารถนำไปใช้ร่วมกับเทคนิคพีซีอาร์ได้โดยตรง จึงเป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็ว ประหยัด และปลอดภัย สำหรับนำมาใช้ในการศึกษาพันธุศาสตร์ประชากรและวิวัฒนาการระดับโมเลกุลของสัตว์ปีก

3. การศึกษาเปรียบเทียบลำดับเบสของไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอบริเวณ control ของเป็ดพื้นเมืองไทย

การวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับเบสของผลผลิตพีซีอาร์ (ขนาด 667 bp) ที่สังเคราะห์ได้จากไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอบริเวณ control ของเป็ดพื้นเมืองไทย สายพันธุ์ปากน้ำ (5 ตัว) และสายพันธุ์นครปฐม (5 ตัว) โดยอาศัยข้อมูลลำดับเบสของผลผลิตพีซีอาร์ (710 bp) ที่ได้จากเป็ดแต่ละตัวด้วยคู่ไพรเมอร์ L78 (23 bp) และ H774 (20 bp) และตัดส่วนของชิ้นไพรเมอร์ออกทั้งสองข้าง (รูปที่ 1 ภาคผนวก ก) พบว่าการจัดเรียงของลำดับเบสส่วนใหญ่ในสายนิวคลีโอไทด์ของเป็ดพื้นเมืองไทยทั้ง 10 ตัวอย่างมีความคล้ายคลึงกัน เมื่อจัดเรียงแบบ multiple sequence alignment ด้วยโปรแกรม Clustal_W และพบชนิดนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกัน 4 ตำแหน่ง (ภาพที่ 19) ทำให้สามารถแบ่งเป็ดพื้นเมืองไทยดังกล่าวได้เป็น 5 haplotypes (ตารางที่ 7) และส่วนใหญ่ที่พบคือ haplotype 1

```
                10         20         30         40         50         60         70         80         90
        ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
1       CATACATTTA TATTCCCCAT ATATTAACCT ATGGTCCCGG TAATAAACAC TATTAACCAA CTATCCTACA TGCACGGACT AAACCCATCA

               100        110        120        130        140        150        160        170        180
        ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
91      CATGTCAACG GACATACCCT ACCTATCGGA CTACCCTCCC AACGGACCCA GAGTGAATGC TCTAATACCC AACACCTCAA CACCACATAA
                                                                                *
               190        200        210        220        230        240        250        260        270
        ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
181     CATGCCCCCA ACCAGAACAA GGCCCCATAA TGATGAATGC TTGACAGACA TACCCTACCA ACACTCCAAA TTCCTCTCCA CCCACCCATT

               280        290        300        310        320        330        340        350        360
        ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
271     ACTCATGAAG CTGCGTACCA GATGGATTTA TTAATCGTAC ACCTCACGTG AAATCAGCAA TCCTTGCACA TAATGTCCGA CGTGACTAGC

               370        380        390        400        410        420        430        440        450
        ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
361     TTCAGGCCCA TACGTTCCCC CTAAACCCCT CGCCCTCCTC ACATTTTTGC GCCTCTGGTT CCTCGGTCAG GGCCATCAAT TGGGTTCACT
         *
               460        470        480        490        500        510        520        530        540
        ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
451     CACCTCTCCT TGCCCTTCAA AGTGGCATCT GTGGAATACT TCCACCATCT CAATGCGTAA TCGCGGCATC TTCCAGCTTT TTGGCGCCTC

               550        560        570        580        590        600        610        620        630
        ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
541     TGGTTCCTTT TATTTTTTCC GGGGTTACCT CACAGCTGGC CCTTCCCAGT GACTTCGGGG GTCCCACAAT CTAAGCCTGG ACACACCTGC

               640        650        660
        ....|....| ....|....| ....|....| .....|667
631     TATCCTATAT TATCCTATAT CTCAGGGATT ACTCAAT
                           *      *
```

ภาพที่ 19 แสดงลำดับเบสของผลผลิตพีซีอาร์ (ขนาด 667 bp) แบบ haplotype 1 ที่ได้จากไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอบริเวณ control ของเป็ดพื้นเมืองไทย และสัญลักษณ์ * แสดงตำแหน่งของนิวคลีโอไทด์ที่พบว่ามีความแตกต่างใน haplotypes อื่น

ตารางที่ 7 จำนวน haplotypes ของเป็ดพื้นเมืองไทย จากการเปรียบเทียบความแตกต่างของชนิดเบส ภายในชิ้นไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอบริเวณ control ขนาด 667 bp

Haplotype	ตำแหน่งที่พบความแตกต่างบนลำดับเบส				จำนวนตัวอย่าง
	157	362	649	655	
1	A	T	A	G	5
2	G	.	.	.	2
3	.	C	.	.	1
4	.	.	.	A	1
5	.	.	G	.	1

เปรียบเทียบลำดับเบสของชิ้นไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอบริเวณ control ดังกล่าวในแต่ละสายพันธุ์ แบบ multiple sequence alignment ด้วยโปรแกรม Clustal_W เพื่อตรวจสอบรูปแบบ haplotype ในแต่ละสายพันธุ์ พบว่าในตัวอย่างเป็ดปากน้ำทั้งหมด 5 ตัว พบการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 3 แบบ คือ haplotype 1, 2 และ 3 และพบว่าความแตกต่างที่เกิดขึ้นในสายนิวคลีโอไทด์ของเป็ดปากน้ำทั้ง 5 ตัว เป็นแบบ Singleton variable sites 1 ตำแหน่ง คือตำแหน่งที่ 362 ในตัวอย่างเป็ดปากน้ำเพศผู้ตัวที่ 3 และแบบ Parsimony informative sites 1 ตำแหน่ง คือ ตำแหน่งที่ 157 ในตัวอย่างเป็ดปากน้ำเพศผู้ตัวที่ 2 กับตัวอย่างเป็ดปากน้ำเพศเมียตัวที่ 2 (ตารางที่ 8) ในขณะที่ในตัวอย่างเป็ดนครปฐม 5 ตัว พบการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 3 แบบ คือ haplotype 1, 4 และ 5 โดยพบว่าความแตกต่างที่เกิดขึ้นในสายนิวคลีโอไทด์ของเป็ดปากน้ำทั้ง 5 ตัว เป็นแบบ Singleton variable sites 2 ตำแหน่ง คือตำแหน่งที่ 649 และ 655 ในตัวอย่างเป็ดนครปฐมเพศผู้ตัวที่ 2 และ เป็ดนครปฐมเพศเมียตัวที่ 1 ตามลำดับ แต่ไม่พบความแตกต่างแบบ Parsimony informative sites 1 (ตารางที่ 9)

ตารางที่ 8 แสดงชนิดของ haplotype ที่พบในเป็ดปากน้ำทั้ง 5 ตัวอย่าง และตำแหน่งที่พบความแตกต่างในสายนิวคลีโอไทด์

Haplotype	Sample	Polymorphic nucleotide sites	
		157	362
1	ปากน้ำเพศผู้ ตัวที่ 1	A	T
	ปากน้ำเพศเมีย ตัวที่ 1	A	T
2	ปากน้ำเพศเมีย ตัวที่ 2	G	T
	ปากน้ำเพศผู้ ตัวที่ 2	G	T
3	ปากน้ำเพศผู้ ตัวที่ 3	A	C

ตารางที่ 9 แสดงชนิดของ haplotype ที่พบในเป็ดนครปฐมทั้ง 5 ตัวอย่าง และตำแหน่งที่พบความแตกต่างในสายนิวคลีโอไทด์

Haplotype	Sample	Polymorphic nucleotide sites	
		649	655
1	นครปฐมเพศผู้ ตัวที่ 1	A	G
	นครปฐมเพศเมีย ตัวที่ 2	A	G
	นครปฐมเพศเมีย ตัวที่ 3	A	G
4	นครปฐมเพศเมีย ตัวที่ 1	A	A
5	นครปฐมเพศผู้ ตัวที่ 2	G	G

การคำนวณหาค่าระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) ของเป็ดพื้นเมืองไทยด้วยการเปรียบเทียบทีละคู่สลับกัน (pairwise homoplassy matrix) ด้วยโปรแกรม MEGA 3.1 พบว่าค่าระยะห่างทางพันธุกรรมที่คำนวณได้จากการเปรียบเทียบเป็ดทีละคู่มีค่าน้อย คือมีค่าอยู่ระหว่าง 0.00-0.003 เนื่องจากมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกันเพียง 1-2 เบส (ตารางที่ 10, 11 และ 12) และการคำนวณหาค่า haplotypes diversity (h) nucleotide diversity (π) และวิเคราะห์ค่าระยะห่างทางพันธุกรรม โดยใช้ Tajima's D test ด้วยโปรแกรม DnaSP 4.10 พบว่าค่า haplotypes diversity ของเป็ดปากน้ำมีค่าเท่ากับ 0.800±0.164 และในเป็ดนครปฐมมีค่าเท่ากับ 0.700±0.218 ขณะที่เมื่อคิดรวมทั้งสองสายพันธุ์จะมีค่า haplotypes diversity เท่ากับ 0.756±0.130 และค่าความหลากหลายของ

ลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide diversity, π) ของลำดับเบสในเป็ดพื้นเมืองทั้ง 2 สายพันธุ์ที่คำนวณได้มีค่าน้อย (ปากน้ำเท่ากับ 0.00150±0.00042% นครปฐมเท่ากับ 0.00120±0.00045% และรวมทั้งสองสายพันธุ์มีค่าเท่ากับ 0.00143±0.00036%) ผลการวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าระยะห่างทางพันธุกรรมโดยใช้ Tajima's D test พบว่าไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอ บริเวณ control ของเป็ดพื้นเมืองทั้ง 10 ตัวอย่าง ไม่แตกต่างกัน (P>0.10) ดังแสดงในตารางที่ 13

ตารางที่ 10 แสดงค่าระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) ของการเปรียบเทียบลำดับเบสของชิ้นไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอบริเวณ control ของเป็ดปากน้ำ

	APM1	BPM2	APF1	BPF2	CPM3
APM1	0.000				
BPM2	0.002	0.000			
APF1	0.000	0.002	0.000		
BPF2	0.002	0.000	0.002	0.000	
CPM3	0.002	0.003	0.002	0.003	0.000

ตารางที่ 11 แสดงค่าระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) ของการเปรียบเทียบลำดับเบสของชิ้นไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอบริเวณ control ของเป็ดนครปฐม

	ANM1	BNM2	ANF1	BNF2	CNF3
ANM1	0.000				
BNM2	0.002	0.000			
ANF1	0.002	0.003	0.000		
BNF2	0.000	0.002	0.002	0.000	
CNF3	0.000	0.002	0.002	0.000	0.000

ตารางที่ 12 แสดงค่าระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) ของการเปรียบเทียบลำดับเบสของชิ้นไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอบริเวณ control ของเป็ดพื้นเมืองไทยทั้งสองสายพันธุ์

	APM1	BPM2	APF1	BPF2	ANM1	BNM2	ANF1	BNF2	CNF3	CPM3
APM1	0.000									
BPM2	0.002	0.000								
APF1	0.000	0.002	0.000							
BPF2	0.002	0.000	0.002	0.000						
ANM1	0.000	0.002	0.000	0.002	0.000					
BNM2	0.002	0.003	0.002	0.003	0.002	0.000				
ANF1	0.002	0.003	0.002	0.003	0.002	0.003	0.000			
BNF2	0.000	0.002	0.000	0.002	0.000	0.002	0.002	0.000		
CNF3	0.000	0.002	0.000	0.002	0.000	0.002	0.002	0.000	0.000	
CPM3	0.002	0.003	0.002	0.003	0.002	0.003	0.003	0.002	0.002	0.000

สัญลักษณ์;

ANM1 = นครปฐม เพศผู้ ตัวที่ 1	APM1 = ปากน้ำ เพศผู้ ตัวที่ 1
BNM2 = นครปฐม เพศผู้ ตัวที่ 2	BPM2 = ปากน้ำ เพศผู้ ตัวที่ 2
ANF1 = นครปฐม เพศเมีย ตัวที่ 1	CPM3 = ปากน้ำ เพศผู้ ตัวที่ 3
BNF2 = นครปฐม เพศเมีย ตัวที่ 2	APF1 = ปากน้ำ เพศเมีย ตัวที่ 1
CNF3 = นครปฐม เพศเมีย ตัวที่ 3	BPF2 = ปากน้ำ เพศเมีย ตัวที่ 2

ตารางที่ 13 ค่าความผันแปรทางพันธุกรรมในไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอ บริเวณ control ของตัวอย่างเป็ดพื้นเมืองทั้งสองสายพันธุ์

Groups	*N*	N_{hap}	*D* (%)	*h*	π (%)	Tajima's D
ปากน้ำ	5	3	0.002	0.800±0.164	0.00150±0.00042	0.24314^{ns}
นครปฐม	5	3	0.001	0.700±0.218	0.00120±0.00045	-0.97256^{ns}
รวม	10	5	0.001	0.756±0.130	0.00143±0.00036	-1.24468^{ns}

N; Number of individuals

N_{hap}; Number of haplotype

D; Distance of sequence (overall mean)

h; Haplotype diversity

π; Nucleotide diversity

^{ns}; Non significant

การเปรียบเทียบความแตกต่างของชนิดเบสภายในชิ้นไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอบริเวณ control ขนาด 667 bp ในครั้งนี้อาจไม่มีประสิทธิภาพพอเพียงต่อการตรวจพบความแตกต่างเพื่อจัดแยกกลุ่มประชากรของเป็ดพื้นเมืองไทยทั้งสองสายพันธุ์ ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่าตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาเปรียบเทียบมีจำนวนจำกัดและมาจากแหล่งต้นตอเดียวกันจึงอาจเป็นไปตามข้อสันนิษฐานของ Peter *et al.* (2005) ที่ว่า ระยะ 2-3 ล้านปีที่ผ่านมา อาจไม่นานพอต่อการเปลี่ยนแปลงชนิดเบสภายในสายนิวคลีโอไทด์ของไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอ ถึงขั้นที่ทำให้เกิดความแตกต่างระหว่างเป็ดแต่ละชนิดในสกุล Anas ที่มีวิวัฒนาการมาจากบรรพบุรุษร่วมกันได้ และสอดคล้องกับข้อคิดเห็นของ Donne-Goussé *et al.* (2002) ที่ว่า การวิเคราะห์ลำดับเบสของ

ไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอบริเวณ control มีประสิทธิภาพสำหรับการจำแนกสายพันธุ์เป็ดในระดับวงศ์ (family level) แต่อาจไม่เหมาะสำหรับใช้ในการจำแนกเป็ดในระดับสายพันธุ์ (species level) โดยเฉพาะการจำแนกกลุ่มประชากรเป็ดภายในสายพันธุ์เดียวกัน นอกจากนี้การวิเคราะห์โดยใช้ลำดับเบสของไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอเป็นการวิเคราะห์ลักษณะพันธุกรรมที่ผ่านมาทางสายแม่เท่านั้น และไม่ส่งผลต่อลักษณะที่พบภายนอกของเป็ด ซึ่งอาจเป็นผลดีในแง่ของการศึกษาเพื่อวิเคราะห์หาต้นตอของบรรพบุรุษที่มาจากแม่เดียวกัน แต่อาจไม่เหมาะสมในการใช้จำแนกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ ดังนั้น การศึกษาในอนาคต เพื่อจำแนกเป็ดปากน้ำ และเป็ดนครปฐม จึงควรเลือกเทคนิคที่มีความจำเพาะมากขึ้น หรือเพิ่มตำแหน่งของบริเวณที่ใช้ในการเปรียบเทียบ แล้วใช้ข้อมูลดังกล่าวประกอบร่วมกันในการวิเคราะห์ เช่นการศึกษาของ Peters และคณะ ในปี ค.ศ. 2005 ที่ได้ศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของนกเป็ดน้ำ 5 สปีชีส์ โดยทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับเบสของไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอ และลำดับเบสของนิวเคลียดีเอ็นร่วมกัน ทำให้สามารถจำแนกนกเป็ดน้ำที่อยู่ในสปีชีส์เดียวกันออกเป็นกลุ่มได้อย่างชัดเจน

4. การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างเป็ดพื้นเมืองไทยและเป็ดชนิดอื่น

การกำหนด consensus sequence ของเป็ดพื้นเมืองไทยแต่ละสายพันธุ์ (ภาพที่ 20) โดยอาศัยโปรแกรมโปรแกรม CAP3 Sequence Assembly (http://pbil.univ-lyon1.fr/cap3.php) พบว่าลำดับเบสของชิ้นไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอบริเวณ control ขนาด 667 bp ของเป็ดทั้งสองสายพันธุ์ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้มีลักษณะเหมือนกันทั้งรูปแบบของการจัดเรียงและชนิดเบสของนิวคลีโอไทด์ที่เป็นส่วนประกอบ ดังแสดงในตารางที่ 14 และในภาพที่ 21 และเมื่อนำ consensus sequence ดังกล่าวเปรียบเทียบกับบริเวณเดียวกันของเป็ดสายพันธุ์อื่น (ตารางที่ 15) ตามที่มีข้อมูลใน GenBank database ของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) ด้วยโปรแกรม Clustal_W ร่วมกับการสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยวิธี Neighbor-joining และตั้งค่า bootstrap ที่ 1,000 replications มีเปอร์เซ็นต์ cutoff เท่ากับ 50โดยมีเป็ดเทศเป็น out group พบว่าเป็ดพื้นเมืองของไทยทั้งสองชนิดได้รับการจัดกลุ่ม (cluster) อยู่ร่วมกับเป็ดป่าหัวเขียว และแยกออกจากเป็ดชนิดอื่นอย่างชัดเจน (ภาพที่ 22) จึงเป็นไปตามข้อสันนิษฐานของ ปฐม (2529) ที่ว่าเป็ดพื้นเมืองไทยที่เลี้ยงกันอยู่ในปัจจุบันอาจมีบรรพบุรุษมาจากเป็ดป่าหัวเขียว และสอดคล้องกับชื่อทางวิทยาศาสตร์ *Anas platyrhynchos domesticus* ที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบัน ทั้งนี้ เป็ดป่าหัวเขียวมีความสามารถในการบินอพยพไปได้ในระยะทางไกล จึงพบว่ามีการแพร่กระจายอย่างกว้างขวางตามแหล่งที่อยู่ต่างๆทั่วโลก นอกจากนี้เป็ดป่าหัวเขียวสามารถผสมข้าม

สายพันธุ์กับเป็ดชนิดอื่นอีกหลายชนิดและให้ลูกหลานที่สืบพันธุ์ต่อได้ และการเปรียบเทียบรูปแบบของการจัดเรียงและชนิดเบสของนิวคลีโอไทด์ที่เป็นส่วนประกอบของไมโตคอนเดรียบริเวณ control ระหว่างเป็ดพื้นเมืองไทยที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้และเป็ดป่าหัวเขียวที่รายงานไว้โดย Peter และคณะ (2005) พบว่าเหมือนกันทุกประการ ดังแสดงในตารางที่ 16 และภาพที่ 23 จึงเป็นไปได้ว่าบริเวณของไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอที่เลือกมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้อาจไม่เหมาะสม เพราะเป็นตำแหน่งที่มีลำดับเบสแบบอนุรักษ์ ดังนั้นการศึกษาในอนาคตจึงควรมีการเพิ่มความยาวของลำดับเบสมากขึ้น หรือเพิ่มตำแหน่งของบริเวณที่ใช้ในการเปรียบเทียบ และควรใช้ข้อมูลดังกล่าวประกอบร่วมกันในการวิเคราะห์ ดังเช่น ตัวอย่างงานวิจัยของ Peter และคณะ (2005) ที่ใช้การเปรียบเทียบลำดับเบสในส่วนของนิวเคลียดีเอ็นเอร่วมกับลำดับเบสของไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอในการจำแนกชนิดของนกเป็ดน้ำ

```
Consensus sequence Thai Paknarm duck
>Parknum
CATACATTTATATTCCCCATATATTAACCTATGGTCCCGGTAATAAACACTATTAACCAACTATCCTACATGCACG
GACTAAACCCATCACATGTCAACGGACATACCCTACCTATCGGACTACCCTCCCAACGGACCCAGAGTGAATGCTC
TAATACCCAACACCTCAACACCACATAACATGCCCCCAACCAGAACAAGGCCCCATAATGATGAATGCTTGACAGA
CATACCCTACCAACACTCCAAATTCCTCTCCACCCACCCATTACTCATGAAGCTGCGTACCAGATGGATTTATTAA
TCGTACACCTCACGTGAAATCAGCAATCCTTGCACATAATGTCCGACGTGACTAGCTTCAGGCCCATACGTTCCCC
CTAAACCCCTCGCCCTCCTCACATTTTTGCGCCTCTGGTTCCTCGGTCAGGGCCATCAATTGGGTTCACTCACCTC
TCCTTGCCCTTCAAAGTGGCATCTGTGGAATACTTCCACCATCTCAATGCGTAATCGCGGCATCTTCCAGCTTTTT
GGCGCCTCTGGTTCCTTTTATTTTTTCCGGGGTTACCTCACAGCTGGCCCTTCCCAGTGACTTCGGGGGTCCCACA
ATCTAAGCCTGGACACACCTGCGTTATCGCGCTATCCTATATCTCAGGGATTACTCAAT
```

```
Consensus sequence Thai Nakornpathom duck
>Nakornpathom
CATACATTTATATTCCCCATATATTAACCTATGGTCCCGGTAATAAACACTATTAACCAACTATCCTACATGCACG
GACTAAACCCATCACATGTCAACGGACATACCCTACCTATCGGACTACCCTCCCAACGGACCCAGAGTGAATGCTC
TAATACCCAACACCTCAACACCACATAACATGCCCCCAACCAGAACAAGGCCCCATAATGATGAATGCTTGACAGA
CATACCCTACCAACACTCCAAATTCCTCTCCACCCACCCATTACTCATGAAGCTGCGTACCAGATGGATTTATTAA
TCGTACACCTCACGTGAAATCAGCAATCCTTGCACATAATGTCCGACGTGACTAGCTTCAGGCCCATACGTTCCCC
CTAAACCCCTCGCCCTCCTCACATTTTTGCGCCTCTGGTTCCTCGGTCAGGGCCATCAATTGGGTTCACTCACCTC
TCCTTGCCCTTCAAAGTGGCATCTGTGGAATACTTCCACCATCTCAATGCGTAATCGCGGCATCTTCCAGCTTTTT
GGCGCCTCTGGTTCCTTTTATTTTTTCCGGGGTTACCTCACAGCTGGCCCTTCCCAGTGACTTCGGGGGTCCCACA
ATCTAAGCCTGGACACACCTGCGTTATCGCGCTATCCTATATCTCAGGGATTACTCAAT
```

ภาพที่ 20 Consensus sequence ของไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอบริเวณ control ของตัวแทนเป็ดพื้นเมืองไทยทั้งสองสายพันธุ์ที่ใช้สำหรับเปรียบเทียบกับเป็ดสายพันธุ์อื่น

ตารางที่ 14 แสดงความถี่ในรูปเปอร์เซ็นต์ของชนิดเบสที่เป็นส่วนประกอบในสายนิวคลีโอไทด์ (nucleotide frequencies) ขนาด 667 bp ของไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอบริเวณ control ของเป็ดพื้นเมืองพันธุ์ปากน้ำ และพันธุ์นครปฐม

พันธุ์เป็ด	T	C	A	G	total
ปากน้ำ	25.8	33.4	25.5	15.3	667
นครปฐม	25.8	33.4	25.5	15.3	667
Avg.	25.8	33.4	25.5	15.3	667

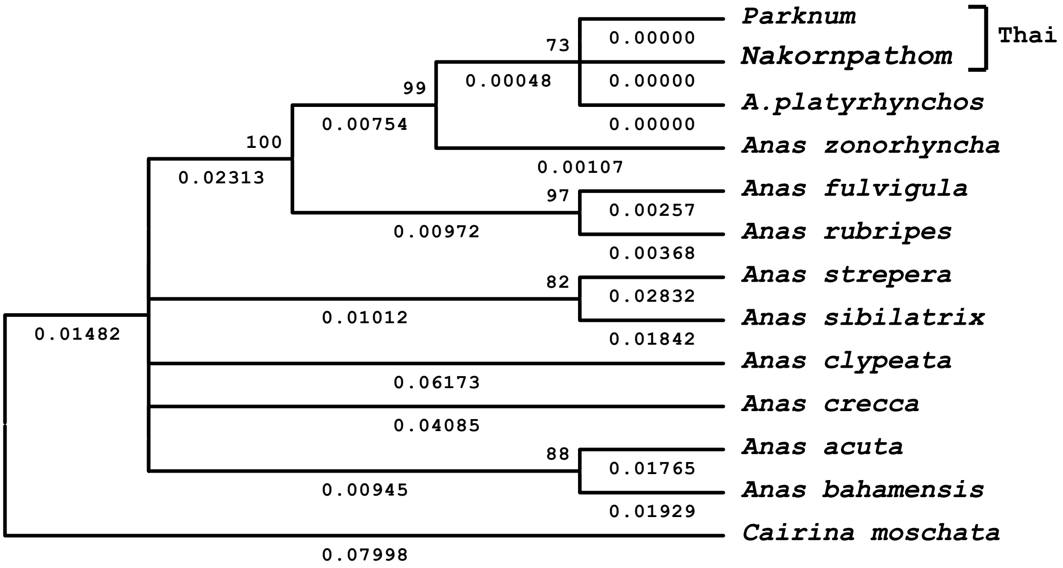
ตารางที่ 15 ลำดับเบสของไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอบริเวณ control ของเป็ดชนิดอื่นจากฐานข้อมูลของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้

Accession no.	สายพันธุ์ (species)	เอกสารอ้างอิง
AY112938	*Anas platyrhynchos*	Donne-Goussé *et al*., 2002
AY506969	*Anas zonorhyncha*	Kulikova *et al*., 2004
AF382649	*Anas fulvigula*	McCracken *et al*., 2001
AF382426	*Anas rubripes*	McCracken *et al*., 2002
DQ449422	*Anas strepera*	Peters and Omland, 2006
AY112939	*Anas acuta*	Donne-Goussé *et al*., 2002
AY112940	*Anas bahamensis*	Donne-Goussé *et al*., 2002
AY112941	*Anas clypeata*	Donne-Goussé *et al*., 2002
AY112942	*Anas crecca*	Donne-Goussé *et al*., 2002
AY112943	*Anas sibilatrix*	Donne-Goussé *et al*., 2002
*AY112952	*Cairina moschata*	Donne-Goussé *et al*., 2002

* เป็ดเทศ (out group)

```
CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment

Parknum          CATACATTTATATTCCCCATATATTAACCTATGGTCCCGGTAATAAACACTATTAACCAA 60
Nakornpathom     CATACATTTATATTCCCCATATATTAACCTATGGTCCCGGTAATAAACACTATTAACCAA 60
                 ************************************************************

Parknum          CTATCCTACATGCACGGACTAAACCCATCACATGTCAACGGACATACCCTACCTATCGGA 120
Nakornpathom     CTATCCTACATGCACGGACTAAACCCATCACATGTCAACGGACATACCCTACCTATCGGA 120
                 ************************************************************

Parknum          CTACCCTCCCAACGGACCCAGAGTGAATGCTCTAATACCCAACACCTCAACACCACATAA 180
Nakornpathom     CTACCCTCCCAACGGACCCAGAGTGAATGCTCTAATACCCAACACCTCAACACCACATAA 180
                 ************************************************************

Parknum          CATGCCCCCAACCAGAACAAGGCCCCATAATGATGAATGCTTGACAGACATACCCTACCA 240
Nakornpathom     CATGCCCCCAACCAGAACAAGGCCCCATAATGATGAATGCTTGACAGACATACCCTACCA 240
                 ************************************************************

Parknum          ACACTCCAAATTCCTCTCCACCCACCCATTACTCATGAAGCTGCGTACCAGATGGATTTA 300
Nakornpathom     ACACTCCAAATTCCTCTCCACCCACCCATTACTCATGAAGCTGCGTACCAGATGGATTTA 300
                 ************************************************************

Parknum          TTAATCGTACACCTCACGTGAAATCAGCAATCCTTGCACATAATGTCCGACGTGACTAGC 360
Nakornpathom     TTAATCGTACACCTCACGTGAAATCAGCAATCCTTGCACATAATGTCCGACGTGACTAGC 360
                 ************************************************************

Parknum          TTCAGGCCCATACGTTCCCCCTAAACCCCTCGCCCTCCTCACATTTTTGCGCCTCTGGTT 420
Nakornpathom     TTCAGGCCCATACGTTCCCCCTAAACCCCTCGCCCTCCTCACATTTTTGCGCCTCTGGTT 420
                 ************************************************************

Parknum          CCTCGGTCAGGGCCATCAATTGGGTTCACTCACCTCTCCTTGCCCTTCAAAGTGGCATCT 480
Nakornpathom     CCTCGGTCAGGGCCATCAATTGGGTTCACTCACCTCTCCTTGCCCTTCAAAGTGGCATCT 480
                 ************************************************************

Parknum          GTGGAATACTTCCACCATCTCAATGCGTAATCGCGGCATCTTCCAGCTTTTTGGCGCCTC 540
Nakornpathom     GTGGAATACTTCCACCATCTCAATGCGTAATCGCGGCATCTTCCAGCTTTTTGGCGCCTC 540
                 ************************************************************

Parknum          TGGTTCCTTTTATTTTTTCCGGGGTTACCTCACAGCTGGCCCTTCCCAGTGACTTCGGGG 600
Nakornpathom     TGGTTCCTTTTATTTTTTCCGGGGTTACCTCACAGCTGGCCCTTCCCAGTGACTTCGGGG 600
                 ************************************************************

Parknum          GTCCCACAATCTAAGCCTGGACACACCTGCGTTATCGCGCTATCCTATATCTCAGGGATT 660
Nakornpathom     GTCCCACAATCTAAGCCTGGACACACCTGCGTTATCGCGCTATCCTATATCTCAGGGATT 660
                 ************************************************************

Parknum          ACTCAAT 667
Nakornpathom     ACTCAAT 667
                 *******
```

ภาพที่ 21 เปรียบเทียบ consensus sequence ของไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอบริเวณ control ของเป็ดพื้นเมืองไทยทั้งสองสายพันธุ์ ด้วยโปรแกรม Clustal_W



ภาพที่ 22 แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระหว่างเป็ดพื้นเมืองไทยพันธุ์ปากน้ำและพันธุ์นครปฐม และเป็ดชนิดอื่นที่อยู่ในสกุล Anas โดยการเปรียบเทียบลำดับเบสของไมโตคอนเดรียบริเวณ control การสร้างแผนภูมิใช้วิธี Neigbor-joining โดยมีเป็ดเทศ (*Cririna moschata*) เป็น out group ตัวเลขบนแขนงแสดงค่า bootstrap และตัวเลขใต้แขนงแสดงค่าระยะห่างทางพันธุกรรม

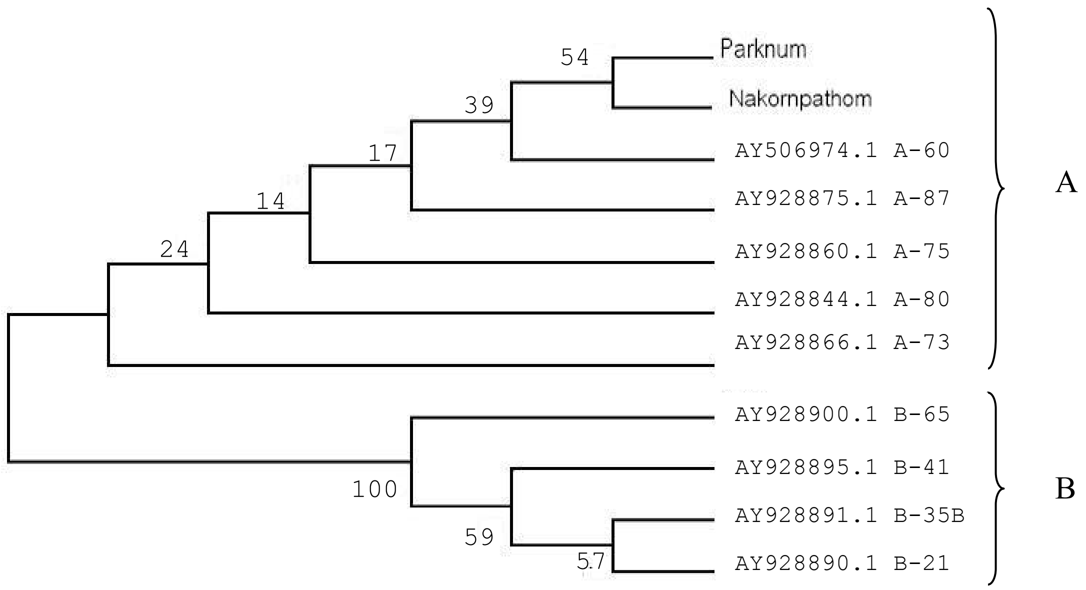
ตารางที่ 16 แสดงความถี่ในรูปเปอร์เซ็นต์ของชนิดเบสที่เป็นส่วนประกอบในสายนิวคลีโอไทด์ (nucleotide frequencies) ขนาด 667 bp ของไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอบริเวณ control ของเป็ดพื้นเมืองพันธุ์ปากน้ำ และพันธุ์นครปฐม และเป็ดป่าหัวเขียว (*Anas platyrhynchos*)

พันธุ์เป็ด	T	C	A	G	total
เป็ดปากน้ำ	25.8	33.4	25.5	15.3	667
เป็ดนครปฐม	25.8	33.4	25.5	15.3	667
เป็ดป่าหัวเขียว	25.8	33.4	25.5	15.3	667
Avg.	25.8	33.4	25.5	15.3	667

```
CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment


Parknum             CATACATTTATATTCCCCATATATTAACCTATGGTCCCGGTAATAAACACTATTAACCAA 60
A.platyrhynchos     CATACATTTATATTCCCCATATATTAACCTATGGTCCCGGTAATAAACACTATTAACCAA 60
Nakornpathom        CATACATTTATATTCCCCATATATTAACCTATGGTCCCGGTAATAAACACTATTAACCAA 60
                    ************************************************************

Parknum             CTATCCTACATGCACGGACTAAACCCATCACATGTCAACGGACATACCCTACCTATCGGA 120
A.platyrhynchos     CTATCCTACATGCACGGACTAAACCCATCACATGTCAACGGACATACCCTACCTATCGGA 120
Nakornpathom        CTATCCTACATGCACGGACTAAACCCATCACATGTCAACGGACATACCCTACCTATCGGA 120
                    ************************************************************

Parknum             CTACCCTCCCAACGGACCCAGAGTGAATGCTCTAATACCCAACACCTCAACACCACATAA 180
A.platyrhynchos     CTACCCTCCCAACGGACCCAGAGTGAATGCTCTAATACCCAACACCTCAACACCACATAA 180
Nakornpathom        CTACCCTCCCAACGGACCCAGAGTGAATGCTCTAATACCCAACACCTCAACACCACATAA 180
                    ************************************************************

Parknum             CATGCCCCCAACCAGAACAAGGCCCCATAATGATGAATGCTTGACAGACATACCCTACCA 240
A.platyrhynchos     CATGCCCCCAACCAGAACAAGGCCCCATAATGATGAATGCTTGACAGACATACCCTACCA 240
Nakornpathom        CATGCCCCCAACCAGAACAAGGCCCCATAATGATGAATGCTTGACAGACATACCCTACCA 240
                    ************************************************************

Parknum             ACACTCCAAATTCCTCTCCACCCACCCATTACTCATGAAGCTGCGTACCAGATGGATTTA 300
A.platyrhynchos     ACACTCCAAATTCCTCTCCACCCACCCATTACTCATGAAGCTGCGTACCAGATGGATTTA 300
Nakornpathom        ACACTCCAAATTCCTCTCCACCCACCCATTACTCATGAAGCTGCGTACCAGATGGATTTA 300
                    ************************************************************

Parknum             TTAATCGTACACCTCACGTGAAATCAGCAATCCTTGCACATAATGTCCGACGTGACTAGC 360
A.platyrhynchos     TTAATCGTACACCTCACGTGAAATCAGCAATCCTTGCACATAATGTCCGACGTGACTAGC 360
Nakornpathom        TTAATCGTACACCTCACGTGAAATCAGCAATCCTTGCACATAATGTCCGACGTGACTAGC 360
                    ************************************************************

Parknum             TTCAGGCCCATACGTTCCCCCTAAACCCCTCGCCCTCCTCACATTTTTGCGCCTCTGGTT 420
A.platyrhynchos     TTCAGGCCCATACGTTCCCCCTAAACCCCTCGCCCTCCTCACATTTTTGCGCCTCTGGTT 420
Nakornpathom        TTCAGGCCCATACGTTCCCCCTAAACCCCTCGCCCTCCTCACATTTTTGCGCCTCTGGTT 420
                    ************************************************************

Parknum             CCTCGGTCAGGGCCATCAATTGGGTTCACTCACCTCTCCTTGCCCTTCAAAGTGGCATCT 480
A.platyrhynchos     CCTCGGTCAGGGCCATCAATTGGGTTCACTCACCTCTCCTTGCCCTTCAAAGTGGCATCT 480
Nakornpathom        CCTCGGTCAGGGCCATCAATTGGGTTCACTCACCTCTCCTTGCCCTTCAAAGTGGCATCT 480
                    ************************************************************

Parknum             GTGGAATACTTCCACCATCTCAATGCGTAATCGCGGCATCTTCCAGCTTTTTGGCGCCTC 540
A.platyrhynchos     GTGGAATACTTCCACCATCTCAATGCGTAATCGCGGCATCTTCCAGCTTTTTGGCGCCTC 540
Nakornpathom        GTGGAATACTTCCACCATCTCAATGCGTAATCGCGGCATCTTCCAGCTTTTTGGCGCCTC 540
                    ************************************************************

Parknum             TGGTTCCTTTTATTTTTTCCGGGGTTACCTCACAGCTGGCCCTTCCCAGTGACTTCGGGG 600
A.platyrhynchos     TGGTTCCTTTTATTTTTTCCGGGGTTACCTCACAGCTGGCCCTTCCCAGTGACTTCGGGG 600
Nakornpathom        TGGTTCCTTTTATTTTTTCCGGGGTTACCTCACAGCTGGCCCTTCCCAGTGACTTCGGGG 600
                    ************************************************************

Parknum             GTCCCACAATCTAAGCCTGGACACACCTGCGTTATCGCGCTATCCTATATCTCAGGGATT 660
A.platyrhynchos     GTCCCACAATCTAAGCCTGGACACACCTGCGTTATCGCGCTATCCTATATCTCAGGGATT 660
Nakornpathom        GTCCCACAATCTAAGCCTGGACACACCTGCGTTATCGCGCTATCCTATATCTCAGGGATT 660
                    ************************************************************

Parknum             ACTCAAT 667
A.platyrhynchos     ACTCAAT 667
Nakornpathom        ACTCAAT 667
                    *******
```

ภาพที่ 23 เปรียบเทียบ consensus sequence ของไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอบริเวณ control ของเป็ดพื้นเมืองไทยทั้งสองสายพันธุ์ และเป็ดป่าหัวเขียว (AY112938) ด้วยโปรแกรม Clustal_W

นอกจากนี้ การสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของเป็ดพื้นเมืองไทยร่วมกับเป็ดป่าหัวเขียวโดยอาศัยข้อมูลลำดับเบสใน GenBank database ตามรายงานของ Kulikova *et al.* (2005) พบว่าเป็ดพื้นเมืองไทยได้รับการจัดกลุ่มอยู่ใน haplotype A (ภาพที่ 24) ตามลักษณะการจัดกลุ่มเป็ดป่าหัวเขียวในโลกที่ Kulikova *et al.* (2005) รายงานไว้ว่าจัดได้เป็น 2 กลุ่ม คือ haplotype A และ haplotype B จึงเป็นการเพิ่มเติมข้อมูลจากเดิมที่ Kulikova *et al.* (2005) เคยรายงานไว้ว่าพบการแพร่กระจายตัวของเป็ดป่าหัวเขียว haplotype A ในเขตเอเชียตอนเหนือ หมู่เกาะ Aleutian และบริเวณรัสเซียตะวันออก และการศึกษานี้ได้รายงานการมีอยู่ของเป็ดในกลุ่มเป็ดป่าหัวเขียว haplotype A ในประเทศไทย

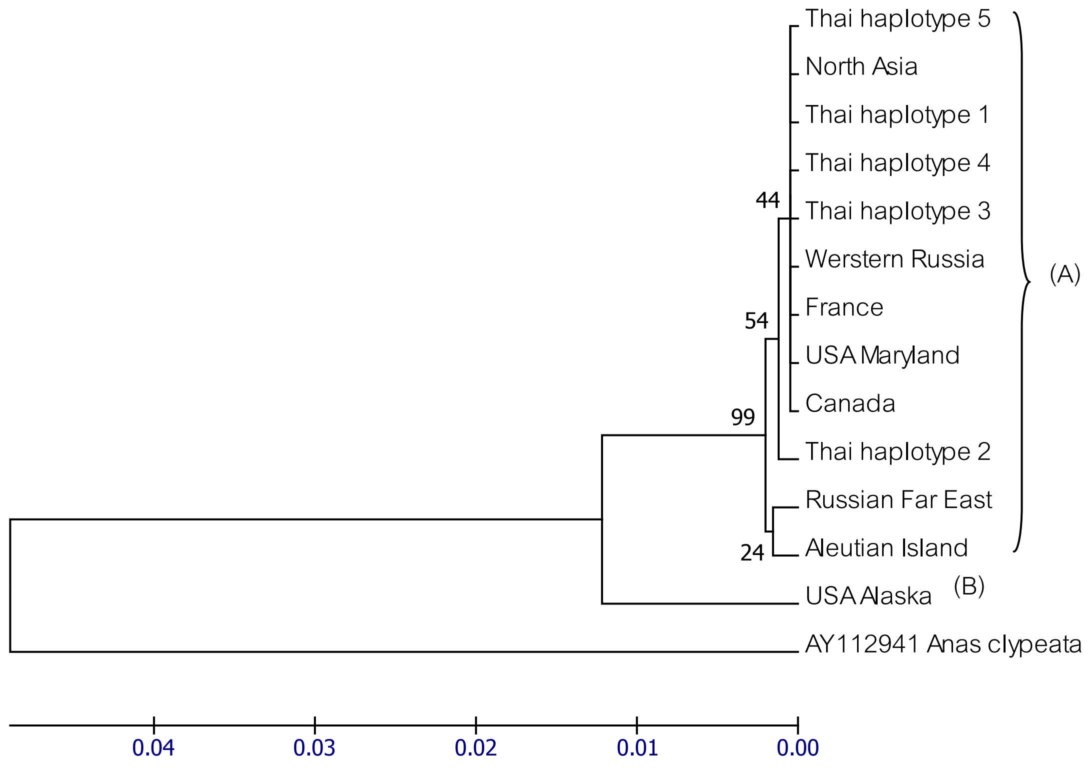


ภาพที่ 24 แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระหว่างเป็ดพื้นเมืองไทยและเป็ดป่าหัวเขียว haplotype A และ B บางส่วนที่เลือกจากการศึกษาของ Kulikova *et al.* (2005) โดยการเปรียบเทียบลำดับเบสบริเวณ control ของไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอ การสร้างแผนภูมิใช้วิธี Neighbor-joining

การเปรียบเทียบลำดับเบสของไมโตคอนเดรียบริเวณ control ขนาด 667 ทั้งหมด 5 haplotypes ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ โดยการสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการร่วมกับเป็ดป่าหัวเขียวที่กระจายอยู่ตามแหล่งต่างๆทั่วโลก ซึ่งมีข้อมูลรายงานจาก GenBank database (ตารางที่ 17) พบว่าเป็ดพื้นเมืองของไทย haplotype 1 3 4 และ 5 มีความใกล้ชิดกับเป็ดป่าหัวเขียวในแถบเอเชียตอนเหนือ รัสเซียตะวันตก ฝรั่งเศส สหรัฐอเมริกา รัฐ Maryland และประเทศแคนาดา และแยกจากเป็ดพื้นเมืองไทย haplotype 2 (ค่า bootstrap เท่ากับ 54) ในขณะที่เป็ดป่าหัวเขียวจากหมู่เกาะ Alaska ประเทศสหรัสอเมริกาจะแยกออกมาจากเป็ดป่าหัวเขียวจากทุกแหล่งอย่างชัดเจน (ภาพที่ 25)

ตารางที่ 17 ลำดับเบสของไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอบริเวณ control ของเป็ดป่าหัวเขียวจากแหล่งอื่นจากฐานข้อมูลของ National Center for Biotechnology Information (NCBI)

Locus Name	Source	Ref.
AY 506868	Russian Far East	Kulicova, *et al*., 2004
AY 928231	Werstern Russian	Kulicova, *et al*., 2005
AY 928860	Alutian Island	Kulicova, *et al*., 2005
AY 928844	North Asia	Kulicova, *et al*., 2005
AY 928900	USA: Alaska	Kulicova, *et al*., 2005
AF 382408	USA: Maryland	McCracken, *et al*., 2001
AY 112938	France	Donne-Gousse, *et al*., 2002
DUKMTNDTGS	Canada	Ramirez, *et al*., 1993



ภาพที่ 25 แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระหว่างเป็ดพื้นเมืองไทย 5 haplotypes และเป็ดป่าหัวเขียวจากแหล่งอื่น โดยการเปรียบเทียบลำดับเบสบริเวณ control ของไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอ การสร้างแผนภูมิใช้วิธี Neighbor-joining และแสดงแผนภูมิแบบ linearized tree และการจำแนกชนิดของ mtDNA haplotype ตามรายงานของ Kulikova et al. (2005)

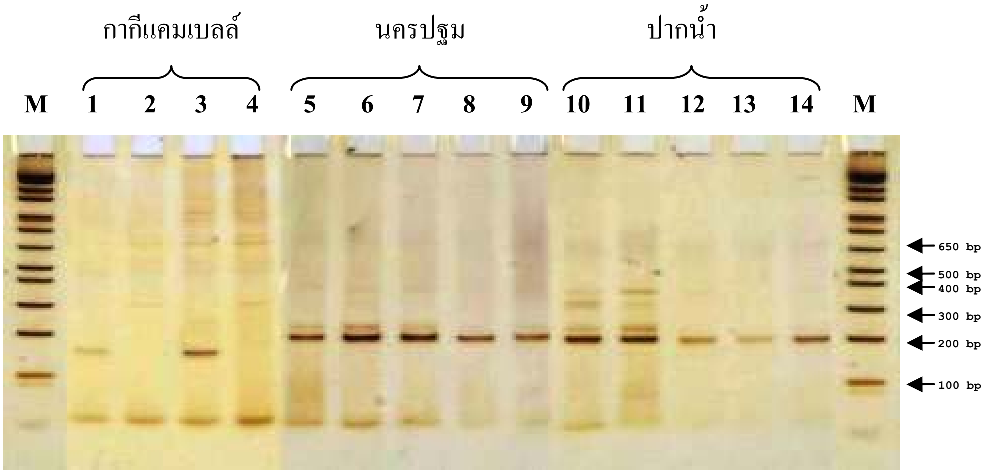
5. การเปรียบเทียบลักษณะทางพันธุกรรมของเป็ดพื้นเมืองไทยและเป็ดกากีแคมเบลล์ ด้วยเทคนิคไมโครแซทเทลไลท์

การศึกษาเบื้องต้นเพื่อค้นหาเครื่องหมายทางพันธุกรรม สำหรับแยกระหว่างเป็ดพื้นเมืองไทยและเป็ดเลี้ยงที่นำเข้าจากต่างประเทศ อาศัยเทคนิคไมโครแซทเทลไลท์ พีซีอาร์ (PCR microsatellite technique) เพื่อเปรียบเทียบลักษณะที่แตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างเป็ดพื้นเมืองไทย 2 สายพันธุ์คือ เป็ดปากน้ำ (5 ตัว) และเป็ดนครปฐม (5 ตัว) และเป็ดกากีแคมเบลล์ (4 ตัว) โดยใช้ไมโครแซทเทลไลท์ไพรเมอร์ จำนวน 3 คู่ คือ APH23 (Maak *et al*., 2003) CAUD013 และ CAUD019 (Huang *et al*., 2005) ร่วมกับการตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์บน 6% โพลิอะคริลาไมด์เจล แยกด้วยเทคนิคอิเลคโทรโฟเรซิส และวิเคราะห์ขนาดของผลผลิตพีซีอาร์บนเจลด้วยสายตาร่วมกับการใช้โปรแกรม Kodak 1D Image Analysis Software พบว่ารูปแบบของการเกิดแถบดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากแต่ละคู่ไพรเมอร์มีลักษณะแตกต่างจากที่มีรายงานไว้ในเป็ดปักกิ่ง (Peking duck) โดย Maak *et al.* (2003) และ Huang *et al.* (2005) ก่อนหน้านี้ ทั้งขนาดและจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้ ดังแสดงในตารางที่ 18

ตารางที่ 18 เปรียบเทียบจำนวนและขนาดของดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ด้วยไมโครแซทเทลไลท์ไพรเมอร์ APH23 CAUD013 และ CAUD019 ระหว่างผลที่ได้จากการศึกษานี้และผลการศึกษาในเป็ดปักกิ่ง(Peking duck) ของ Maak และคณะ (2003) และ Huang และคณะ (2005)

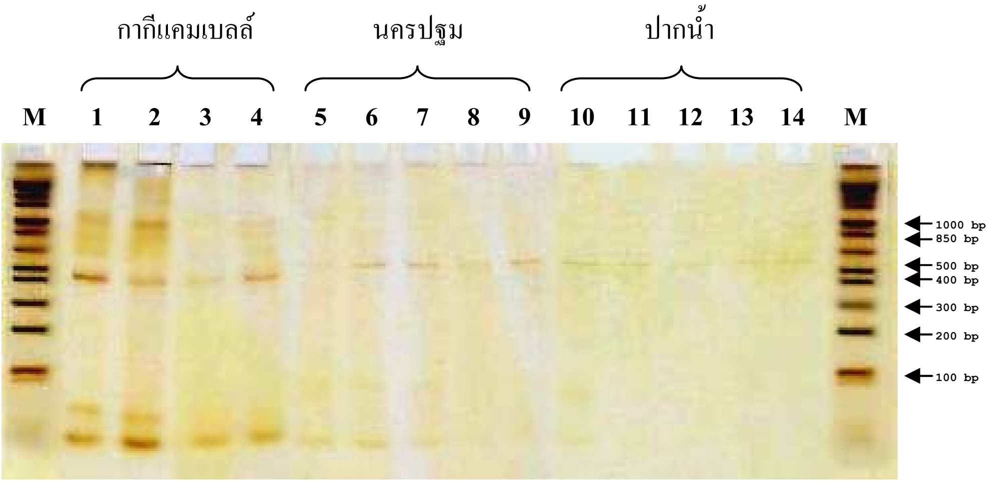
คู่ไพรเมอร์	ผลผลิตพีซีอาร์ที่สังเคราะห์ได้จากงานวิจัยครั้งนี้		ผลผลิตพีซีอาร์ที่สังเคราะห์ได้จากงานวิจัยก่อนหน้า		แหล่งอ้างอิง
	จำนวน (แถบ)	ขนาด (bp)	จำนวน (แถบ)	ขนาด (bp)	
APH23	6	175-390	1	205	Maak *et al*., 2003
CAUD013	5	400-1,000	7	85-113	Huang *et al*., 2005
CAUD019	9	130-387	13	132-213	Huang *et al*., 2005

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเป็ดทั้ง 3 สายพันธุ์ด้วยเทคนิคพีซีอาร์และคู่ไมโครแซทเทลไลท์ไพรเมอร์ APH23 ให้ผลผลิตพีซีอาร์บนเจลจำนวน 6 แถบ มีขนาดประมาณ 175 180 200 210 300 และ 390 bp (ภาพที่ 26) ทั้งนี้ เป็ดนครปฐม และเป็ดปากน้ำ ให้ผลผลิตพีซีอาร์ที่มีแถบเห็นชัดเจนขนาด 200 bp ทุกตัวอย่าง จัดเป็น monomorphic band ขณะที่เป็ดกากีแคมเบลล์ไม่พบแถบดีเอ็นเอขนาด 200 bp แต่พบแถบดีเอ็นเอที่ชัดเจนขนาด 175 bp เพียง 1 ตัวอย่างเท่านั้น (ตัวอย่างที่ 3) ส่วนที่เหลือไม่พบแถบดีเอ็นเอเกิดขึ้นอย่างชัดเจนโดยตัวแรกพบ ขนาด 180 bp และตัวที่ 2 และ 4 พบมีแถบดีเอ็นเอขนาดใหญ่ประมาณ 650 bp ขึ้นไป จากผลการศึกษาเบื้องต้นแสดงให้เห็นว่าคู่ไมโครแซทเทลไลท์ไพรเมอร์ APH23 ให้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 200 bp จากตัวอย่างเป็ดพื้นเมืองไทย แต่ไม่พบจากตัวอย่างเป็ดกากีแคมเบลล์ที่ใช้ในการศึกษา ดังนั้นเป็นที่น่าสนใจว่า คู่ไพรเมอร์ APH23 อาจใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อการตรวจสอบสำหรับแยกเป็ดพื้นเมืองไทยจากเป็ดชนิดอื่นได้ อย่างไรก็ตามต้องมีการศึกษาเพิ่มเติม โดยการเพิ่มจำนวนตัวอย่างเป็ดจากแหล่งต่างๆ ในการวิเคราะห์ให้มากขึ้น และควรทดสอบในเป็ดสายพันธุ์อื่นๆด้วย



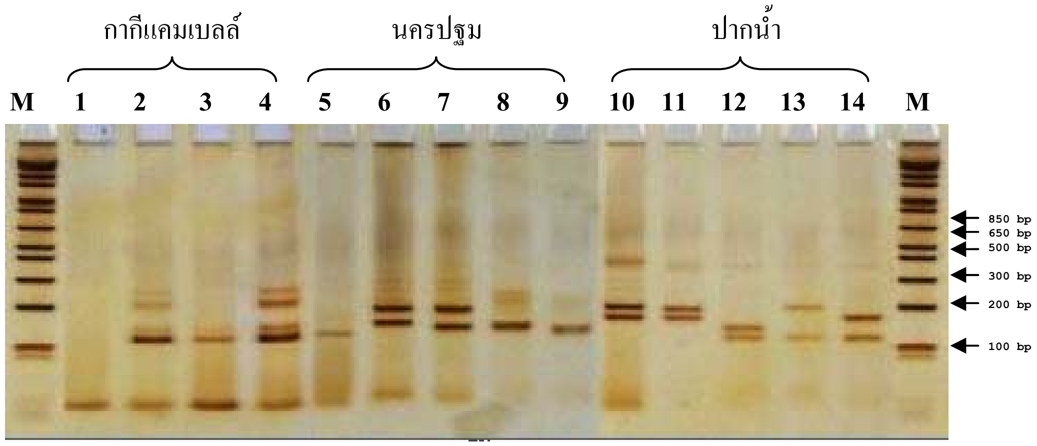
ภาพที่ 26 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากเทคนิคพีซีอาร์ที่สังเคราะห์ด้วยคู่ไมโครแซทเทลไลท์ไพรเมอร์APH23 ในเป็ด 3 สายพันธุ์ คือ เป็ดกากีแคมเบลล์ (ลำดับที่ 1-4) เป็ดนครปฐม (ลำดับที่ 5-9) และ คือเป็ดปากน้ำ (ลำดับที่ 10-14) (M= 1Kb Plus DNA marker)

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเป็ดทั้ง 3 สายพันธุ์ด้วยเทคนิคพีซีอาร์และคู่ไมโครแซทเทลไลท์ไพรเมอร์ CAUD013 ให้ผลผลิตพีซีอาร์บนเจล จำนวน 5 แถบ มีขนาดประมาณ 400 550 650 850 และ 1,000 bp (ภาพที่ 27) แต่แถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นมีลักษณะจาง และขนาดแตกต่างจากที่รายงานไว้ โดย Huang และคณะ (2005) จึงอาจเป็นไปได้ว่าคู่ไพรเมอร์ CAUD013 ไม่สามารถจับกับดีเอ็นเอต้นแบบ หรือจับได้ไม่ดีบนดีเอ็นเอต้นแบบของเป็ดพื้นเมืองไทย ขณะที่แถบดีเอ็นเอที่พบจากตัวอย่างของเป็ดกากีแคมเบลล์ มีขนาดและมีรูปแบบไม่ชัดเจน ทั้งนี้ผลผลิตพีซีอาร์ที่เกิดขึ้นทั้งหมดมีขนาด (85-113 bp) ตามการอ้างอิงของ Haung และคณะ (2005) ซึ่งเป็นไปได้ว่าเทคนิคที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้อาจไม่มีประสิทธิภาพเพียงพอสำหรับการตรวจผลผลิตพีซีอาร์ดังกล่าว ดังนั้นคู่ไพรเมอร์ CAUD013 อาจไม่เหมาะสำหรับใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลของการศึกษาตัวอย่างเป็ดในการศึกษาครั้งนี้ หรือหากมีการศึกษาต่อไป ควรมีการทดลองปรับสภาวะในปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่เหมาะสม หรือเลือกใช้เทคนิคที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น



ภาพที่ 27 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากเทคนิคพีซีอาร์ที่สังเคราะห์ด้วยคู่ไมโครแซทเทลไลท์ไพรเมอร์ CAUD013 ในเป็ด 3 สายพันธุ์ คือ เป็ดกากีแคมเบลล์ (ลำดับที่ 1-4) เป็ดนครปฐม (ลำดับ 5-9) และ คือเป็ดปากน้ำ (ลำดับที่ 10-14) (M= 1Kb Plus DNA marker)

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเป็ดทั้ง 3 สายพันธุ์ด้วยเทคนิคพีซีอาร์และคู่ไมโครแซทเทลไลท์ไพรเมอร์ CAUD019 ให้ผลผลิตพีซีอาร์บนเจล จำนวน 9 แถบ มีขนาดประมาณ 130, 147, 156, 160, 182, 190, 200, 260 และ 387 bp (ภาพที่ 28) ลักษณะรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นมีความหลากหลาย (polymorphic) ระหว่างเป็ดแต่ละตัว แสดงให้เห็นว่าคู่ไพรเมอร์ CAUD019 อาจเหมาะสำหรับใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่ต้องการลักษณะเฉพาะตัว จึงอาจมีประโยชน์ต่อการสืบหาความสัมพันธ์ระหว่างพ่อ แม่ ลูก หรือใช้เป็นเครื่องหมายเฉพาะของสัตว์แต่ละตัว



ภาพที่ 28 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากเทคนิคพีซีอาร์ที่สังเคราะห์ด้วยคู่ไมโครแซทเทลไลท์ไพรเมอร์ CAUD019 ในเป็ด 3 สายพันธุ์ คือ เป็ดกากีแคมเบลล์ (ลำดับที่ 1-4) เป็ดนครปฐม (ลำดับ 5-9) และ คือเป็ดปากน้ำ (ลำดับที่ 10-14) (M= 1Kb Plus DNA marker)

สรุปและข้อเสนอแนะ

1. การศึกษาครั้งนี้ ได้ทดสอบวิธีการสกัดไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอจากขนด้วยอัลคาไลน์ (alkaline extraction) โดยใช้ 0.2N NaOH ย่อยขน แล้วปรับให้เป็นกลางด้วย Tris-HCl pH 7.5 จากนั้นนำไปใช้กับเทคนิคพีซีอาร์โดยตรง วิธีการนี้สกัดไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอของเป็ดเสร็จภายในเวลา 20 นาที ให้ผลในการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ที่ถูกต้องและทำซ้ำได้ และราคาถูกกว่าการย่อยด้วย proteinase K ร่วมกับ SDS หรือชุดสกัดทางการค้า QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) จึงเป็นวิธีที่ง่าย ประหยัด และปราศจากขั้นตอนการสกัดที่อันตรายเพื่อใช้เตรียมไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอในการศึกษาพันธุศาสตร์ประชากรและวิวัฒนาการระดับโมเลกุลของเป็ด

2. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระดับโมเลกุลระหว่างเป็ดพื้นเมืองไทยสองสายพันธุ์ (พันธุ์นครปฐมและพันธุ์ปากน้ำ) และเป็ดพันธุ์อื่นในสกุล Anas โดยการเปรียบเทียบลำดับเบสส่วน control region ของไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอ สามารถจัดเป็ดพื้นเมืองไทยอยู่ในกลุ่ม (cluster) เดียวกับเป็ดป่าหัวเขียว (Mallard, *Anas platyrhynchos*) สอดคล้องตามข้อสันนิษฐานตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ว่าเป็ดพื้นเมืองไทยมีบรรพบุรุษมาจากเป็ดป่าหัวเขียว นอกจากนี้ ยังพบว่าเป็ดพื้นเมืองไทยทั้งสองสายพันธุ์เป็นเป็ดป่าหัวเขียว haplotype A อย่างไรก็ตาม การจำแนกเป็ดพื้นเมืองไทยสองสายพันธุ์คือ เป็ดปากน้ำ และเป็ดนครปฐม โดยใช้การเปรียบเทียบลำดับเบสของไมโตคอนเดรียบริเวณ control ในการศึกษาครั้งนี้ ไม่สามารถแยกความแตกต่างของเป็ดทั้งสองสายพันธุ์ได้ การศึกษาในอนาคตจึงควรมีการเพิ่มความยาวของลำดับเบสมากขึ้น หรือเพิ่มตำแหน่งของบริเวณที่ใช้ในการเปรียบเทียบ และควรใช้ข้อมูลดังกล่าวประกอบร่วมกันในการวิเคราะห์

3. การศึกษาเครื่องหมายโมเลกุลทางพันธุกรรมบางส่วนของเป็ดพื้นเมืองไทยเปรียบเทียบกับเป็ดเลี้ยงที่นำเข้าจากต่างประเทศ (พันธุ์กากีแคมเบลล์) โดยไมโครแซทเทลไลท์ไพรเมอร์ จำนวน 3 คู่ คือ APH23 CAUD013 และ CAUD019 ร่วมกับการตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์บน 6% โพลิอะครีลาไมด์เจล แยกด้วยเทคนิคอิเลคโทรโฟเรซิส พบว่าคู่ไพรเมอร์แต่ละคู่ ให้รูปแบบแถบดีเอ็นเอบนเจลแตกต่างกัน โดยพบว่า คู่ไพรเมอร์ APH 23 ให้แถบผลผลิตพีซีอาร์ที่สามารถแยกระหว่างเป็ดพื้นเมืองไทยกับเป็ดกากีแคมเบลล์ได้ ขณะที่คู่ไพรเมอร์ CAUD013 และ CAUD019 ไม่สามารถจำแนกเป็ดทั้งสามสายพันธุ์ดังกล่าวได้ โดยคู่ไพรเมอร์ CAUD013 จับได้ไม่ดีบนดีเอ็นเอต้นแบบของเป็ดพื้นเมืองไทย และแถบดีเอ็นเอที่พบจากตัวอย่างของเป็ด

กากีแคมเบลล์ มีขนาดและมีรูปแบบไม่ชัดเจน ส่วนคู่ไพรเมอร์ CAUD019 ให้ผลผลิตพีซีอาร์บนเจลที่มีความหลากหลาย (polymorphic) ระหว่างเป็ดแต่ละตัว เหมาะสำหรับใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่ต้องการลักษณะเฉพาะตัว เช่นการสืบหาความสัมพันธ์ระหว่างพ่อ แม่ ลูก หรือใช้เป็นเครื่องหมายเฉพาะของสัตว์แต่ละตัว อย่างไรก็ตามการศึกษาลักษณะพันธุกรรมของไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอในเป็ดพื้นเมืองไทย ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมโดยการเพิ่มจำนวนตัวอย่างเป็ดจากแหล่งต่างๆ ในการวิเคราะห์ให้มากขึ้น และควรทดสอบในเป็ดสายพันธุ์อื่นๆ ด้วย

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กระจ่าง วิสุทธารมณ์. 2541. **การเลี้ยงเป็ด**. เอกสารเผยแพร่อันดับที่ 45. ศูนย์ส่งเสริมและ ฝึกอบรมการเกษตรแห่งชาติ. สำนักส่งเสริมและฝึกอบรม มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ www.doae.go.th/library/html/detail/duck/index.html.

กลุ่มงานสัตว์ปีก กองบำรุงพันธุ์สัตว์ กรมปศุสัตว์. 2548. **การพัฒนาสัตว์ปีกเพื่อการเกษตร**. http://www.dld.go.th/breeding/P/p_d.htm

นิตย์ ถาวรกันต์. 2517. **คู่มือการเลี้ยงเป็ด**. ห้างหุ้นส่วนสามัญนิติบุคคล รวมทอง, กรุงเทพฯ. 212 น.

ปฐม เลาหะเกษตร. 2529. **การเลี้ยงเป็ด**. โอ.เอส.พริ้นติ้งเฮาส์, กรุงเทพฯ. 57 น.

ปรีชา ประเทพา. 2543. พันธุศาสตร์ยุคใหม่ : เทคโนโลยีดีเอ็นเอเพื่อการอนุรักษ์ทรัพยากรพันธุกรรม. อภิชาตการพิมพ์, มหาสารคาม.105 น.

พินิจ ลำดวนหอม. 2530. **การเลี้ยงเป็ด**. อักษรบัณฑิต, กรุงทพฯ. 144 น.

ลัดดา เอกสมทราเมษฐ์. 2547**. ชีววิทยาของเซลล์**. โอเดียนสโตร์, กรุงเทพฯ. 264 น.

วิโรจน์ จันทรัตน์. 2538. **เอกสารคำสอน สป. 420 กายวิภาคและสรีรวิทยาของสัตว์ปีก (Avian Anatomy and Physiology)**. ภาควิชาเทคโนโลยีทางสัตว์. สถาบันเทคโนโลยีการเกษตรแม่โจ้, เชียงใหม่. 898 น.

วิสุทธิ์ ใบไม้. 2530. **การเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมในกระบวนการวิวัฒนาการ**. รวมผลงานวิชาการสัมมนาวิชาการทางพันธุศาสตร์ ครั้งที่ 5. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ

สุรินทร์ ปิยะโชคคณากุล. 2545. **จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ : ปฏิบัติการอาร์เอพีดีและเอเอฟแอลพี.** สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. 116 น.

สุรีพร เกตุงาม. 2546. **เครื่องหมายดีเอ็นเอในงานปรับปรุงพันธุ์พืช**. วารสารวิชาการ ม.อบ. มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. 2 : 38-59.

อุทัยรัตน์ ณ นคร. 2543. **พันธุศาสตร์สัตว์น้ำ**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 203 น.

โอภาส ขอบเขตต์. 2541. **นกในเมืองไทย เล่ม 1**. สำนักพิมพ์สารคดี, กรุงเทพฯ. 248 น.

Avise, JC., CD. Ankney and WS. Nelson .1990. Mitochondrial Gene Trees the Evolutionary Relationship of Mallard and Black ducks. **Evolution**. 44 :1109-1119.

Brown, S.M., A.K. Szewc-McFadden and S. Kresovish. 1996. **Development and application of simple sequence repeat (SSR) loci for plant genome analysis. In.Methods of plant genome analysis : Their merits and pitfalls**. Jauhar, P.P. (ed.). CRS Press, Boca raton, FL. U.S.A. pp. 147-159.

Castro, A.J., P. Antonia and R. Misericordia. 1998. Mitochondrial DNA: a tool for populational genetics studies. **Int. Microbiol**. 1 : 327-332.

Cyan, K. 2005. **Mitochondrial DNA Function Locations 1**. http://www.cyanworks.net/ archives/pe/works.html.

Delacour, J. and E. Mayr. 1945. The family Anatidae. **Wilson Bull**. 57 : 3-55.

Desjardins P., and R. Morais. 1990. Sequence and gene organization of the chicken mitochondrial genome. A novel gene order in higher vertebrates. **J. Mol. Biol**. 212 : 599-634.

Donne-Goussé, C., V. Laudet and C. Hänni. 2002. A molecular phylogeny of anseriformes base on mitochondrial DNA analysis. **Mol. Phylogenet. Evol**. 23 : 339-356.

Fernandez-silva, P., JA. Enriquez and J. Montaya. 2003. Replication and transcription of mammalian mitochondrial DNA. **Exp. Physiol**. 88 : 41-56.

Gillbert, P., M. Thomas, S.W. Andrew, B. Michael, J.H. Anders, W. Eske, S. Beth, Thomas F.G. Higham., P.R. Michael, C. Tamsin, J.T. Desmond, C.J. Robert and C. Alan. 2005. Ancient mitochondrial DNA from hair. **Curr. Biol**. 14 : 464.

Goodwin RL., H. Buamann and FG. Berger. 1996. Patterns of divergence during evolution of α -proteinase inhibitors in mammals. **Mol. Biol. Evol**. 13 : 346-358.

Graffy, A.E. and R.F. David. 2005. A Simplified Method for Mitochondrial DNA Extraction from Head Hair Shafts. **J. Forensic Sci**. 50 : 1-4.

Grant, A. 2001. **DNA sexing of brown kiwi (*Apteryx mantelli*) from feather samples**. DOC Science International Series 13. Department of Conservation, Wellington 16 p.

Horrath, B.M., Begona Martuez-Cruz., J.N. Juan, K. Lajos, and A.G. Jose. 2005. An overlooked DNA source for non-invasive genetic analysis in birds. **J. Avian Biol**. 36:84-88.

Huang, Y., J. Tu, X. Cheng, B. Tang, X. Hu, Z. Liu, J. Feng, Y. Lou. L. Lin, Y. Zhao and N. Li. 2005. Characterization of 35 novel microsatellite DNA markers from the duck (Anas platyrhynchos) genome and cross-amplification in other birds. **Genet. Sel. Evol**. 37 : 455-472.

Jermann, TM., JC. Opitz, J. Stackhouse and SA. Banneer. 1995. Reconstructing the Evolutionary history of the Artiodactyl ribonuclease superfamily. **Nature**. 374 : 57-59.

Johnsgard, P.A. 1968. Waterfowl : **Their Biology and Natural History**. Lincoln, University of Nebraska Press.

Johnson, KP. and MD. Sorenson. 1998. Comparing Molecular Evolution in two Mitochondrial Protein Coding Genes (cytochrome b and ND2) in the Dabbling ducks (Tribe : Anatini). **Mol. Phylogenet. Evol**. 10 : 82-94.

Johnson, KP. and MD. Sorenson. 1999. Phylogeny and biogeography of dabbling ducks (genus: Anas): A comparision of molecular and morphological evidence. **Auk**. 116 : 792-805.

Kulikova, I.V., Y. N. Zeuravlev and K.G. McCracken. 2004. Asymmetric hybridization and sex-biased gene flow between estern spot-billed ducks (Anas zonorhycha) and mallards (A. platyrhynchos) in the Russian far east. **Auk**. 212 : 930-949.

Kulikova, I.V., S. V. Drovetski, D.D. Gibson, R.J. Harrigan, S. Rohwer, M.D. Sorenson, K. Winker, Y.N. Zhuravlev, and K.G. McCracken. 2005. Phylogeography of the mallard (Anasplatyhrynchos): Hybridization, dispersal, and lineage sorting contribute complex geographic structure. **Auk**. 122 : 949-965.

Kumar, S., K. Tamura, and M. Nei (2004) MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. **Brief. Bioinformatics**. 5:150-163.

Leeton, P.and C. Leslie. 1993. Feather from museum bird skins-a good source of DNA for phylogenetic studies. **The Condor**. 95:465-466.

Lehtonen, M. 2002. **Mitochondrial DNA sequence variation in patients with sensorineural hearing impairment and in the finnish population**. University of Oulu. 96 p.

Livezey, B.C. 1991. A phylogenetic analysis of and classification of recent dabbling Ducks (tribe Anatini) based on comparative morphology. **Auk**. 108 : 471-507.

Livezey, B.C. 1997. A phylogenetic classification of waterfowl (Aves: Anseriformes), including selected fossil species. **Ann. Car. Mus**. 66 : 457-496.

Loew, S. 2000. **Quantitative Methods in Conservation Bilogy**. New York Springer-Verlag New York. p. 226-258.

Maak, S., K. Wimmers, S. Weigend and K. Neumann. 2003. Isolation and characterization of 18 microsatellite in the Peking duck (Anas platyrhynchos) and their application in other waterfowl species. **Mol. Ecol. Notes**. 3 : 224-227.

Malago, W.Jr., H.M. Franco, E.Jr. Matheucci, A. Medaglia and H. Silva. 2002. Larg scale sex typing of ostriches using DNA extracrd from feathers. **BMC Biotechnol.** 2:19.

McCracken, KG., WP. Johnson and FH. Sheldon. 2001. Molecular Population Genetics, Phylogeography, and Conservatin Biology of the Mottled duck (Anus fulvigula). **Conservation Genetic**. 2 : 87-102.

Morin, P.A., J. Misser, and D.S. Woodruff, 1994. DNA extraction, amplification and direct sequencing from hornbill feathers. **J.Sci.Soc.Thailand**. 20:31-41.

Moum, T., U. Arnaso and E. Arnasn. 2002. Mitochondrial DNA Sequence Evolution and Phylogeny of the Atlantic Alcidae, Including the Extinct Great Auk (*Pinguinus impennis*)**. Mol.Biol.Evol**. 19 : 1434-1439.

Nash H. 2006. **Feather Types, Anatomy, and Molting**. http://www.peteducation.com/article.cfm?cls=15&cat=1829&articleid=2776

Nei, M., and S. Kumar. 2000. **Molecular Evolution and Phylogenetics.** Oxford University Press,Inc. New York. 333 p.

Omland, KE. 1994. Character congruence between a molecular and a morphologal phylogeny for Dabbling ducks (Anus). **Syst.Biol**. 43(3) : 369-386.

Omland, KE. 1997**.** Examining two standard assumption of ancestral reconstruction : repeated loss dichromatism in Dabbling duck (Anatini). **Evolution**. 51(5) : 1636-1646.

Omland, KE., C.L. Tarr, W.I. Boarman, J.M. Marzluff and R.C. Fleischer. 2000. Cryptic genetic variation and paraphyly in ravens. **Proc. R. Soc. Lond**. 276: 2475-2482.

Patton, JC. and JC. Avise. 1986. Evolutionary genetics of bird IV Rates of protein divergence in waterflow (Anatidae). **Genetica**. 68 : 129-143.

Peters, JL., KG. McCracken, YN. Zhuravlev, Y. lu, RE. Wilson, KP. Johnson and KE. Omland. 2005. Phylogenetics of wigeons and allies (Anatidae : Anus) : The importance of sampling multiple loci and multiple individuals. **Mol. Phylogenet. Evol**. 35 : 209-224.

Payne, B.R. and M.D. Sorenson. 2003. Museum Collection as Sources of Genetic Data. **Bonn. Zool. Beitr**. 51:97-104.

Ramirez, V., P. Savoie and R. Morais. 1993. Molecular Characterization and Evolution of a Duck Mitochondrial Genome. **J.Mol.Evol**. 37 : 296-310.

Rascati, 2003. **DNA Extraction Method. BTEC 4657-Molecular Diagnostics-PCR-Based Assays Maymester**. http://science.kennesaw.edu/%7Errascati/rascatiksu.

Rhymer, J.M. and D. Simberloff. 1996. Extinction by hybridization and introgression. **Annu.Rev. Ecol. Syst**. 27 : 83-109.

Rozas, J., J.C. Snchez-DelBarrio, X. Messeguer and R. Rozas. 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. **Bioinformatics**. 19: 2496-2497.

Shadel, G.S. and Clayton D.A. 1997. Mitochondrial DNA maintenance in vertebrates. **Annu Rev. Biochem**. 66: 409-435.

Sibley, C.G. and B.L. Monroe. 1990. **Distribution and Taxonomy of Birds of the World**.Yale University Press, New Haven and London. 1111 p.

Slavénaité, S., D. Butkauskas, A. Sruoga and E. Mozaliené. 2004. Comparative investigation of mallard duck (Anas platyrhynchos) genomic DNA using chicken and duck specific microsatellite primers. **VETERINARIJA IR ZOOTECHNIKA**. 26(48) : 89-92.

Sorenson, M.D. and RC. Fleischer. 1996. Multiple independent transpositions of mitochondrial DNA control region sequence to the nucleus. **Proc.Natl. Acad. Sci. USA**. 93 : 15239-15243.

Sorenson, M.D., J.C. Dimeheff, T. Yuri and DP. Mindell. 1999. Primers for a PCR-based approach to mitochondrial genome sequencing in bird and other vertebrates. **Mol. Phylogenet. Evol**. 12 : 105-114.

Taberlet, P. and B. Jean. 1991. A single plucked feather as a source of DNA for bird genetic studies. **Auk**.108:959-960.

Wilson, AC., SS. Calson and TJ. White. 1997. Bichemical evolution. **Annu.Rev.Biochem**. 46 : 573-639.

Wilson, L. 2005. **Birds of the Kaweah River Delta Region**. http://www.kaweahoaks.com/ birds.htm.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ผลการทดลอง

>นครปฐม เพศผู้ ตัวที่ 1 (ANM1)

GTTATTTGGTTATGCATATCGTGCATACATTTATATTCCCCATATATTAACCTATGGTCCCGGTAATAAACACTAT
TAACCAACTATCCTACATGCACGGACTAAACCCATCACATGTCAACGGACATACCCTACCTATCGGACTACCCTCC
CAACGGACCCAGAGTGAATGCTCTAATACCCAACACCTCAACACCACATAACATGCCCCCAACCAGAACAAGGCCC
CATAATGATGAATGCTTGACAGACATACCCTACCAACACTCCAAATTCCTCTCCACCCACCCATTACTCATGAAGC
TGCGTACCAGATGGATTTATTAATCGTACACCTCACGTGAAATCAGCAATCCTTGCACATAATGTCCGACGTGACT
AGCTTCAGGCCCATACGTTCCCCCTAAACCCCTCGCCCTCCTCACATTTTTGCGCCTCTGGTTCCTCGGTCAGGGC
CATCAATTGGGTTCACTCACCTCTCCTTGCCCTTCAAAGTGGCATCTGTGGAATACTTCCACCATCTCAATGCGTA
ATCGCGGCATCTTCCAGCTTTTTGGCGCCTCTGGTTCCTTTTATTTTTTCCGGGGTTACCTCACAGCTGGCCCTTC
CCAGTGACTTCGGGGGTCCCACAATCTAAGCCTGGACACACCTGCGTTATCGCGCTATCCTATATCTCAGGGATTA
CTCAATGAGACGGTTGGCGTATATGG

>นครปฐม เพศผู้ ตัวที่ 2 (BNM2)

GTTATTTGGTTATGCATATCGTGCATACATTTATATTCCCCATATATTAACCTATGGTCCCGGTAATAAACACTAT
TAACCAACTATCCTACATGCACGGACTAAACCCATCACATGTCAACGGACATACCCTACCTATCGGACTACCCTCC
CAACGGACCCAGAGTGAATGCTCTAATACCCAACACCTCAACACCACATAACATGCCCCCAACCAGAACAAGGCCC
CATAATGATGAATGCTTGACAGACATACCCTACCAACACTCCAAATTCCTCTCCACCCACCCATTACTCATGAAGC
TGCGTACCAGATGGATTTATTAATCGTACACCTCACGTGAAATCAGCAATCCTTGCACATAATGTCCGACGTGACT
AGCTTCAGGCCCATACGTTCCCCCTAAACCCCTCGCCCTCCTCACATTTTTGCGCCTCTGGTTCCTCGGTCAGGGC
CATCAATTGGGTTCACTCACCTCTCCTTGCCCTTCAAAGTGGCATCTGTGGAATACTTCCACCATCTCAATGCGTA
ATCGCGGCATCTTCCAGCTTTTTGGCGCCTCTGGTTCCTTTTATTTTTTCCGGGGTTACCTCACAGCTGGCCCTTC
CAGTGACTTCGGGGGTCCCACAATCTAAGCCTGGACACACCTGCGTTATCGCGCTATCCTATATCTCAAGGATTAC
TCAATGAGACGGTTGGCGTATATGG

>นครปฐม เพศเมีย ตัวที่ 1 (ANF1)

GTTATTTGGTTATGCATATCGTGCATACATTTATATTCCCCATATATTAACCTATGGTCCCGGTAATAAACACTAT
TAACCAACTATCCTACATGCACGGACTAAACCCATCACATGTCAACGGACATACCCTACCTATCGGACTACCCTCC
CAACGGACCCAGAGTGAATGCTCTAATACCCAACACCTCAACACCACATAACATGCCCCCAACCAGAACAAGGCCC
CATAATGATGAATGCTTGACAGACATACCCTACCAACACTCCAAATTCCTCTCCACCCACCCATTACTCATGAAGC
TGCGTACCAGATGGATTTATTAATCGTACACCTCACGTGAAATCAGCAATCCTTGCACATAATGTCCGACGTGACT
AGCTTCAGGCCCATACGTTCCCCCTAAACCCCTCGCCCTCCTCACATTTTTGCGCCTCTGGTTCCTCGGTCAGGGC
CATCAATTGGGTTCACTCACCTCTCCTTGCCCTTCAAAGTGGCATCTGTGGAATACTTCCACCATCTCAATGCGTA
ATCGCGGCATCTTCCAGCTTTTTGGCGCCTCTGGTTCCTTTTATTTTTTCCGGGGTTACCTCACAGCTGGCCCTTC
CCAGTGACTTCGGGGGTCCCACAATCTAAGCCTGGACACACCTGCGTTATCGCGCTATCCTATGTCTCAGGGATTA
CTCAATGAGACGGTTGGCGTATATGG

>นครปฐม เพศเมีย ตัวที่ 2 (BNF2)

GTTATTTGGTTATGCATATCGTGCATACATTTATATTCCCCATATATTAACCTATGGTCCCGGTAATAAACACTAT
TAACCAACTATCCTACATGCACGGACTAAACCCATCACATGTCAACGGACATACCCTACCTATCGGACTACCCTCC
CAACGGACCCAGAGTGAATGCTCTAATACCCAACACCTCAACACCACATAACATGCCCCCAACCAGAACAAGGCCC
CATAATGATGAATGCTTGACAGACATACCCTACCAACACTCCAAATTCCTCTCCACCCACCCATTACTCATGAAGC
TGCGTACCAGATGGATTTATTAATCGTACACCTCACGTGAAATCAGCAATCCTTGCACATAATGTCCGACGTGACT
AGCTTCAGGCCCATACGTTCCCCCTAAACCCCTCGCCCTCCTCACATTTTTGCGCCTCTGGTTCCTCGGTCAGGGC
CATCAATTGGGTTCACTCACCTCTCCTTGCCCTTCAAAGTGGCATCTGTGGAATACTTCCACCATCTCAATGCGTA
ATCGCGGCATCTTCCAGCTTTTTGGCGCCTCTGGTTCCTTTTATTTTTTCCGGGGTTACCTCACAGCTGGCCCTTC
CCAGTGACTTCGGGGGTCCCACAATCTAAGCCTGGACACACCTGCGTTATCGCGCTATCCTATATCTCAGGGATTA
CTCAATGAGACGGTTGGCGTATATGG

ภาพผนวกที่ ก1 ลำดับเบสของไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอบริเวณ control ของเป็ดพื้นเมืองไทยทั้งสองสายพันธุ์ (ยาว 710 bp) ตำแหน่งที่ขีดเส้นใต้คือไพรเมอร์ L78 และ H774

>นครปฐม เพศเมีย ตัวที่ 3 (CNF3)

```
GTTATTTGGTTATGCATATCGTGCATACATTTATATTCCCCATATATTAACCTATGGTCCCGGTAATAAACACTAT
TAACCAACTATCCTACATGCACGGACTAAACCCATCACATGTCAACGGACATACCCTACCTATCGGACTACCCTCC
CAACGGACCCAGAGTGAATGCTCTAATACCCAACACCTCAACACCACATAACATGCCCCCAACCAGAACAAGGCCC
CATAATGATGAATGCTTGACAGACATACCCTACCAACACTCCAAATTCCTCTCCACCCACCCATTACTCATGAAGC
TGCGTACCAGATGGATTTATTAATCGTACACCTCACGTGAAATCAGCAATCCTTGCACATAATGTCCGACGTGACT
AGCTTCAGGCCCATACGTTCCCCCTAAACCCCTCGCCCTCCTCACATTTTTGCGCCTCTGGTTCCTCGGTCAGGGC
CATCAATTGGGTTCACTCACCTCTCCTTGCCCTTCAAAGTGGCATCTGTGGAATACTTCCACCATCTCAATGCGTA
ATCGCGGCATCTTCCAGCTTTTTGGCGCCTCTGGTTCCTTTTATTTTTTCCGGGGTTACCTCACAGCTGGCCCTTC
CCAGTGACTTCGGGGGTCCCACAATCTAAGCCTGGACACACCTGCGTTATCGCGCTATCCTATATCTCAGGGATTA
CTCAATGAGACGGTTGGCGTATATGG
```

>ปากน้ำ เพศผู้ ตัวที่ 1 (APM1)

```
GTTATTTGGTTATGCATATCGTGCATACATTTATATTCCCCATATATTAACCTATGGTCCCGGTAATAAACACTAT
TAACCAACTATCCTACATGCACGGACTAAACCCATCACATGTCAACGGACATACCCTACCTATCGGACTACCCTCC
CAACGGACCCAGAGTGAATGCTCTAATACCCAACACCTCAACACCACATAACATGCCCCCAACCAGAACAAGGCCC
CATAATGATGAATGCTTGACAGACATACCCTACCAACACTCCAAATTCCTCTCCACCCACCCATTACTCATGAAGC
TGCGTACCAGATGGATTTATTAATCGTACACCTCACGTGAAATCAGCAATCCTTGCACATAATGTCCGACGTGACT
AGCTTCAGGCCCATACGTTCCCCCTAAACCCCTCGCCCTCCTCACATTTTTGCGCCTCTGGTTCCTCGGTCAGGGC
CATCAATTGGGTTCACTCACCTCTCCTTGCCCTTCAAAGTGGCATCTGTGGAATACTTCCACCATCTCAATGCGTA
ATCGCGGCATCTTCCAGCTTTTTGGCGCCTCTGGTTCCTTTTATTTTTTCCGGGGTTACCTCACAGCTGGCCCTTC
CCAGTGACTTCGGGGGTCCCACAATCTAAGCCTGGACACACCTGCGTTATCGCGCTATCCTATATCTCAGGGATTA
CTCAATGAGACGGTTGGCGTATATGG
```

>ปากน้ำ เพศผู้ ตัวที่ 2 (BPM2)

```
GTTATTTGGTTATGCATATCGTGCATACATTTATATTCCCCATATATTAACCTATGGTCCCGGTAATAAACACTAT
TAACCAACTATCCTACATGCACGGACTAAACCCATCACATGTCAACGGACATACCCTACCTATCGGACTACCCTCC
CAACGGACCCAGAGTGAATGCTCTAATGCCCAACACCTCAACACCACATAACATGCCCCCAACCAGAACAAGGCCC
CATAATGATGAATGCTTGACAGACATACCCTACCAACACTCCAAATTCCTCTCCACCCACCCATTACTCATGAAGC
TGCGTACCAGATGGATTTATTAATCGTACACCTCACGTGAAATCAGCAATCCTTGCACATAATGTCCGACGTGACT
AGCTTCAGGCCCATACGTTCCCCCTAAACCCCTCGCCCTCCTCACATTTTTGCGCCTCTGGTTCCTCGGTCAGGGC
CATCAATTGGGTTCACTCACCTCTCCTTGCCCTTCAAAGTGGCATCTGTGGAATACTTCCACCATCTCAATGCGTA
ATCGCGGCATCTTCCAGCTTTTTGGCGCCTCTGGTTCCTTTTATTTTTTCCGGGGTTACCTCACAGCTGGCCCTTC
CCAGTGACTTCGGGGGTCCCACAATCTAAGCCTGGACACACCTGCGTTATCGCGCTATCCTATATCTCAGGGATTA
CTCAATGAGACGGTTGGCGTATATGG
```

>ปากน้ำ เพศผู้ ตัวที่ 3 (CPM3)

```
GTTATTTGGTTATGCATATCGTGCATACATTTATATTCCCCATATATTAACCTATGGTCCCGGTAATAAACACTAT
TAACCAACTATCCTACATGCACGGACTAAACCCATCACATGTCAACGGACATACCCTACCTATCGGACTACCCTCC
CAACGGACCCAGAGTGAATGCTCTAATACCCAACACCTCAACACCACATAACATGCCCCCAACCAGAACAAGGCCC
CATAATGATGAATGCTTGACAGACATACCCTACCAACACTCCAAATTCCTCTCCACCCACCCATTACTCATGAAGC
TGCGTACCAGATGGATTTATTAATCGTACACCTCACGTGAAATCAGCAATCCTTGCACATAATGTCCGACGTGACT
AGCTCCAGGCCCATACGTTCCCCCTAAACCCCTCGCCCTCCTCACATTTTTGCGCCTCTGGTTCCTCGGTCAGGGC
CATCAATTGGGTTCACTCACCTCTCCTTGCCCTTCAAAGTGGCATCTGTGGAATACTTCCACCATCTCAATGCGTA
ATCGCGGCATCTTCCAGCTTTTTGGCGCCTCTGGTTCCTTTTATTTTTTCCGGGGTTACCTCACAGCTGGCCCTTC
CCAGTGACTTCGGGGGTCCCACAATCTAAGCCTGGACACACCTGCGTTATCGCGCTATCCTATATCTCAGGGATTA
CTCAATGAGACGGTTGGCGTATATGG
```

ภาพผนวกที่ ก1 (ต่อ)

>ปากน้ำ เพศเมีย ตัวที่ 1 (APF1)

GTTATTTGGTTATGCATATCGTGCATACATTTATATTCCCCATATATTAACCTATGGTCCCGGTAATAAACACTAT
TAACCAACTATCCTACATGCACGGACTAAACCCATCACATGTCAACGGACATACCCTACCTATCGGACTACCCTCC
CAACGGACCCAGAGTGAATGCTCTAATACCCAACACCTCAACACCACATAACATGCCCCCAACCAGAACAAGGCCC
CATAATGATGAATGCTTGACAGACATACCCTACCAACACTCCAAATTCCTCTCCACCCACCCATTACTCATGAAGC
TGCGTACCAGATGGATTTATTAATCGTACACCTCACGTGAAATCAGCAATCCTTGCACATAATGTCCGACGTGACT
AGCTTCAGGCCCATACGTTCCCCCTAAACCCCTCGCCCTCCTCACATTTTTGCGCCTCTGGTTCCTCGGTCAGGGC
CATCAATTGGGTTCACTCACCTCTCCTTGCCCTTCAAAGTGGCATCTGTGGAATACTTCCACCATCTCAATGCGTA
ATCGCGGCATCTTCCAGCTTTTTGGCGCCTCTGGTTCCTTTTATTTTTTCCGGGGTTACCTCACAGCTGGCCCTTC
CCAGTGACTTCGGGGGTCCCACAATCTAAGCCTGGACACACCTGCGTTATCGCGCTATCCTATATCTCAGGGATTA
CTCAATGAGACGGTTGGCGTATATGG

>ปากน้ำ เพศเมีย ตัวที่ 2 (BPF2)

GTTATTTGGTTATGCATATCGTGCATACATTTATATTCCCCATATATTAACCTATGGTCCCGGTAATAAACACTAT
TAACCAACTATCCTACATGCACGGACTAAACCCATCACATGTCAACGGACATACCCTACCTATCGGACTACCCTCC
CAACGGACCCAGAGTGAATGCTCTAATGCCCAACACCTCAACACCACATAACATGCCCCCAACCAGAACAAGGCCC
CATAATGATGAATGCTTGACAGACATACCCTACCAACACTCCAAATTCCTCTCCACCCACCCATTACTCATGAAGC
TGCGTACCAGATGGATTTATTAATCGTACACCTCACGTGAAATCAGCAATCCTTGCACATAATGTCCGACGTGACT
AGCTTCAGGCCCATACGTTCCCCCTAAACCCCTCGCCCTCCTCACATTTTTGCGCCTCTGGTTCCTCGGTCAGGGC
CATCAATTGGGTTCACTCACCTCTCCTTGCCCTTCAAAGTGGCATCTGTGGAATACTTCCACCATCTCAATGCGTA
ATCGCGGCATCTTCCAGCTTTTTGGCGCCTCTGGTTCCTTTTATTTTTTCCGGGGTTACCTCACAGCTGGCCCTTC
CCAGTGACTTCGGGGGTCCCACAATCTAAGCCTGGACACACCTGCGTTATCGCGCTATCCTATATCTCAGGGATTA
CTCAATGAGACGGTTGGCGTATATGG

ภาพผนวกที่ ก 1 (ต่อ)

```
CNF3        CATACATTTATATTCCCCATATATTAACCTATGGTCCCGGTAATAAACACTATTAACCAA 60
CPM3        CATACATTTATATTCCCCATATATTAACCTATGGTCCCGGTAATAAACACTATTAACCAA 60
BPM2        CATACATTTATATTCCCCATATATTAACCTATGGTCCCGGTAATAAACACTATTAACCAA 60
BPF2        CATACATTTATATTCCCCATATATTAACCTATGGTCCCGGTAATAAACACTATTAACCAA 60
APM1        CATACATTTATATTCCCCATATATTAACCTATGGTCCCGGTAATAAACACTATTAACCAA 60
APF1        CATACATTTATATTCCCCATATATTAACCTATGGTCCCGGTAATAAACACTATTAACCAA 60
ANM1        CATACATTTATATTCCCCATATATTAACCTATGGTCCCGGTAATAAACACTATTAACCAA 60
BNM2        CATACATTTATATTCCCCATATATTAACCTATGGTCCCGGTAATAAACACTATTAACCAA 60
ANF1        CATACATTTATATTCCCCATATATTAACCTATGGTCCCGGTAATAAACACTATTAACCAA 60
BNF2        CATACATTTATATTCCCCATATATTAACCTATGGTCCCGGTAATAAACACTATTAACCAA 60
            ************************************************************

CNF3        CTATCCTACATGCACGGACTAAACCCATCACATGTCAACGGACATACCCTACCTATCGGA 120
CPM3        CTATCCTACATGCACGGACTAAACCCATCACATGTCAACGGACATACCCTACCTATCGGA 120
BPM2        CTATCCTACATGCACGGACTAAACCCATCACATGTCAACGGACATACCCTACCTATCGGA 120
BPF2        CTATCCTACATGCACGGACTAAACCCATCACATGTCAACGGACATACCCTACCTATCGGA 120
APM1        CTATCCTACATGCACGGACTAAACCCATCACATGTCAACGGACATACCCTACCTATCGGA 120
APF1        CTATCCTACATGCACGGACTAAACCCATCACATGTCAACGGACATACCCTACCTATCGGA 120
ANM1        CTATCCTACATGCACGGACTAAACCCATCACATGTCAACGGACATACCCTACCTATCGGA 120
BNM2        CTATCCTACATGCACGGACTAAACCCATCACATGTCAACGGACATACCCTACCTATCGGA 120
ANF1        CTATCCTACATGCACGGACTAAACCCATCACATGTCAACGGACATACCCTACCTATCGGA 120
BNF2        CTATCCTACATGCACGGACTAAACCCATCACATGTCAACGGACATACCCTACCTATCGGA 120
            ************************************************************

CNF3        CTACCCTCCCAACGGACCCAGAGTGAATGCTCTAATACCCAACACCTCAACACCACATAA 180
CPM3        CTACCCTCCCAACGGACCCAGAGTGAATGCTCTAATACCCAACACCTCAACACCACATAA 180
BPM2        CTACCCTCCCAACGGACCCAGAGTGAATGCTCTAATGCCCAACACCTCAACACCACATAA 180
BPF2        CTACCCTCCCAACGGACCCAGAGTGAATGCTCTAATGCCCAACACCTCAACACCACATAA 180
APM1        CTACCCTCCCAACGGACCCAGAGTGAATGCTCTAATACCCAACACCTCAACACCACATAA 180
APF1        CTACCCTCCCAACGGACCCAGAGTGAATGCTCTAATACCCAACACCTCAACACCACATAA 180
ANM1        CTACCCTCCCAACGGACCCAGAGTGAATGCTCTAATACCCAACACCTCAACACCACATAA 180
BNM2        CTACCCTCCCAACGGACCCAGAGTGAATGCTCTAATACCCAACACCTCAACACCACATAA 180
ANF1        CTACCCTCCCAACGGACCCAGAGTGAATGCTCTAATACCCAACACCTCAACACCACATAA 180
BNF2        CTACCCTCCCAACGGACCCAGAGTGAATGCTCTAATACCCAACACCTCAACACCACATAA 180
            ************************************ ***********************

CNF3        CATGCCCCCAACCAGAACAAGGCCCCATAATGATGAATGCTTGACAGACATACCCTACCA 240
CPM3        CATGCCCCCAACCAGAACAAGGCCCCATAATGATGAATGCTTGACAGACATACCCTACCA 240
BPM2        CATGCCCCCAACCAGAACAAGGCCCCATAATGATGAATGCTTGACAGACATACCCTACCA 240
BPF2        CATGCCCCCAACCAGAACAAGGCCCCATAATGATGAATGCTTGACAGACATACCCTACCA 240
APM1        CATGCCCCCAACCAGAACAAGGCCCCATAATGATGAATGCTTGACAGACATACCCTACCA 240
APF1        CATGCCCCCAACCAGAACAAGGCCCCATAATGATGAATGCTTGACAGACATACCCTACCA 240
ANM1        CATGCCCCCAACCAGAACAAGGCCCCATAATGATGAATGCTTGACAGACATACCCTACCA 240
BNM2        CATGCCCCCAACCAGAACAAGGCCCCATAATGATGAATGCTTGACAGACATACCCTACCA 240
ANF1        CATGCCCCCAACCAGAACAAGGCCCCATAATGATGAATGCTTGACAGACATACCCTACCA 240
BNF2        CATGCCCCCAACCAGAACAAGGCCCCATAATGATGAATGCTTGACAGACATACCCTACCA 240
            ************************************************************
```

ภาพผนวกที่ ก2 เปรียบเทียบลำดับเบสของไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอบริเวณ control ระหว่างเป็ดพื้นเมืองไทยทั้งสองสายพันธุ์ โดยสัญลักษณ์

ANM1 คือเป็ดนครปฐม เพศผู้ ตัวที่ 1	APM1 คือเป็ดปากน้ำ เพศผู้ ตัวที่ 1
BNM2 คือเป็ดนครปฐม เพศผู้ ตัวที่ 2	BPM2 คือเป็ดปากน้ำ เพศผู้ ตัวที่ 2
ANF1 คือเป็ดนครปฐม เพศเมีย ตัวที่ 1	CPM3 คือเป็ดปากน้ำ เพศผู้ ตัวที่ 3
BNF2 คือเป็ดนครปฐม เพศเมีย ตัวที่ 2	APF1 คือเป็ดปากน้ำ เพศเมีย ตัวที่ 1
CNF1 คือเป็ดนครปฐม เพศเมีย ตัวที่ 3	BPF2 คือเป็ดปากน้ำ เพศเมีย ตัวที่ 2

```
CNF3        ACACTCCAAATTCCTCTCCACCCACCCATTACTCATGAAGCTGCGTACCAGATGGATTTA 300
CPM3        ACACTCCAAATTCCTCTCCACCCACCCATTACTCATGAAGCTGCGTACCAGATGGATTTA 300
BPM2        ACACTCCAAATTCCTCTCCACCCACCCATTACTCATGAAGCTGCGTACCAGATGGATTTA 300
BPF2        ACACTCCAAATTCCTCTCCACCCACCCATTACTCATGAAGCTGCGTACCAGATGGATTTA 300
APM1        ACACTCCAAATTCCTCTCCACCCACCCATTACTCATGAAGCTGCGTACCAGATGGATTTA 300
APF1        ACACTCCAAATTCCTCTCCACCCACCCATTACTCATGAAGCTGCGTACCAGATGGATTTA 300
ANM1        ACACTCCAAATTCCTCTCCACCCACCCATTACTCATGAAGCTGCGTACCAGATGGATTTA 300
BNM2        ACACTCCAAATTCCTCTCCACCCACCCATTACTCATGAAGCTGCGTACCAGATGGATTTA 300
ANF1        ACACTCCAAATTCCTCTCCACCCACCCATTACTCATGAAGCTGCGTACCAGATGGATTTA 300
BNF2        ACACTCCAAATTCCTCTCCACCCACCCATTACTCATGAAGCTGCGTACCAGATGGATTTA 300
            ************************************************************

CNF3        TTAATCGTACACCTCACGTGAAATCAGCAATCCTTGCACATAATGTCCGACGTGACTAGC 360
CPM3        TTAATCGTACACCTCACGTGAAATCAGCAATCCTTGCACATAATGTCCGACGTGACTAGC 360
BPM2        TTAATCGTACACCTCACGTGAAATCAGCAATCCTTGCACATAATGTCCGACGTGACTAGC 360
BPF2        TTAATCGTACACCTCACGTGAAATCAGCAATCCTTGCACATAATGTCCGACGTGACTAGC 360
APM1        TTAATCGTACACCTCACGTGAAATCAGCAATCCTTGCACATAATGTCCGACGTGACTAGC 360
APF1        TTAATCGTACACCTCACGTGAAATCAGCAATCCTTGCACATAATGTCCGACGTGACTAGC 360
ANM1        TTAATCGTACACCTCACGTGAAATCAGCAATCCTTGCACATAATGTCCGACGTGACTAGC 360
BNM2        TTAATCGTACACCTCACGTGAAATCAGCAATCCTTGCACATAATGTCCGACGTGACTAGC 360
ANF1        TTAATCGTACACCTCACGTGAAATCAGCAATCCTTGCACATAATGTCCGACGTGACTAGC 360
BNF2        TTAATCGTACACCTCACGTGAAATCAGCAATCCTTGCACATAATGTCCGACGTGACTAGC 360
            ************************************************************

CNF3        TTCAGGCCCATACGTTCCCCCTAAACCCCTCGCCCTCCTCACATTTTTGCGCCTCTGGTT 420
CPM3        TCCAGGCCCATACGTTCCCCCTAAACCCCTCGCCCTCCTCACATTTTTGCGCCTCTGGTT 420
BPM2        TTCAGGCCCATACGTTCCCCCTAAACCCCTCGCCCTCCTCACATTTTTGCGCCTCTGGTT 420
BPF2        TTCAGGCCCATACGTTCCCCCTAAACCCCTCGCCCTCCTCACATTTTTGCGCCTCTGGTT 420
APM1        TTCAGGCCCATACGTTCCCCCTAAACCCCTCGCCCTCCTCACATTTTTGCGCCTCTGGTT 420
APF1        TTCAGGCCCATACGTTCCCCCTAAACCCCTCGCCCTCCTCACATTTTTGCGCCTCTGGTT 420
ANM1        TTCAGGCCCATACGTTCCCCCTAAACCCCTCGCCCTCCTCACATTTTTGCGCCTCTGGTT 420
BNM2        TTCAGGCCCATACGTTCCCCCTAAACCCCTCGCCCTCCTCACATTTTTGCGCCTCTGGTT 420
ANF1        TTCAGGCCCATACGTTCCCCCTAAACCCCTCGCCCTCCTCACATTTTTGCGCCTCTGGTT 420
BNF2        TTCAGGCCCATACGTTCCCCCTAAACCCCTCGCCCTCCTCACATTTTTGCGCCTCTGGTT 420
            * **********************************************************

CNF3        CCTCGGTCAGGGCCATCAATTGGGTTCACTCACCTCTCCTTGCCCTTCAAAGTGGCATCT 480
CPM3        CCTCGGTCAGGGCCATCAATTGGGTTCACTCACCTCTCCTTGCCCTTCAAAGTGGCATCT 480
BPM2        CCTCGGTCAGGGCCATCAATTGGGTTCACTCACCTCTCCTTGCCCTTCAAAGTGGCATCT 480
BPF2        CCTCGGTCAGGGCCATCAATTGGGTTCACTCACCTCTCCTTGCCCTTCAAAGTGGCATCT 480
APM1        CCTCGGTCAGGGCCATCAATTGGGTTCACTCACCTCTCCTTGCCCTTCAAAGTGGCATCT 480
APF1        CCTCGGTCAGGGCCATCAATTGGGTTCACTCACCTCTCCTTGCCCTTCAAAGTGGCATCT 480
ANM1        CCTCGGTCAGGGCCATCAATTGGGTTCACTCACCTCTCCTTGCCCTTCAAAGTGGCATCT 480
BNM2        CCTCGGTCAGGGCCATCAATTGGGTTCACTCACCTCTCCTTGCCCTTCAAAGTGGCATCT 480
ANF1        CCTCGGTCAGGGCCATCAATTGGGTTCACTCACCTCTCCTTGCCCTTCAAAGTGGCATCT 480
BNF2        CCTCGGTCAGGGCCATCAATTGGGTTCACTCACCTCTCCTTGCCCTTCAAAGTGGCATCT 480
            ************************************************************

CNF3        GTGGAATACTTCCACCATCTCAATGCGTAATCGCGGCATCTTCCAGCTTTTTGGCGCCTC 540
CPM3        GTGGAATACTTCCACCATCTCAATGCGTAATCGCGGCATCTTCCAGCTTTTTGGCGCCTC 540
BPM2        GTGGAATACTTCCACCATCTCAATGCGTAATCGCGGCATCTTCCAGCTTTTTGGCGCCTC 540
BPF2        GTGGAATACTTCCACCATCTCAATGCGTAATCGCGGCATCTTCCAGCTTTTTGGCGCCTC 540
APM1        GTGGAATACTTCCACCATCTCAATGCGTAATCGCGGCATCTTCCAGCTTTTTGGCGCCTC 540
APF1        GTGGAATACTTCCACCATCTCAATGCGTAATCGCGGCATCTTCCAGCTTTTTGGCGCCTC 540
ANM1        GTGGAATACTTCCACCATCTCAATGCGTAATCGCGGCATCTTCCAGCTTTTTGGCGCCTC 540
BNM2        GTGGAATACTTCCACCATCTCAATGCGTAATCGCGGCATCTTCCAGCTTTTTGGCGCCTC 540
ANF1        GTGGAATACTTCCACCATCTCAATGCGTAATCGCGGCATCTTCCAGCTTTTTGGCGCCTC 540
BNF2        GTGGAATACTTCCACCATCTCAATGCGTAATCGCGGCATCTTCCAGCTTTTTGGCGCCTC 540
            ************************************************************
```

ภาพผนวกที่ ก 2 (ต่อ)

```
CNF3          TGGTTCCTTTTATTTTTTCCGGGGTTACCTCACAGCTGGCCCTTCCCAGTGACTTCGGGG 600
CPM3          TGGTTCCTTTTATTTTTTCCGGGGTTACCTCACAGCTGGCCCTTCCCAGTGACTTCGGGG 600
BPM2          TGGTTCCTTTTATTTTTTCCGGGGTTACCTCACAGCTGGCCCTTCCCAGTGACTTCGGGG 600
BPF2          TGGTTCCTTTTATTTTTTCCGGGGTTACCTCACAGCTGGCCCTTCCCAGTGACTTCGGGG 600
APM1          TGGTTCCTTTTATTTTTTCCGGGGTTACCTCACAGCTGGCCCTTCCCAGTGACTTCGGGG 600
APF1          TGGTTCCTTTTATTTTTTCCGGGGTTACCTCACAGCTGGCCCTTCCCAGTGACTTCGGGG 600
ANM1          TGGTTCCTTTTATTTTTTCCGGGGTTACCTCACAGCTGGCCCTTCCCAGTGACTTCGGGG 600
BNM2          TGGTTCCTTTTATTTTTTCCGGGGTTACCTCACAGCTGGCCCTTCCCAGTGACTTCGGGG 600
ANF1          TGGTTCCTTTTATTTTTTCCGGGGTTACCTCACAGCTGGCCCTTCCCAGTGACTTCGGGG 600
BNF2          TGGTTCCTTTTATTTTTTCCGGGGTTACCTCACAGCTGGCCCTTCCCAGTGACTTCGGGG 600
              ************************************************************

CNF3          GTCCCACAATCTAAGCCTGGACACACCTGCGTTATCGCGCTATCCTATATCTCAGGGATT 660
CPM3          GTCCCACAATCTAAGCCTGGACACACCTGCGTTATCGCGCTATCCTATATCTCAGGGATT 660
BPM2          GTCCCACAATCTAAGCCTGGACACACCTGCGTTATCGCGCTATCCTATATCTCAGGGATT 660
BPF2          GTCCCACAATCTAAGCCTGGACACACCTGCGTTATCGCGCTATCCTATATCTCAGGGATT 660
APM1          GTCCCACAATCTAAGCCTGGACACACCTGCGTTATCGCGCTATCCTATATCTCAGGGATT 660
APF1          GTCCCACAATCTAAGCCTGGACACACCTGCGTTATCGCGCTATCCTATATCTCAGGGATT 660
ANM1          GTCCCACAATCTAAGCCTGGACACACCTGCGTTATCGCGCTATCCTATATCTCAGGGATT 660
BNM2          GTCCCACAATCTAAGCCTGGACACACCTGCGTTATCGCGCTATCCTATATCTCAAGGATT 660
ANF1          GTCCCACAATCTAAGCCTGGACACACCTGCGTTATCGCGCTATCCTATGTCTCAGGGATT 660
BNF2          GTCCCACAATCTAAGCCTGGACACACCTGCGTTATCGCGCTATCCTATATCTCAGGGATT 660
              ************************************************ ***** *****

CNF3          ACTCAAT 667
CPM3          ACTCAAT 667
BPM2          ACTCAAT 667
BPF2          ACTCAAT 667
APM1          ACTCAAT 667
APF1          ACTCAAT 667
ANM1          ACTCAAT 667
BNM2          ACTCAAT 667
ANF1          ACTCAAT 667
BNF2          ACTCAAT 667
              *******
```

ภาพผนวกที่ ก 2 (ต่อ)

```
Parknum              ----------------------CATACATTTATATTCCCCATATATTAA--CCTATGGTC 36
Nakornpathom         ----------------------CATACATTTATATTCCCCATATATTAA--CCTATGGTC 36
A.platyrhynchos      ----------------------CATACATTTATATTCCCCATATATTAA--CCTATGGTC 36
A.zonorhyncha        ----------------------CATACATTTATATTCCCCATATATTAA--CCTATGGTC 36
A.fulvigula          ----------------------CATACATTTATATTCCCCATATATTAA--CCTATGGTC 36
A.rubripes           ----------------------CATACATTTATATTCCCCATATATTAA--CCTATGGTC 36
A.acuta              TTATTTGGTTATGCATATCGTGCATACATTTATATTCCCCATATATTAA--CCTATGGTC 58
A.bahamensis         TTATTTGGTTATGCATATCGTGCATACATTTATATTCCCCATATATTAA--CCTATGGTC 58
A.crecca             TTATTTGGTTATGCATATCGTGCATACATTTATATTCCCCATATATTTA--CCTATGGTC 58
A.strepera           ----------------------CATACATTTATATTCCCCATATATTAA--CCTATGGTC 36
Anas.sibilatrix      TTATTTGGTTATGTACATCGTGCATACATTTATATTCCCCATATATTAA--CCTATGGTC 58
A.clypeata           TTATTTGGTTATGCATATCGTGCATACATTTATATTCCTCATATATTTA--CCTATGGTC 58
Cairina              ----------ATGCATATCGTGCATACATTTATATGCCCCATACAATAAGTCCTATGGTC 50
                                           ************* ** **** * * *  *********

Parknum              CCGGTAATAAACACTATTAACCAAC-TATCCTACATGCACGGACTAAACCCATCA-CATG 94
Nakornpathom         CCGGTAATAAACACTATTAACCAAC-TATCCTACATGCACGGACTAAACCCATCA-CATG 94
A.platyrhynchos      CCGGTAATAAACACTATTAACCAAC-TATCCTACATGCACGGACTAAACCCATCA-CATG 94
A.zonorhyncha        CCGGTAATAAACACTATTAACCAAC-TATCCTACATGCACGGACTAAACCCATCA-CATG 94
A.fulvigula          CCGGTAATAAACACTATTAACCAAC-TATCCTACATGCACGGACTAAGCCCATCA-CATG 94
A.rubripes           CCGGTAATAAACACTATTAACCAAC-TATCCTACATGCACGGACTAAACCCATCA-CATG 94
A.acuta              CCGGTAATAAGACTTATTAATCAAC-TATCCTACATGCACGGACTAAACCCATCA-TATG 116
A.bahamensis         CCGGTAATAAGACTTATTAACCAAC-TATCCTACATGCACGGACTAAACCCATCA-CATG 116
A.crecca             CCGGTAATGAACATCATTAGTCAAC-TACCCTACATGCACGGACTAAACCCATCA-CATG 116
A.strepera           CCGGTAATAAACACTATTAACCAAC-TACCCTACATGCACGGACTAAACCCATCA-CATG 94
Anas.sibilatrix      CCGGTAATAAACACTATTAACCAAC-TATCCTACATGCACGGACTAAGCCCATCA-TATG 116
A.clypeata           CCGGTAACAGACACTATTAGTCAAC-TACCCTGCACACACGGACTAAACCCATCA-CATG 116
Cairina              CCAGTAATACACATCACCAACCAACATAACCTGCACCCACGGACTAAACCCATCAACATG 110
                     ** ****        *  *  **** ** *** **  ********** *******  ***

Parknum              -TCAACGGACATACCCTACCTATCGGACTACCCTCCC-AACGGACCCAGAGTGAATGCTC 152
Nakornpathom         -TCAACGGACATACCCTACCTATCGGACTACCCTCCC-AACGGACCCAGAGTGAATGCTC 152
A.platyrhynchos      -TCAACGGACATACCCTACCTATCGGACTACCCTCCC-AACGGACCCAGAGTGAATGCTC 152
A.zonorhyncha        -TCAACGGACATACCCTACCTATCGGACTACCCTCCC-AACGGACCCAGAATGAATGCTC 152
A.fulvigula          -TTAACGGACATACCCTACCTGTCGGACTACCCTCCC-AACGGACCCAGAGTGAATGCTC 152
A.rubripes           -TTAACGGACATACCCTACCTGCCGGACTACCCTCCC-AACGGACCCAGAGTGAATGCTC 152
A.acuta              -TTAACGGACATACCCTACTCAACGGACTACCCTCCCCAACGGACCCAGGATGAATGCCC 175
A.bahamensis         -TTAACGGACATACCCTGCTTAACGGACTACCCTCCCCAACGGACCCAGGATGAATGCTC 175
A.crecca             -CTAACGGACATGCCCTACTCAACACACTACTCTCCC-AACGAACATAGGATGAATGCCT 174
A.strepera           -TAAACGGTCATACCTCGCTCAACGGACTCCCCTCCC-AACCAACCTAGGGTGAATGCTC 152
Anas.sibilatrix      -TAAACGGACATACCT-ACTCACCGGACTACCCTCCC-AACGGACCCAGGATGAATGCTC 173
A.clypeata           -TAAGCGGACATACCTAACTTGCTACACCATCCTCCC-AACGAACCCTGGATGAATGCTC 174
Cairina              GCAAACGGACATAACTC-CCAACCAGACTAACCTCCCAAACC-ACTCAAGGTGAACGCTC 168
                        * *** ***  *   *       **    ***** ***  **      **** **

Parknum              TAATACCCAACACCTCA-ACACCACATA-ACATGCCC-CCAACCAGAACAAGGCCCCATA 209
Nakornpathom         TAATACCCAACACCTCA-ACACCACATA-ACATGCCC-CCAACCAGAACAAGGCCCCATA 209
A.platyrhynchos      TAATACCCAACACCTCA-ACACCACATA-ACATGCCC-CCAACCAGAACAAGGCCCCATA 209
A.zonorhyncha        TAATACCCAACACCTCA-ACACCACATA-ACATGCCC-CCAACCAGAACAAGGCCCCATA 209
A.fulvigula          TAATACTCGACACCCCA-ACACCACATA-ACATGTCC-TCAACCAGAACAAGGCCCCATA 209
A.rubripes           TAATACTCGACATCCCA-ACACCACATA-ACATGTCC-TCAACCAGAACAAGGCCCCATA 209
A.acuta              CAACACCCAACATCC-A-ACACCACATCCACACTCTC-TCGACCAGAACAAGGCCCCATA 232
A.bahamensis         TAACACCCGACACTC-A-ATACCACAATCACACCCTC-CTGACCAGAACAAGGCCCCATA 232
A.crecca             TAACACTAACAACTCTA-GCACCACATACAATCTCCCTCCGACCAGAACAAGGCCCCATG 233
A.strepera           TAAGACTCAACTTCCTA-GCACCACATA-AC-TGCTCTCCGGCCAAAACAAGGCCCCATA 209
Anas.sibilatrix      TAAGACCTAACTCTCCG-ACACCACATA-ACCTGCTCTCCGACCAGAACAAGGCCCCATA 231
A.clypeata           TAAAGACCAACCTCCAACACACACCACGGAC-TGCTC-ACAACCAGAACAAGGCCCCATA 232
Cairina              CCAGACAGCAACCTCCA---ACCAACAGAGCACAGCTCCAGACCAAAACAAGGCCCACGC 225
                       *                 **                    *** **********
```

ภาพผนวกที่ ก3 เปรียบเทียบลำดับเบสของไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอบริเวณ control ของเป็ดพื้นเมืองไทยทั้งสองสายพันธุ์ กับเป็ดสายพันธุ์อื่นในฐานข้อมูล NCBI ด้วยโปรแกรม Clustal_W

```
Parknum                  ATGATGAATGCTTGACAGACATACCCT-ACCAACACTCCAAATTCCTCTCCACCCACCCA 268
Nakornpathom             ATGATGAATGCTTGACAGACATACCCT-ACCAACACTCCAAATTCCTCTCCACCCACCCA 268
A.platyrhynchos          ATGATGAATGCTTGACAGACATACCCT-ACCAACACTCCAAATTCCTCTCCACCCACCCA 268
A.zonorhyncha            ATGATGAATGCTTGACAGACATACCCT-ACCAACACTCCAAATTCCTCTCCACCCACCCA 268
A.fulvigula              A-GGTGAATGCTTGATAGACATACCCC-ACCAACACTCCAGATTCCCCTCCACCTACCCA 267
A.rubripes               A-GGTGAATGCTTGATAGACATACCCC-ACCAACACTCCAGATTCCCTTCCACCTACCCA 267
A.acuta                  AGA-TGAATGCTTGACAGACATACCTC-GCCAATA-CCTAGGCTCCTC--------CCCA 281
A.bahamensis             GGA-TGAATGCTCGATAGACATACCCC-GTTAATA-CCTAGGCTCCTC--------CCCA 281
A.crecca                 GAAGTGAATGCTTGACAGACATACCCC-GCCAATA-TCCAGGCTCCTC--------CCCA 283
A.strepera               AGA-TGAATGCTTAGCGGACATACCTT-ACTAATC-TCTAGGCTCCTC--------CCCA 258
Anas.sibilatrix          GAG-TGAATGCTTGACGGACATACCTT-ACCAATA-TCTAGGCTCCTC--------CCCA 280
A.clypeata               CAGATGAATGCTTGACAGACATACCCCTACCAACA--CTAGATCCCCA---------CCA 281
Cairina                  AGGATGAATGCTCGATAGACATACCTA-ACAACCACCTTATCCTACAC----------CA 274
                             ********     ********      *       *     *            **

Parknum                  TTACTCATGAAGCTGCGTACCAGATGGATTTATTAATCGTACACCTCACGTGAAATCAGC 328
Nakornpathom             TTACTCATGAAGCTGCGTACCAGATGGATTTATTAATCGTACACCTCACGTGAAATCAGC 328
A.platyrhynchos          TTACTCATGAAGCTGCGTACCAGATGGATTTATTAATCGTACACCTCACGTGAAATCAGC 328
A.zonorhyncha            TTACTCATGAAGCTGCGTACCAGATGGATTTATTAATCGTACACCTCACGTGAAATCAGC 328
A.fulvigula              TTACTCATGAAGCTGCGTACCAGATGGATTTATTAATCGTACACCTCACGTGAAATCAGC 327
A.rubripes               TTACTCATGAAGCTGCGTACCAGATGGATTTATTAATCGTACACCTCACGTGAAATCAGC 327
A.acuta                  TTACTCATGAAGCTACGTATCAGATGGATTTATTAGTCGTACACCTCACGTGAAATCAGC 341
A.bahamensis             TTACTCATGAAGCTACGTACCAGATGGATTTATTAGTCGTACACCTCACGTGAAATCAGC 341
A.crecca                 TTACTCATGAAGCTTCGTACCAGATGGATTTATTGATCGTACACCTCACGTGAAATCAGC 343
A.strepera               TTACTCATGAAGCTGCGTACCAGATGGATTTATTAGTCGTACACCTCACGTGAAATCAGC 318
Anas.sibilatrix          TTACTCATGAAGCTACGTACCAGATGGATTTATTAGTCGTACACCTCACGTGAAATCAGC 340
A.clypeata               TTACTCATGAAGCTTCGTACCAGATGGATTTATTAATCGTACACCTCACGTGAAATCAGC 341
Cairina                  TAACTCATGAAGCTTCGTACCAGATGGATTTATTAACCGTACACCTCACGTGAAATCAGC 334
                         * ************ **** **************   ***********************

Parknum                  AATCCTTGCACATAATGTCCGACGTGACTAGCTTCAGGCCCATACGTT-CCCCCTAAACC 387
Nakornpathom             AATCCTTGCACATAATGTCCGACGTGACTAGCTTCAGGCCCATACGTT-CCCCCTAAACC 387
A.platyrhynchos          AATCCTTGCACATAATGTCCGACGTGACTAGCTTCAGGCCCATACGTT-CCCCCTAAACC 387
A.zonorhyncha            AATCCTTGCACATAATGTCCGACGTGACTAGCTTCAGGCCCATACGTT-CCCCCTAAACC 387
A.fulvigula              AATCCTTGCACATAATGTCCGACGTGACTAGCTTCAGGCCCATACGTT-CCCCCTAAACC 386
A.rubripes               AATCCTTGCACATAATGTCCGACGTGACTAGCTTCAGGCCCATACGTT-CCCCCTAAACC 386
A.acuta                  AATCCTTGCACATAATGTCCGATGTGACTAGCTTCAGGCCCATACGTT-CCCCCTAAACC 400
A.bahamensis             AATCCTTGCACATAATGTCCGATGTGACTAGCTTCAGGCCCATACGTT-CCCCCTAAACC 400
A.crecca                 AATCCTTGCATATAATGTCCGATGTGACTAGCTTCAGGCCCATACGTT-CCCCCTAAACC 402
A.strepera               AATCCTTGCACATAATGTCCGATGTGACTAGCTTCAGGCCCATACGTT-CCCCCTAAACC 377
Anas.sibilatrix          AATCCTTGCACATAATGTCCGATGTGACTAGCTTCAGGCCCATACGTT-CCCCCTAAACC 399
A.clypeata               AATCCTTGCACATAATGTCCGATGTGACTAGCTTCAGGCCCATACGTT-CCCCCTAAACC 400
Cairina                  AATCCTTGCATATAATGTCCGATGTGACTAGCTTCAGGCCCATACGTTTCCCCCTAAACC 394
                         ********** *********** ************************* ***********

Parknum                  CCTCGCCCTCCTCACATTTTTGCGCCTCTGGTTCCTCGGTCAGGGCCATCAATTGGGTTC 447
Nakornpathom             CCTCGCCCTCCTCACATTTTTGCGCCTCTGGTTCCTCGGTCAGGGCCATCAATTGGGTTC 447
A.platyrhynchos          CCTCGCCCTCCTCACATTTTTGCGCCTCTGGTTCCTCGGTCAGGGCCATCAATTGGGTTC 447
A.zonorhyncha            CCTCGCCCTCCTCACATTTTTGCGCCTCTGGTTCCTCGGTCAGGGCCATCAATTGGGTTC 447
A.fulvigula              CCTCGCCCTCCTCACATTTTTGCGCCTCTGGTTCCTCGGTCAGGGCCATCAATTGGGTTC 446
A.rubripes               CCTCGCCCTCCTCACATTTTTGCGCCTCTGGTTCCTCGGTCAGGGCCATCAATTGGGTTC 446
A.acuta                  CCTCGCCCTCCTCACATTTTTGCGCCTCTGGTTCCTCGGTCAGGGCCATCAATTGGGTTC 460
A.bahamensis             CCTCGCCCTCCTCACATTTTTGCGCCTCTGGTTCCTCGGTCAGGGCCATCAATTGGGTTC 460
A.crecca                 CCTCGCCCTCCTCACATTTTTGCGCCTCTGGTTCCTCGGTCAGGGCCATCAATTGGGTTC 462
A.strepera               CCTCGCCCTCCTCACATTTTTGCGCCTCTGGTTCCTCGGTCAGGGCCATCAATTGGGTTC 437
Anas.sibilatrix          CCTCGCCCTCCTCACATTTTTGCGCCTCTGGTTCCTCGGTCAGGGCCATCAATTGGGTTC 459
A.clypeata               CCTCGCCCTCCTCACATTTTTGCGCCTCTGGTTCCTCGGTCAGGGCCATCAATTGGGTTC 460
Cairina                  CCTCGCCCTCCTCACATTTTTGCGCCTCTGGTTCCTCGGTCAGGGCCATCAATTGGGTTC 454
                         ************************************************************
```

ภาพผนวกที่ ก 3 (ต่อ)

```
Parknum             ACTCACCTCT-CCTTGCCCTTCAAAGTGGCATCTGTGGAATACTTCCACCATCTCAATGC 506
Nakornpathom        ACTCACCTCT-CCTTGCCCTTCAAAGTGGCATCTGTGGAATACTTCCACCATCTCAATGC 506
A.platyrhynchos     ACTCACCTCT-CCTTGCCCTTCAAAGTGGCATCTGTGGAATACTTCCACCATCTCAATGC 506
A.zonorhyncha       ACTCACCTCT-CCTTGCCCTTCAAAGTGGCATCTGTGGAATACTTCCACCATCTCAATGC 506
A.fulvigula         ACTCACCTCT-CCTTGCCCTTCAAAGTGGCATCTGTGGAATACTTCCACCATCTCAATGC 505
A.rubripes          ACTCACCTCT-CCTTGCCCTTCAAAGTGGCATCTGTGGAATACTTCCACCATCTCAATGC 505
A.acuta             ACTCACCTCTTCCTTGCCTTTCAAAGTGGCATCTGTGGAAGACTTCCACCATCTCAATGC 520
A.bahamensis        ACTCACCTCTTCCTCGCCTTTCAAAGTGGCATCTGTGGAATACTTTCACCATCTCAATGC 520
A.crecca            ACTCACCTCTTCCTCGCCTTTCAAAGTGGCATCTGTGGAATACTTCCACCATCTCAATGC 522
A.strepera          ACTCACCTCTTCCTTGCCTTTCAAAGTGGCATCTGTGGAATACTTCCACCATCTCAATGC 497
Anas.sibilatrix     ACTCACCTCTTCCTTGCCTTTCAAAGTGGCATCTGTGGAAGACTTCCACCATCTCAATGC 519
A.clypeata          ACTCACCTCTTCCTCGCCTTTCAAAGTGGCATCTGTGGATGGCTTTCACTACCTCAATGC 520
Cairina             ACTCACCTCTTCCTCGCCTTTCAAAGTGGCATCTGTGGAATACTTCCACCATCTCAATGC 514
                    ********** *** *** ********************   *** *** * ********

Parknum             GTAATCGCGGCATCTTCCAGCTTTTTGGCGCCTCTGGTTCCTTTTATTTTTTCCGGGGTT 566
Nakornpathom        GTAATCGCGGCATCTTCCAGCTTTTTGGCGCCTCTGGTTCCTTTTATTTTTTCCGGGGTT 566
A.platyrhynchos     GTAATCGCGGCATCTTCCAGCTTTTTGGCGCCTCTGGTTCCTTTTATTTTTTCCGGGGTT 566
A.zonorhyncha       GTAATCGCGGCATCTTCCAGCTTTTTGGCGCCTCTGGTTCCTTTTATTTTTTCCGGGGTT 566
A.fulvigula         GTAATCGCGGCATCTTCCAGCTTTTTGGCGCCTCTGGTTCCTTTTATTTTTTCCGGGGTT 565
A.rubripes          GTAATCGCGGCATCTTCCAGCTTTTTGGCGCCTCTGGTTCCTTTTATTTTTTCCGGGGTT 565
A.acuta             GTAATCGCGGCATCCTCCAGCTTTTTGGCGCCTCTGGTTCCTTTTATTTTTTCCGGGGTT 580
A.bahamensis        GTAATCGCGGCATCCTCCAGCTTTTTGGCGCCTCTGGTTCCTTTTATTTTTTCCGGGGTT 580
A.crecca            GTAATCGCGGCATCTTCCAGCTTTTTGGCGCCTCTGGTTCCTTTTATTTTTTCCGGGGTT 582
A.strepera          GTAATCGCGGCATCCTCCAGCTTTTTGGCGCCTCTGGTTCCTTTTATTTTTTCCGGGGTT 557
Anas.sibilatrix     GTAATCGCGGCATCCTCCAGCTTTTTGGCGCCTCTGGTTCCTCTTATTTATTCCGGGGTT 579
A.clypeata          GTAATCGCGGCATCTTCCAGCTTTTTGGCGCCTTTGGTTCCTTTTATTTTTTCCGGGGTT 580
Cairina             GTTATCGCGGCATCTTCCAGCTTTTTGGCGCCTCTGGTTCCTTTTATTTTTTCCGGGGTT 574
                    ** *********** ****************** ******** ****** **********

Parknum             ACCTCACAGCTGGCCCTTCCCAGTGACTTCGGGGGTCCCACAATCTAAGCCTGGACACAC 626
Nakornpathom        ACCTCACAGCTGGCCCTTCCCAGTGACTTCGGGGGTCCCACAATCTAAGCCTGGACACAC 626
A.platyrhynchos     ACCTCACAGCTGGCCCTTCCCAGTGACTTCGGGGGTCCCACAATCTAAGCCTGGACACAC 626
A.zonorhyncha       ACCTCACAGCTGGCCCTTCCCAGTGACTTCGGGGGTCCCACAATCTAAGCCTGGACACAC 626
A.fulvigula         ACCTCACAGCTGGCCCTTCCCAGTGACTTCGGGGGTCCCACAATCTAAGCCTGGACACAC 625
A.rubripes          ACCTCACAGCTGGCCCTTCCCAGTGACTTCGGGGGTCCCACAATCTAAGCCTGGACACAC 625
A.acuta             ACCTCACAGCTGGCCCTTCCCAGTGACTTCGGGGGTCCCACAATCTAAGCCTGGACACAC 640
A.bahamensis        ACCTCACAGCTGGCCCTTCCCAGTGA-TTCGGGGGTCCCACAATCTAAGCCTGGACACAC 639
A.crecca            ACCTCACAGCTGGCCCTTCCCAGTGACTTCGGGGGTCCCACAATCTAAGCCTGGACACAC 642
A.strepera          ACCTCACAGCTGGCCCTTCCCAGTGACTTCGGGGGTCCCACAATCTAAGCCTGGACACAC 617
Anas.sibilatrix     ACCTCACAGCTGGCCCTTCCCAGTGACTTCGGGGGTCCCACAATCTAAGCCTGGACACAC 639
A.clypeata          ACCTCACAGCTGGCCCTTCCCAGTGACTTCGGGGGTCCCACAATCTAAGCCTGGACACAC 640
Cairina             ACCTCACAGCTGGCCCTTCCCAGTGACTTCGGGGGTACAACAATCTAAGCCTGGACACAC 634
                    ************************** ********* * *********************

Parknum             CTGCGTTATCGCGCTATCCTATATCTCAGGGATTACTCAAT------------------- 667
Nakornpathom        CTGCGTTATCGCGCTATCCTATATCTCAGGGATTACTCAAT------------------- 667
A.platyrhynchos     CTGCGTTATCGCGCTATCCTATATCTCAGGGATTACTCAAT------------------- 667
A.zonorhyncha       CTGCGTTATCGCGCTATCCTATATCTCAGGGATTACTCAAT------------------- 667
A.fulvigula         CTGCGTTATCGCGCTATCCTATATCTCAGG-ATTACTCAAT------------------- 665
A.rubripes          CTGCGTTATCGCGCTATCCTATATCTCAGG-ATTACTCAAT------------------- 665
A.acuta             CTGCGTTATCGTCCTATCCTATATCTCAAGGGTTACTCAAT------------------- 681
A.bahamensis        CTGCGTTATCGTCCTATCCTATATCTCAAGGGTTACTCAAT------------------- 680
A.crecca            CTGCGTTATCGTCCTATCCTATATCTCAGGAGTTACTCAAT------------------- 683
A.strepera          CTGCGTTATCGTCCTATCCTATATCTCAAGGGCTACTCGAT------------------- 658
Anas.sibilatrix     CTGCGTTATCGTCCTATCCTATATCTCAGGGGTTACTCAAT------------------- 680
A.clypeata          CTGCGTTATCGTCCTATCCTATATCTCAAGGGTTACTCAAT------------------- 681
Cairina             CTGCGTTATCGTCCTATCCTATATCTCAAGGGTTACTCAATGAGACGGTTGGCGTATATG 694
                    ***********  *************** *   ***** **
```

ภาพผนวกที่ ก 3 (ต่อ)

```
Parknum            ------------------------------------------------------------
Nakornpathom       ------------------------------------------------------------
A.platyrhynchos    ------------------------------------------------------------
A.zonorhyncha      ------------------------------------------------------------
A.fulvigula        ------------------------------------------------------------
A.rubripes         ------------------------------------------------------------
A.acuta            ------------------------------------------------------------
A.bahamensis       ------------------------------------------------------------
A.crecca           ------------------------------------------------------------
A.strepera         ------------------------------------------------------------
Anas.sibilatrix    ------------------------------------------------------------
A.clypeata         ------------------------------------------------------------
Cairina            GGGTATCATCTTGACACTGATGCACTTTGACCGCATTCAGTTAATGCTCTCCTCCGCAGC 754

Parknum            ------------------------------------------------------------
Nakornpathom       ------------------------------------------------------------
A.platyrhynchos    ------------------------------------------------------------
A.zonorhyncha      ------------------------------------------------------------
A.fulvigula        ------------------------------------------------------------
A.rubripes         ------------------------------------------------------------
A.acuta            ------------------------------------------------------------
A.bahamensis       ------------------------------------------------------------
A.crecca           ------------------------------------------------------------
A.strepera         ------------------------------------------------------------
Anas.sibilatrix    ------------------------------------------------------------
A.clypeata         ------------------------------------------------------------
Cairina            CCTTTATAGTAGGGTTATTTAGTGAATGCTCGATGGACATACCTTAAAAACAAAAACCGA 814

Parknum            ------------------------------------------------------------
Nakornpathom       ------------------------------------------------------------
A.platyrhynchos    ------------------------------------------------------------
A.zonorhyncha      ------------------------------------------------------------
A.fulvigula        ------------------------------------------------------------
A.rubripes         ------------------------------------------------------------
A.acuta            ------------------------------------------------------------
A.bahamensis       ------------------------------------------------------------
A.crecca           ------------------------------------------------------------
A.strepera         ------------------------------------------------------------
Anas.sibilatrix    ------------------------------------------------------------
A.clypeata         ------------------------------------------------------------
Cairina            CCCCCCCCCACCACAACCCCAACAACATATATATATACGTATACATAACGATATGAACCA 874

Parknum            ------------------------------------------------------------
Nakornpathom       ------------------------------------------------------------
A.platyrhynchos    ------------------------------------------------------------
A.zonorhyncha      ------------------------------------------------------------
A.fulvigula        ------------------------------------------------------------
A.rubripes         ------------------------------------------------------------
A.acuta            ------------------------------------------------------------
A.bahamensis       ------------------------------------------------------------
A.crecca           ------------------------------------------------------------
A.strepera         ------------------------------------------------------------
Anas.sibilatrix    ------------------------------------------------------------
A.clypeata         ------------------------------------------------------------
Cairina            AATTTATTAGAGAAACTCCAGTACTAAAAACAGCGTAATCTAACGACAATCATTACTTCA 934

Parknum            ---------------------------------------
Nakornpathom       ---------------------------------------
A.platyrhynchos    ---------------------------------------
A.zonorhyncha      ---------------------------------------
A.fulvigula        ---------------------------------------
A.rubripes         ---------------------------------------
A.acuta            ---------------------------------------
A.bahamensis       ---------------------------------------
A.crecca           ---------------------------------------
A.strepera         ---------------------------------------
Anas.sibilatrix    ---------------------------------------
A.clypeata         ---------------------------------------
Cairina            ACCCCCACGAACATTACCCAAATCACCAGCCACCCGCTC 973
```

ภาพผนวกที่ ก 3 (ต่อ)

ภาคผนวก ข

สารเคมี

1. 10% SDS (sodium dodecyl sulfate)

ละลาย SDS ปริมาตร 10 กรัม ในน้ำ 80 มิลลิลิตร
เมื่อละลายดีแล้วเติมน้ำให้ครบ 100 มิลลิลิตร

2. 3 M sodium acetate

ละลาย sodium acetate.3H_2O จำนวน 40.8 กรัม ในน้ำ 80 มิลลิลิตร
ปรับ pH ให้ได้ 5.2 ด้วยกรด HCl เติมน้ำให้ครบ 100 มิลลิลตร

3. 0.2 N NaOH (sodium hydroxide)

ละลาย sodium hydroxide anhydrous จำนวน 0.8 กรัม ในน้ำ 80 มิลลิลิตร
เมื่อละลายดีแล้วเติมน้ำให้ครบ 100 มิลลิลิตร

4. 0.04 M Tris-HCl

ละลาย Tris จำนวน 0.484 กรัม ในน้ำ 80 มิลิลิตร
ปรับ pH ให้ได้ 7.5 ด้วยกรด HCl เติมน้ำให้ครบ 100 มิลลิลิตร

5. 1X PBS (phosphate buffer solution)

ละลาย NaCl จำนวน 8 กรัม, KCl จำนวน 0.2 กรัม, Na_2HPO_4 จำนวน 1.44 กรัม และ
KH_2PO_4 จำนวน 0.24 กรัม ในน้ำ 800 มิลลิลิตร
ปรับ pH ให้ได้ 7.4 ด้วยกรด HCl เติมน้ำให้ครบ 1000 มิลลิลิตร

6. 10X TBE (Tris borate,EDTA) stock

ละลาย Tris Base จำนวน 108 กรัม, Boric Acid 55 กรัม และ 0.5M EDTA (pH 8)
20 มิลลิลิตร ในน้ำ 800 มิลลิลิตร
เมื่อละลายดีแล้วเติมน้ำให้ครบ 1000 มิลลิลิตร

Dilutions for work

	10X TBE (ml)	distilled water (ml)
5X	500	500
1X	100	900

7. 30% acrylamide : bis (19:1) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

ละลาย acrylamide จำนวน 14.6 กรัม และ N,N-bis-methylene-acrylamide จำนวน 0.4 กรัม
ในน้ำ 40 มิลลิลิตร
เมื่อละลายดีแล้วเติมน้ำให้ครบ 50 มิลลิลิตร

8. 10% APS (ammonium persulfate)

ละลาย ammonium persulfate จำนวน 0.1 กรัม ในน้ำ 1 มิลลิลิตร
การเตรียม 10% APS ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้

9. Ampicillin stock (50 mg/ml)

ละลาย ampicillin powder จำนวน 0.5 กรัม ในน้ำ 10 มิลลิลิตร
กรองด้วย filter steri (0.22 micron) เก็บที่ -20°C

10. LB (Luria-Bertani) media

-ชนิดกึ่งแข็ง

ละลาย tryptone จำนวน 5 กรัม, yeast extract จำนวน 2.5 กรัม และ NaCl จำนวน 5 กรัม ในน้ำ 450 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ 7.0 ด้วย NaOH จากนั้น เติมน้ำให้ครบ 500 มิลลิลิตร ใส่ผง agar จำนวน 7.5 กรัม autoclave ที่ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

ทิ้งให้เย็นลงมาที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เติม 50 mg/ml ampicillin ปริมาตร 500 µl

-ชนิดเหลว

ละลาย tryptone จำนวน 5 กรัม, yeast extract จำนวน 2.5 กรัม และ NaCl จำนวน 5 กรัม ในน้ำ 450 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ 7.0 ด้วย NaOH จากนั้น เติมน้ำให้ครบ 500 มิลลิลิตร autoclave ที่ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

ทิ้งให้เย็นลงมาที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เติม 50 mg/ml ampicillin ปริมาตร 500 µl

11. การเตรียมชุดสี STERLING™ Rapid Silver Stain

Fixative 1;	Methanol	50 ml
	H_2O	50 ml
	Acetic acid	1 ml
Fixative 2;	Methanol	50 ml
	H_2O	45 ml
	Stering reagent	5 ml
Staining solution A;	Reagent A	25 ml
	H_2O	25 ml
Staining solution B;	Reagent B	28 g
	H_2O	5 ml

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นางสาวปิยะนันท์ ลีแก้ว
วัน เดือน ปี ที่เกิด	วันที่ 25 ธันวาคม 2524
สถานที่เกิด	กรุงเทพฯ
ประวัติการศึกษา	จบการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาตอนปลาย จากโรงเรียนหนองบัวพิทยาคาร จังหวัดหนองบัวลำภู ปี พ.ศ. 2541 จบการศึกษาระดับปริญญาตรี จากคณะเกษตรศาสตร์บางพระ สาขาสัตวศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล (วิทยาเขตจันทบุรี) ปี พ.ศ. 2548
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนสนับสนุนงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา ประจำปีงบประมาณ 2548