

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรช้างเลี้ยงในภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย

Genetic diversity of the domestic elephant populations in North and Northeast of Thailand

เนตรนภา วิทิตธรรมคุณ (Netnapa Vitithumakhun)*

สุภาวดี มานะไตรนนท์ (Supawadee Manatrinon)**

วิโรจน์ สุภโชคสกุล (Wirot Supachocksakul)***

ภัทร เจริญพันธ์ (Patara Charoenphan)****

บทคัดย่อ

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของช้างเลี้ยงในกลุ่มประชากรช้างภาคเหนือ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย โดยใช้ microsatellite marker จำนวน 18 ตำแหน่ง ทำการเก็บตัวอย่างเลือดช้างภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยจำนวน 55 และ 31 ตัวอย่าง ผลการวิเคราะห์ได้ค่าเฉลี่ยอัลลีลต่อตำแหน่งของ number of alleles เท่ากับ 9.333 ± 5.412 (ค่าต่ำสุด = 3 อัลลีล และค่าสูงสุด = 23 อัลลีล) จากการวิเคราะห์ค่า maximum similarity โดยโปรแกรม FAMD และนำมาสร้าง UPGMA tree พบว่ากลุ่มประชากรช้างภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยเป็นกลุ่มประชากรเดียวกัน นอกจากนี้การวิเคราะห์ด้วยวิธี principal coordinate analysis พบว่าประชากรช้างภาคตะวันออกเฉียงเหนือ น่าจะเป็น subset ของประชากรช้างภาคเหนือ จากการวิเคราะห์หาค่า observed number of alleles, gene diversity, Shannon's Information index, number of polymorphic loci and % polymorphic loci ของประชากรช้างภาคเหนือมีค่าเท่ากับ 1.958 ± 0.200 , 0.222 ± 0.158 , 0.357 ± 0.210 , 161 และ 95.83 ตามลำดับ และของประชากรช้างภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีค่าเท่ากับ

* สาขาวิชาสัตวศาสตร์ คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยศิลปากร
Department of Animal Sciences, Faculty of Animal Sciences and Agricultural Technology, Silpakorn University, e-mail: yingveter@gmail.com

** ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยศิลปากร
Assistant Professor Dr., Department of Animal Sciences, Faculty of Animal Sciences and Agricultural Technology, Silpakorn University, e-mail: manatrinon_s@silpakorn.edu

*** สถาบันคชบาลแห่งชาติ ในพระอุปถัมภ์ฯ ลำปาง
Thai Elephant Conservation Center Lampang, e-mail: changyai2560@gmail.com

**** สถาบันวิจัยและบริการสุขภาพช้างแห่งชาติ สุรินทร์
National Institute of Elephant Research and Health Service Surin, e-mail: mumun_copaa@yahoo.com

1.875±0.332, 0.220±0.169, 0.348±0.229, 147 และ 87.50 ตามลำดับ ซึ่งจากผลการวิเคราะห์สามารถสรุปได้ว่าช้างภาคเหนือมีแนวโน้มมีความหลากหลายทางพันธุกรรมมากกว่าช้างภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

คำสำคัญ : ช้าง; ความหลากหลายทางพันธุกรรม; microsatellite marker; ประเทศไทย

Abstract

The objective of this research was to study the genetic diversity of domestic elephant populations in the North and Northeast of Thailand by using 18 microsatellite markers. Fifty-five and thirty-one of blood samples from the North and Northeast of Thailand were collected, respectively. The results showed that the average number of alleles per loci was 9.33 ± 5.412 (min = 3, max = 23). Maximum similarity and UPGMA tree were computed and constructed by FAMD program. The results showed the genetic of elephant from North and Northeast were the same population. Moreover, the principle coordinate analysis found that the genetic of elephants in the Northeast population was subset of the genetic of elephants in the North population. Observed number of alleles, gene diversity, Shannon's Information index, number of polymorphic loci and % polymorphic loci in the North population were 1.958 ± 0.200 , 0.222 ± 0.158 , 0.357 ± 0.210 , 161 and 95.83, respectively. While in the Northeast population were 1.875 ± 0.332 , 0.220 ± 0.169 , 0.348 ± 0.229 , 147 and 87.50, respectively. From the results, it can be concluded that northern elephants population tend to have higher genetic diversity than northeastern elephants population.

Keywords: Elephant; Genetic diversity; Microsatellite marker; Thailand

บทนำ

ช้างในประเทศไทยเป็นช้างเอเชีย (*Elephas maximus*) ชนิดพันธุ์ย่อย คือ ช้างอินเดีย (*Elephas maximus indicus*) ช้างมีความสัมพันธ์กับสังคมไทยมาอย่างยาวนาน ในอดีตช้างทำหน้าที่เป็นราชพาหนะสำหรับพระมหากษัตริย์ในการสู้ศึกสงครามและเป็นสัญลักษณ์ที่ปรากฏบน "ธงชาติไทย" หรือ "ธงช้างเผือก" ถือได้ว่าช้างเป็นสัญลักษณ์ของประเทศไทย และเป็นสัตว์คู่พระบารมีของพระมหากษัตริย์ ช้างมีความสำคัญต่อระบบนิเวศเพราะช้างป่าจะสามารถกินผลไม้ป่าได้หลากหลายชนิด เมื่อช้างถ่ายมูลออกมาเป็นเมล็ดพันธุ์ช่วยกระจายพันธุ์พืช ถือว่าเป็นการช่วยฟื้นฟูป่าได้เป็นอย่างดี มูลช้างยังเป็นอาหารให้แก่สัตว์อื่นได้ เช่น แมลง หากช้างสูญพันธุ์ไปจะทำให้พันธุ์พืชหลายชนิดหายไปจากระบบนิเวศ (มัทนา, 2556)

ช้างจัดเป็นสัตว์ที่อยู่ในกลุ่มใกล้สูญพันธุ์ โดยถูกจัดอยู่ใน Appendix I ของ CITES อันเนื่องมาจากพื้นที่อยู่อาศัยถูกบุกรุกทำลายมากขึ้น อีกทั้งช้างมีราคาแพงและเป็นที่ต้องการของมนุษย์ รวมทั้งการล่าเพื่อนำลูกช้างไปฝึกใช้งาน จำนวนประชากรช้างจึงลดลงอย่างรวดเร็ว ปัจจุบันในประเทศไทยมีช้างป่าอาศัยอยู่ตามธรรมชาติประมาณ 3,000 ตัว (ชมชื่น, 2547) ประชากรช้างเลี้ยงประสบปัญหาที่ไม่แตกต่างกับช้างป่านัก เนื่องจากพื้นที่ป่า

ที่เคยใช้เลี้ยงช้างมีน้อยลง แหล่งน้ำและอาหารมีการปนเปื้อนด้วยสารพิษมากขึ้น ช้างเลี้ยงของไทยมีอยู่ประมาณ 3,659 เชือก และมีการตายปีละประมาณ 150 เชือก (สามารถ และสาโรช, 2554) ในเรื่องของการผสมพันธุ์ ช้างป่ากระจายตัวอยู่ในพื้นที่ป่าที่ตัดขาดออกจากกันเป็นพื้นที่ป่าผืนเล็กๆ การแลกเปลี่ยนพันธุกรรมจึงเกิดขึ้นได้ยาก ในกรณีของช้างเลี้ยงนั้น ช้างเพศผู้ 1 เชือกมักถูกนำมาเป็นพ่อพันธุ์และใช้ผสมช้างเพศเมียหลายๆ เชือกเนื่องจากช้างพ่อพันธุ์ที่มีลักษณะสวยงามมีจำนวนลดลง และค่านิยมที่ต้องการให้ช้างเพศเมียได้ผสมกับช้างพ่อพันธุ์ที่มีประวัติเคยผสมแล้วได้ลูกมาก่อน จึงทำให้ทั้งช้างป่าและช้างเลี้ยงมีแนวโน้มเกิดการผสมเลือดชิดมากขึ้น ประชากรมีแนวโน้มค่อยๆ ลดลงเรื่อยๆ (สุนันทา, 2555) รัฐบาลได้ตระหนักถึงปัญหานี้และได้พยายามศึกษาวิจัย เพื่อหาแนวทางที่ยั่งยืนสำหรับการแก้ไขปัญหาช้างในประเทศที่กำลังเข้าสู่ภาวะวิกฤติในปัจจุบัน

การอนุรักษ์ช้างจึงเป็นเรื่องสำคัญ ซึ่งการอนุรักษ์นั้นไม่ใช่เพียงอนุรักษ์ให้ประชากรช้างมีจำนวนมากขึ้นเท่านั้น แต่จำเป็นต้องอนุรักษ์โดยคำนึงถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมในประชากรด้วยในปัจจุบันนิยมใช้เทคนิคทางด้านพันธุศาสตร์โมเลกุลเข้ามาศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในสิ่งมีชีวิตหลายชนิดทั้งในสัตว์พืช หรือไวรัส เป็นต้น (ชุมพล และจันทร์ดี, 2560; ธวัช และสุรศักดิ์, 2559; Zhang et al., 2015; Phuekvilai et al., 2009) microsatellite เป็นกลุ่ม DNA ที่มีเบสซ้ำ (repetitive DNA) เรียงต่อเนื่องกันอยู่ที่ตำแหน่งหนึ่งๆ ในจีโนม ความแตกต่างทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตที่เกิดขึ้นนั้นเป็นผลเนื่องมาจากจำนวนครั้งของเบสซ้ำของ microsatellite ในตำแหน่งหนึ่งๆ microsatellite นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายเนื่องจากสามารถใช้ระบุความหลากหลายภายในกลุ่มประชากร และสามารถบ่งชี้ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรที่อาศัยบริเวณใกล้เคียงกันได้ดีกว่าเครื่องหมายประเภทอื่นๆ นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติของการเป็นเครื่องหมายโมเลกุล DNA โดยมีความหลากหลายของลักษณะจีโนไทป์พอสมควรและพบกระจายอยู่ทั่วไปตลอดทั้งจีโนม สามารถตรวจสอบได้ง่ายโดยใช้เทคนิค PCR และต้องการ DNA ที่ใช้ในการตรวจสอบเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ผลปฏิบัติการที่ได้สามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์ได้เลย และสามารถทำซ้ำได้โดยผลไม่เปลี่ยนแปลง (รัตติกาล และคณะ, 2556) สำหรับข้อเสียของวิธีการนี้คือต้องใช้ primer ที่มีความจำเพาะทำให้ต้องทราบข้อมูลเกี่ยวกับลำดับเบสของ DNA เป้าหมาย (Ponsuksili et al., 1999) ในส่วนของการวิเคราะห์ข้อมูล microsatellite data นั้นสามารถทำได้ง่ายเนื่องจากการพัฒนาโปรแกรมสำเร็จรูปโดยโปรแกรมที่นิยมนำมาใช้คือ FAMD (fingerprint analysis with missing data) (Schluter and Harris, 2006) โดยโปรแกรมสามารถคำนวณหาค่า similarity และนำค่าดังกล่าวไปสร้างเป็น UPGMA tree (unweighted pair group method using arithmetic averages) หรือ principle coordinate analysis ซึ่งสะท้อนให้เห็นถึงความเหมือนหรือความต่างกันทางพันธุกรรมในสัตว์แต่ละตัวหรือแต่ละกลุ่มประชากรออกมาเป็นภาพ ทำให้ง่ายต่อการแปลความหมายของข้อมูล

เทคนิค microsatellite marker ได้ถูกนำมาใช้ในการศึกษาพันธุกรรมของประชากรช้างทั้งในเอเชียและแอฟริกา (Gugala et al., 2016; Suwattana et al., 2010; Kongrit et al., 2008; Archie et al., 2003; Houck et al., 2001; Whitehouse and Harley, 2001) โดย Whitehouse and Harley (2001) รายงานผลการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของช้างแอฟริกาในอุทยานแห่งชาติ Kruger และ Addo โดยใช้ microsatellite marker จำนวน 9 ตำแหน่ง ได้ค่า number of alleles ระหว่าง 1-6 ค่าเฉลี่ยจำนวนของอัลลีลของช้างในอุทยานแห่งชาติ Kruger และ Addo เท่ากับ 3.89 และ 1.89 ส่วนในช้างเอเชียได้มีการศึกษาโดย Ahlering et al. (2010) โดยทำการศึกษาประชากรช้างในประเทศลาวด้วยวิธี microsatellite marker จำนวน 10

ตำแหน่ง ได้ค่าเฉลี่ย number of alleles เท่ากับ 8 และค่า observed heterozygosity เท่ากับ 0.711 ต่อมาในปี ค.ศ.2015 ได้มีรายงานของ Zhang et al. (2015) ทำการศึกษาพันธุกรรมช้างในประเทศจีน โดยเก็บตัวอย่างจากมูลช้างจำนวน 654 ตัวอย่าง โดยใช้ microsatellite marker จำนวน 9 ตำแหน่ง วิเคราะห์หาความหลากหลายทางพันธุกรรมเปรียบเทียบกับช้างเอเชียได้ค่าเฉลี่ยของ observed number of alleles เท่ากับ 3.22, effective number of alleles เท่ากับ 1.66, Shannon Information Index เท่ากับ 0.60, Nei's Gene Diversity เท่ากับ 0.38, observed heterozygosity เท่ากับ 0.34, expected heterozygosity เท่ากับ 0.33 และ Polymorphic Information Content เท่ากับ 0.29

วัตถุประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้เป็นการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของช้างภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย โดยวิธี microsatellite marker เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการวางแผนการจัดการด้านการผสมพันธุ์และการอนุรักษ์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรช้าง

วิธีวิจัย

เก็บตัวอย่างเลือดช้างทั้งหมด 86 ตัวอย่าง โดยแบ่งช้างออกเป็นสองกลุ่มประชากร คือ ช้างที่อาศัยในภาคเหนือและมีพันธุ์ประวัติพ่อแม่เป็นช้างภาคเหนือ จำนวน 55 เชือก และช้างที่อาศัยในภาคตะวันออกเฉียงเหนือและมีพันธุ์ประวัติพ่อแม่เป็นช้างภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จำนวน 31 เชือก โดยในขั้นตอนการเก็บตัวอย่างจะหลีกเลี่ยงการเก็บตัวอย่างช้างที่มีความสัมพันธ์ทางสายเลือดกัน ทำการเก็บตัวอย่างเลือดช้างจากเส้นเลือดดำบริเวณใบหูปริมาตร 1 ml นำเลือดที่ได้ใส่ในหลอดเก็บเลือด (eppendorf) ขนาด 1.5 ml ที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (EDTA) 0.5 mM ปริมาตร 100 μ l และเก็บตัวอย่างเลือดช้างในถังบรรจุน้ำแข็ง หลังจากนั้นนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20°C ทำการเก็บตัวอย่างเลือดช้างในเดือนตุลาคม พ.ศ. 2557

การสกัด DNA โดยใช้ DNA Trap II เป็นผลิตภัณฑ์จากห้องปฏิบัติการ DNA Technology มหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์ แล้วนำ DNA ที่ได้มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 5 ng/ μ l และทำการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน DNA ทั้ง 86 ตัวอย่าง โดยใช้ primer จำนวน 18 ตำแหน่ง ดังตารางที่ 1 (Comstock et al., 2000; Archie et al., 2003; Suwattana et al., 2010) โดยใช้ DNA เริ่มต้น 10 ng, primer สายละ 0.5 pmol, 1X Taq buffer, 1.5 mM MgCl_2 , 0.2 mM dNTPs และเอนไซม์ Taq DNA polymerase 0.5 unit ในปริมาณทั้งหมด 10 μ l ผสมเข้าด้วยกันแล้วนำไปใส่เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystem)) โดยใช้ denaturation ที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 30 วินาที อุณหภูมิ annealing $52-61^{\circ}\text{C}$ (ตารางที่ 1) เป็นเวลา 30 วินาที extension ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 2 นาที ทำซ้ำจำนวน 35 รอบ หลังเสร็จปฏิกิริยา หยุดปฏิกิริยาด้วย 5 μ l loading buffer (10 mM EDTA (pH 8.0), 98% formamide, bromophenol blue และ xylene cyanol)

ตารางที่ 1 primer และอุณหภูมิ annealing ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR

No. ¹	ตำแหน่ง	Repeat motif	Primer sequence (5'- 3')	Annealing temperature (°C)
1	LaT06	(CCAT) ₁₃	F:AGCCAGGCACATTAAGTGT R:TCTCCTAGAAAAGTTACCACA	52
2	LaT08	(TAGA) ₁₆	F:ATGGACAGGCAGAAAGATTT R:TCCAATAACAGGATAGCATT	56
3	LaT13	(CATC) ₂₁	F:TGAGCTTCTGTAGGCTCTGA R:GCACTCGATAAACAGTGTGA	56
4	LaT16	(GGAT) ₃ GGCG (GGAT) ₁₈	F:TGGATGAATGGCAAATGG R:GCACAACACCTGCCTGTCA	52
5	LaT17	(GGAT) ₁₅ ... (GGAT) ₁₀	F:TTCCTGAGACCTATGCAGGG R:AAAATACCAGCCTGAGTGTGC	56
6	LaT18	(CCAT) ₂₂	F:AATCCAAGATTGGGCAACAC R:GCTCAGATAACAAAATGAATGG	56
7	LaT24	(GGAT) ₂₂	F:AAGTTGAGAGATCAGCAAAGCA R:GATGTTCACTCCTTCCTTAGCA	56
8	LaT25	(CCAT) ₁₅	F:TGAGACCGTCTTCATGAGATG R:ATGCAAGCTTACAATGGCAG	52
9	LaT26	(GGAT) ₃ G(GGAT) ₅ (GGGAT) ₇ GGAT (GGGAT) ₃ CGAT (GGGAT) ₄	F:AACCCAGGCTAAAGCACCAA R:TTTCCTGCTTGAGAGCCAAA	52
10	FH1	(CA) ₁₂	F:GATCAGACCATGGCATGA R:ACAGTCTCCCTTGGAAGAC	55
11	FH19	(CA) ₁₅	F:GAAGCTCATGGTCAAGGTCAC R:CTGCATACTCATCGAAGTCACC	60
12	FH48	(CA) ₂₂	F:GAGTCTCCATAATCAAGAGC R:CCTCCCTGGAATCTGTACAG	58
13	FH65	(CA) ₁₉	F:GGCTGTAGCATTTTACACTCCC R:CATGAATAAACCCAGCCTCTG	60
14	FH67	(CA) ₁₅	F:GCTTCTCTAGAAATGTGTATGC R:GGCGTATAGGATAGTTCCAC	58
15	FH71	(CA) ₁₄	F:GGGATTGGCTAAAATAG R:CTAAGCACATCAGGGAC	58
16	FH94	(CA) ₁₆	F:TTCCTCCACAGAGCAGC R:ATTGGTTAATTTGCCAGTCCC	61
17	FH102	(CT) ₁₁ (CA) ₁₄	F:CTTCATTACTGACCTAAACGAG R:GGACAGGGCTGGAGAAATATG	60
18	FH103	(CA) ₁₃	F:TGTGCTGCCACTTCCTACAC R:GATGTTGAGACAGTTCTGTAAG	58

¹ primer ลำดับที่ 1-9 อ้างอิงตาม Comstock et al., 2000 และลำดับที่ 10-18 อ้างอิงตาม Archie et al., 2003

ตรวจสอบผลของปฏิกิริยา PCR โดยนำ PCR product มาตรวจสอบโดยใช้ 4.5% denaturing polyacrylamide gel electrophoresis ใน 1X TBE buffer และย้อมแผ่นเจลด้วย silver nitrate เพื่อดูแถบ DNA ที่ปรากฏขึ้น และทำการแปลผลข้อมูลจากแถบ DNA โดยสัตว์แต่ละตัวสามารถปรากฏแถบ DNA ได้ตั้งแต่ 0 แถบขึ้นไป ในการแปลผลข้อมูลทำได้โดยการบันทึกการปรากฏหรือไม่ปรากฏแถบ DNA (ปรากฏ = 1, ไม่ปรากฏ = 0)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุศาสตร์โดยการวิเคราะห์หาค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากรและระหว่างประชากร โดยวิเคราะห์ค่า number of alleles, private alleles, observed number of alleles, effective number of alleles, gene diversity และ Shannon's Information index โดยใช้โปรแกรม PopGen วิเคราะห์หาค่า number of polymorphic loci และ % polymorphic loci วิเคราะห์หาค่า maximum similarity ระหว่างข้างทั้งหมด 86 ตัวแล้วนำไปสร้าง UPGMA tree และ principal coordinate analysis โดยใช้โปรแกรม FAMD

ผลการวิจัย

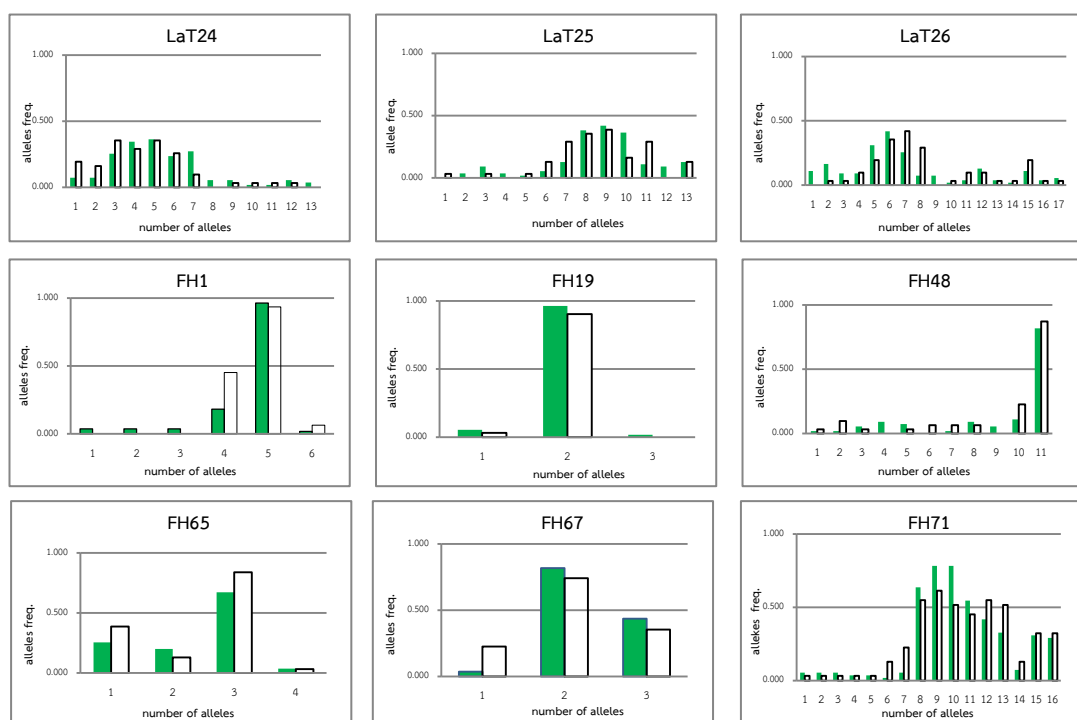
จากการวิเคราะห์พันธุกรรมข้างโดยใช้ microsatellite marker จำนวน 18 ตำแหน่ง มีค่า number of alleles ระหว่าง 3-23 อัลลีล ดังภาพที่ 1 สามารถอธิบายได้ว่า microsatellite marker ที่ใช้ในงานวิจัยครั้งนี้ทั้ง 18 ตำแหน่ง มี polymorphism สามารถนำมาใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมได้ จากการวิเคราะห์หาค่า number of alleles เฉลี่ยต่อตำแหน่งของข้างทั้งหมด (ตารางที่ 2) เท่ากับ 9.333 ± 5.412 ในขณะที่ค่า number of alleles เฉลี่ยต่อตำแหน่งของข้างภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ มีค่าเท่ากับ 8.944 ± 4.988 และ 8.167 ± 5.090 ซึ่งข้างภาคเหนือมีค่า number of alleles เฉลี่ยต่อตำแหน่งมากกว่าข้างภาคตะวันออกเฉียงเหนือ สามารถกล่าวได้ว่าข้างภาคเหนือมีแนวโน้มที่จะมีความหลากหลายทางพันธุกรรมมากกว่าข้างภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

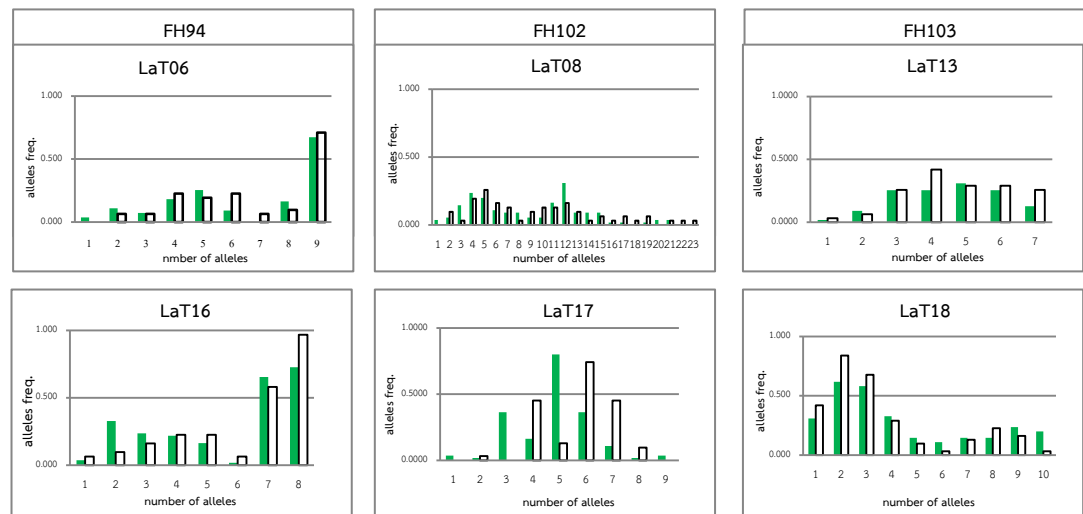
ตารางที่ 2 number of alleles และ private alleles ของ microsatellite marker ในกลุ่มประชากรข้างภาคเหนือ และข้างภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

ตำแหน่ง	number of alleles			private alleles	
	ข้างภาคเหนือ	ข้างภาคตะวันออกเฉียงเหนือ	ข้างทั้งหมด	ข้างภาคเหนือ	ข้างภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
LaT06	8	8	9	1	1
LaT08	20	21	23	2	3
LaT13	7	7	7	-	-
LaT16	8	8	8	-	-
LaT17	9	6	9	3	-
LaT18	10	10	10	-	-
LaT24	13	11	13	2	-

ตำแหน่ง	number of alleles			private alleles	
	ข้าง	ข้างภาค	ข้าง	ข้าง	ข้างภาค
	ภาคเหนือ	ตะวันออกเฉียงเหนือ	ทั้งหมด	ภาคเหนือ	ตะวันออกเฉียงเหนือ
LaT25	12	10	13	3	1
LaT26	17	15	17	2	-
FH1	6	3	6	3	-
FH19	3	2	3	1	-
FH48	10	9	11	2	1
FH65	4	4	4	-	-
FH67	3	3	3	-	-
FH71	16	16	16	-	-
FH94	6	5	6	1	-
FH102	5	5	6	1	-
FH103	4	4	4	-	-
รวม	161	147	168	21	6
Mean	8.944	8.167	9.333	1.909 ¹	1.500 ¹
SD	4.988	5.090	5.412	0.831	1.000

¹ ค่าเฉลี่ย private allele ต่อตำแหน่งที่พบ





ภาพที่ 1 แผนภูมิ alleles frequency ของ microsatellite marker จำนวน 18 ตำแหน่ง เปรียบเทียบระหว่างประชากรช้างภาคเหนือ (■) กับประชากรช้างภาคตะวันออกเฉียงเหนือโดย (□)

จากการวิเคราะห์หาจำนวน private alleles พบทั้งหมดจำนวน 11 ตำแหน่ง 27 อัลลีล (ตารางที่ 2) ช้างภาคเหนือพบ private alleles จำนวน 11 ตำแหน่ง 21 อัลลีล คิดเป็นค่าเฉลี่ยต่อตำแหน่งที่พบ เท่ากับ 1.909 ± 0.831 ส่วนช้างภาคตะวันออกเฉียงเหนือ พบ private alleles จำนวน 4 ตำแหน่ง 6 อัลลีล คิดเป็นค่าเฉลี่ยต่อตำแหน่งที่พบ เท่ากับ 1.500 ± 1.000 จากจำนวน private alleles สามารถอธิบายได้ว่า พันธุกรรมของช้างภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ มีความแตกต่างกัน นอกจากนี้ช้างภาคเหนือมี private alleles สูงกว่าช้างภาคตะวันออกเฉียงเหนือแสดงว่าช้างภาคเหนือมีแนวโน้มที่จะมีความหลากหลายทางพันธุกรรมมากกว่าช้างภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของ number of alleles กับงานวิจัยอื่นๆ (ตารางที่ 3) พบว่างานวิจัยในครั้งนี้ มีค่าเฉลี่ยของ number of alleles สูงกว่างานวิจัยของ Comstock et al., 2000 และ Archie et al., 2003 แต่มีค่าน้อยกว่า Suwattana et al., 2010 ที่ศึกษาในช้างเอเชียและช้างแอฟริกา

ตารางที่ 3 number of alleles เปรียบเทียบกับงานวิจัยอื่นๆ

ตำแหน่ง	number of alleles				
	ช้างทั้งหมดจาก	Suwattana et	Archie et al.,	Comstock et al., 2000	
	ช้างเอเชีย	ช้างเอเชีย	ช้างแอฟริกา	ช้างเอเชีย	ช้างแอฟริกา
LaT06	9	7	6	-	-
LaT08	23	38	10	-	-
LaT13	7	12	8	-	-
LaT16	8	15	8	-	-
LaT17	9	8	8	-	-
LaT18	10	19	8	-	-
LaT24	13	24	6	-	-
LaT25	13	21	6	-	-
LaT26	17	28	11	-	-
FH1	6	-	-	1	3
FH19	3	-	-	1	7
FH48	11	-	-	4	6
FH65	4	-	-	3	4
FH67	3	-	-	2	6
FH71	16	-	-	6	4
FH94	6	-	-	6	4
FH102	6	-	-	6	3
FH103	4	-	-	3	5
Mean	9.333	19.111	7.889	3.556	4.667

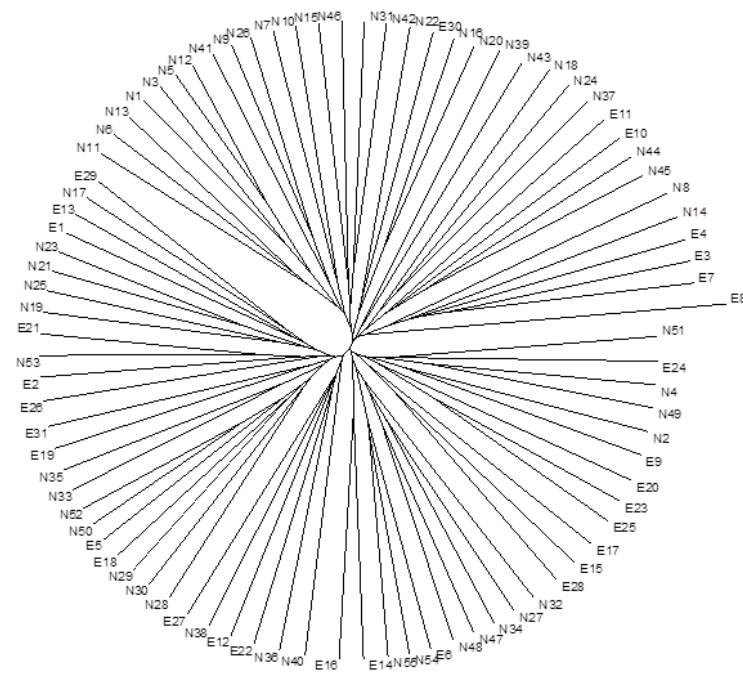
จากตารางที่ 4 แสดงค่าเฉลี่ย±SD ของค่า observed number of alleles, gene diversity, Shannon's Information index, number of polymorphic loci และ % polymorphic loci พบว่าในกลุ่มประชากรช้างภาคเหนือมีค่าเท่ากับ 1.958 ± 0.200 , 0.222 ± 0.158 , 0.357 ± 0.210 , 161 และ 95.83 ตามลำดับ ซึ่งมีแนวโน้มสูงกว่าช้างภาคตะวันออกเฉียงเหนือซึ่งมีค่าเท่ากับ 1.875 ± 0.332 , 0.220 ± 0.169 , 0.348 ± 0.229 , 147 และ 87.5 ตามลำดับ ยกเว้นค่า effective number of alleles ของช้างภาคเหนือ (1.346 ± 0.306) มีค่าต่ำกว่าช้างภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (1.350 ± 0.324) สามารถสรุปได้ว่าช้างภาคเหนือมีแนวโน้มมีความหลากหลายทางพันธุกรรมมากกว่าช้างภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

ตารางที่ 4 ค่าเฉลี่ย $\pm$ SD ของค่า observed number of alleles, effective number of alleles, gene diversity, Shannon's Information index, number of polymorphic loci และ % polymorphic loci ในประชากรข้างภาคเหนือ ข้างภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และข้างทั้งหมด

	ข้างภาคเหนือ	ข้างภาคตะวันออกเฉียงเหนือ	ข้างทั้งหมด
observed number of alleles	1.958 $\pm$ 0.200	1.875 $\pm$ 0.332	2.000 $\pm$ 0.000
effective number of alleles	1.346 $\pm$ 0.306	1.350 $\pm$ 0.324	1.356 $\pm$ 0.305
gene diversity	0.222 $\pm$ 0.158	0.220 $\pm$ 0.169	0.228 $\pm$ 0.158
Shannon's Information index	0.357 $\pm$ 0.210	0.348 $\pm$ 0.229	0.366 $\pm$ 0.206
number of polymorphic loci	161	147	168
% polymorphic loci	95.83	87.50	100

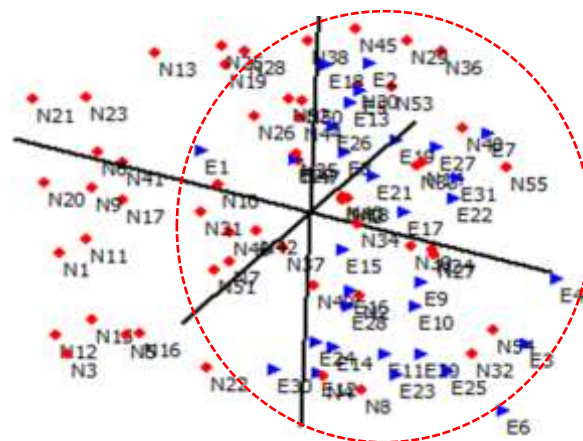
นอกจากนี้จากการวิเคราะห์หาค่า genetic identity และค่า genetic distance ระหว่างข้างภาคเหนือกับข้างภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีค่าเท่ากับ 0.9817 และ 0.0185 แสดงให้เห็นว่า ระหว่างข้างภาคเหนือและข้างภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีความเหมือนกันทางพันธุกรรมเท่ากับ 98.17% และมีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมเท่ากับ 1.85% ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับ Thitaram et al. (2010) ซึ่งศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้างในประเทศไทย โดยวิเคราะห์หาค่า genetic distances ระหว่างประชากรข้างภาคเหนือกับภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีค่าเท่ากับ 1.60%

จากการวิเคราะห์และสร้าง UPGMA tree (ภาพที่ 2) และ principle coordinate analysis (ภาพที่ 3) ของข้างทั้งหมด 86 เชือก พบว่าพันธุกรรมของประชากรข้างภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนืออยู่ในกลุ่มประชากรเดียวกัน นอกจากนี้จากภาพที่ 3 แสดง principle coordinate analysis ของข้างทั้งหมด พบว่ากลุ่มประชากรข้างภาคเหนือกระจายตัวอยู่ทั่วไป ในขณะที่ประชากรข้างภาคตะวันออกเฉียงเหนือจะเกาะกลุ่มกันทางด้านขวามือ แสดงให้เห็นว่าพันธุกรรมของประชากรข้างภาคตะวันออกเฉียงเหนือเป็น subset หรือเป็นส่วนหนึ่งของข้างภาคเหนือ หรือสามารถกล่าวอีกนัยหนึ่งว่าพันธุกรรมของประชากรข้างภาคเหนือมีความหลากหลายมากกว่าข้างภาคตะวันออกเฉียงเหนือ



ภาพที่ 2 UPGMA tree กำหนดให้ N = ช้างภาคเหนือ และ E = ช้างภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

จากภาพที่ 2 แสดงการกระจายตัวของช้างทั้งหมด 86 ตัวอย่าง พบว่าช้างภาคเหนือและช้างภาคตะวันออกเฉียงเหนืออยู่ปะปนกัน ไม่สามารถแยกจากกันเป็นกลุ่มได้ แสดงว่าประชากรช้างภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนืออยู่ในกลุ่มประชากรเดียวกัน



ภาพที่ 3 principal coordinate analysis กำหนดให้ N = ช้างภาคเหนือ และ E = ช้างภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

จากภาพที่ 3 แสดงการกระจายตัวของช้างทั้งหมด 86 ตัวอย่าง พบว่าช้างภาคเหนือและช้างภาคตะวันออกเฉียงเหนืออยู่ในกลุ่มเดียวกัน แต่ช้างภาคตะวันออกเฉียงเหนือจะเกาะกลุ่มกันทางด้านขวา (ในวงกลม) แสดงให้เห็นว่าประชากรช้างภาคตะวันออกเฉียงเหนือเป็น subset ของช้างภาคเหนือ

สรุปผล

จากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้ microsatellite marker จำนวน 18 ตำแหน่ง พบว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของช้างภาคเหนือสูงกว่าช้างภาคตะวันออกเฉียงเหนือ โดยข้อมูล UPGMA tree แสดงให้เห็นว่าช้างภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เป็นกลุ่มประชากรเดียวกัน ในขณะที่ข้อมูล principal coordinate analysis แสดงให้เห็นว่าพันธุกรรมของประชากรช้างภาคตะวันออกเฉียงเหนือเป็น subset ของประชากรช้างภาคเหนือ อย่างไรก็ตามจากข้อมูล private alleles พบว่า พันธุกรรมประชากรช้างภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีความแตกต่างกัน จากข้อมูลดังกล่าวสามารถนำมาใช้ในการวางแผนการจัดการด้านการผสมพันธุ์เพื่อการอนุรักษ์พันธุกรรมช้างอย่างยั่งยืนได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ผศ.ดร.วิรัช สีนทวิรรกุล ที่ช่วยประสานงานในการเก็บตัวอย่าง ขอขอบคุณปางช้างแม่สา บ้านช้างไทย ปางช้างห้วยปู้ใหม่ ปางช้างแม่วี และภัทรฟาร์ม จังหวัดเชียงใหม่ ที่ให้ความอนุเคราะห์เก็บตัวอย่างเลือดช้าง งานวิจัยชิ้นนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยศิลปากร ปีงบประมาณ 2557

เอกสารอ้างอิง

ภาษาไทย

- ชุมชล ไชโย และ จันตรี ระเบบเลิศ. (2560). ระบาดวิทยาทางอณูโมเลกุลของเชื้อไวรัสตั้งที่แยกจากชีรัมผู้ป่วยสงสัยโรคไข้เด็งกี ในประเทศไทย ปีค.ศ. 2015. *Veridian E-Journal, Science and Technology Silpakorn University*, 4(5), 1-12.
- ชมชื่น ศิริพันธ์แก้ว. (2547). การประเมินความแปรผันทางพันธุกรรมของตำแหน่งไมโครแซทเทลไลต์ในช้างไทย (*Elephas maximus*) (*Evaluation of microsatellite loci polymorphism in asia elephant, Elephas maximus*. (วิทยานิพนธ์ปริญญาโทบริหารธุรกิจ), มหาวิทยาลัยมหิดล.
- ธวัช ร่มทรัพย์ และ สุรศักดิ์ มั่งสิงห์. (2559). การจำแนกชนิดของพืชด้วยวิธีเพื่อนบ้านใกล้สุดรวมกับการเลือกตัวแทนที่เหมาะสมด้วยขั้นตอน วิธีเชิงพันธุกรรมโดยใช้คุณลักษณะรูปร่างและพื้นผิวของใบพืช. *Veridian E-Journal, Science and Technology Silpakorn University*, 3(4), 135-146.
- มัทนา ศรีกระจ่าง. (2556). 55 คำถามเกี่ยวกับช้างไทย (พิมพ์ครั้งที่ 3). กรุงเทพฯ: ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย.
- สามารถ ประสิทธิ์ผล และ สาโรช จันทรลาด. (2554). การศึกษาความเข้ากันได้ของเลือดช้างเลี้ยงในจังหวัดกาญจนบุรี. สืบค้นวันที่ 15 มิถุนายน 2559, จาก <http://dcontrol.dld.go.th/index.php/km/resease/650-2010-12-23-02-08-15.html>
- สุนันทา ทองไชย. (2555). ความหลากหลายทางพันธุกรรมของช้างป่า (*Elephas maximus Linnaeus*, 1758) ในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูวัว จังหวัดหนองคาย. (วิทยานิพนธ์ปริญญาโทบริหารธุรกิจ), มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
- รัตติกาล สุวรรณสิงห์, พงษ์ชาญ ณ ลำปาง และ อมรรัตน์ โมฬี. (2556). การเลือกเครื่องหมายโมเลกุลไมโครแซทเทลไลต์ เพื่อตรวจสอบสายเลือดของพันธุ์ไฮลอสไตนในโคนมลูกผสม. *แก่นเกษตร* 41(78), 69-78.

ภาษาต่างประเทศ

- Ahlering, M. A., Hedges, S., Johnson, A., Tyson, M., Schuttler, S. G., & Eggert, L. S. (2010). Genetic diversity, social structure, and conservation value of the elephants of the Nakai Plateau, Lao PDR, based on non-invasive sampling. *Conserv Genet*, 12(2), 413-422.
- Archie, E. A., Moss, C. J., & Alberts, S. C. (2003). Characterization of tetranucleotide microsatellite loci in the African Savannah Elephant (*Loxodonta africana africana*). *Molecular Ecology Notes*, 3, 244-246
- Comstock, K. E., Wasser, S. K., & Ostrander, E. A. (2000). Polymorphic microsatellite DNA loci identified in the African elephant (*Loxodonta africana*). *Molecular Ecology*, 9(7), 1004-1006.

- Gugala, N. A., Ishida, Y., Georgiadis, N. J., & Roca, A. L. (2016). Development and characterization of microsatellite markers in the African forest elephant (*Loxodonta cyclotis*) *Journal BMC Research Notes*, 9(1), 364.
- Houck, M. L., Kumamoto, A. T., Gallagher, J. D. S., & Benirschke, K. (2001). Comparative cytogenetics of the African elephant (*Loxodonta africana*) and Asiatic elephant (*Elephas maximus*). *Cytogenetics and Cell Genetics*, 93, 249-252.
- Kongrit, C., Siripunkaw, C., Brockelman, W. Y., Akkarapatumwong, V., Wright, T. F., & Eggert, I. S. (2008). Isolation and characterization of dinucleotide microsatellite loci in the Asian elephant (*Elephas maximus*). *Molecular Ecology*, 8(1), 175-177.
- Phuekvilai, P., Pongtongkam, P., & Peyachoknagul, S. (2009). Development of microsatellite markers for Vanda Orchid. *Kasetsart J. (Nat. Sci.)*, 43 (3), 497-506 .
- Ponsuksili, S., Wimmers, K., & Horst, P. (1999). Comparison of multilocus DNA fingerprints and microsatellites in an estimate of genetic distance in chicken. *J. Hered.* 90(6), 656-695
- Schluter, P.M. & Harris, S.A. (2006). Analysis of multilocus fingerprinting data sets containing missing data. *Mol. Ecol. Notes*. (6), 569-572.
- Suwattana, D., Jirasupphachok, J., Kanchanapangka, S., & Koykul, W. (2010). Tetranucleotide microsatellite markers for molecular testing in Thai domestic elephants (*Elephas maximus indicus*) *Thai J. Vet. Med.*, 40 (4), 405-409.
- Thitaram C., Somgird, C., Angkavanich, T., Colenbrander, B., Steenbeek, F. G. v., Roongsri, R., . . . Lenstra, J. A. (2010). Genetic diversity of Asian elephants (*Elephas maximus*) in Thailand as determined by mitochondrial genome. *Conserv Genet*, 11, 325-330.
- Whitehouse, A. M., & Harley, E. H. (2001). Post-bottleneck genetic diversity of elephant populations in South Africa, revealed using microsatellite analysis. *Molecular Ecology*, 10, 2139-2149.
- Zhang, L., Dong, L., Lin, L., Feng, L., Yan, F., Wang, L., . . . Luo, A. (2015). Asian Elephants in China: Estimating Population Size and Evaluating Habitat Suitability. *PLOS ONE*, 10(5).