การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมและตรวจสอบดีเอ็นเอบ่งชี้สำหรับสัตว์ป่าวงศ์สัตว์กีบของไทย

The Evaluation of Genetic Diversity and Investigation of DNA Markers for Thai Wildlife: Cervidae Family

*มนต์ชัย ดวงจินดา (Monchai Duangjinda)[1]**
วิทยา ฉินชิยานนท์ (Wittaya Chinchiyanon)[2]
สนั่น เหลียงไพบูลย์ (Sanan Lengpaiboon)[2]
พิชญ์รัตน์ แสนไชยสุริยา (Pitcharat Sanchaisuriya)[1]
เทวินทร์ วงษ์พระลับ (Tevin Wongpralab)[1]
สุภร กตเวทิน (Suporn Katavetin)[1]
สจี กัณหาเรียง (Sajee Kanhareang)[1]
ยุพิน ผาสุข (Yupin Phasuk)[1]

บทคัดย่อ

ผลการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมสัตว์ป่าไทยวงศ์สัตว์กีบ ซึ่งได้แก่ กวางป่า (*Cervus unicolor*), เนื้อทราย (*Cervus porcinus*), ละองละมั่ง (*Cervus eldi*) และเก้ง (*Muntiacus muntjak*) จำนวนทั้งหมด 81 ตัวอย่าง ด้วยไมโครแซทเทิลไลท์ไพรเมอร์จำนวน 13 โลไซ พบไมโครแซทเทิลไลท์ไพรเมอร์ 10 โลไซ คือ SSM26, BM203, PM4440, TGLA431, AGLA293, BM1706, TGLA337, BL41, BR4502 และ HUJII77 เท่านั้นที่มีความจำเพาะสำหรับพันธุกรรมสัตว์ป่าในวงศ์สัตว์กีบของไทย พบการเพิ่มจำนวนของชิ้นส่วนดีเอ็นเอหลายรูปแบบ ระหว่าง 1-5 อัลลีล การจำแนกกลุ่มด้วยระยะห่างทางพันธุกรรม (Nei's genetic distance) และแผนภาพต้นไม้พันธุกรรม พบว่าสัตว์กีบทั้ง 4 กลุ่มมีพันธุกรรมที่จำแนกจากกันได้ชัดเจน โดยทุกกลุ่มมีระยะห่างทางพันธุกรรมมากกว่า 0.8 ผลการวิจัยครั้งนี้พบว่าเนื้อทรายกับละองละมั่งมีความใกล้ชิดกัน และกวางป่าไทยมีพันธุกรรมที่แตกต่างจากสัตว์กีบอื่น ๆ อย่างชัดเจน

Abstract

The results for genetic diversity analysis in Thai Cervidae family (N=81), which were Sambar deer (*Cervus unicolor*), Hog deer (*Cervus porcinus*), Brow-antlered deer (*Cervus eldi*), Barking deer (*Muntiacus muntjak*), using 13 loci of microsatellites found that only 10 loci of SSM26, BM203, PM4440, TGLA431, AGLA293, BM1706, TGLA337, BL41, BR4502 and HUJII77 were specific for detecting genetic diversity in Cervidae family. The DNA fragment length showed 1-5 alleles per locus. Construction of dendrogram from Nei's genetic distance found that all Cervidae could be classified separately with distance above 0.8. The result showed that Hog deer was related to Brow-antlered deer. In addition, the genetic of Thai Sambar deer was noticeably different from other Cervidae.

คำสำคัญ: ไมโครแซทเทิลไลท์ กวาง เนื้อทราย ละองละมั่ง เก้ง

Keywords: microsatellite, Sambar deer, Eld's deer, Brow-antlered deer, Barking deer

[1]ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
[2]กรมอุทยานแห่งชาติสัตว์ป่าและพันธุ์พืช กระทรวงเกษตรและสหกรณ์
**corresponding author, e-mail: monchai@kku.ac.th*

บทนำ

ประเทศไทยแม้ว่าจะมีสัตว์ป่าอยู่มากมายหลายชนิด แต่ส่วนใหญ่กำลังตกอยู่ในภาวะเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ เนื่องจากสัตว์ป่าไทยมีจำนวนลดลงอย่างต่อเนื่องทุกปี จวบจนปัจจุบันสัตว์ป่าหลายชนิดได้สูญพันธุ์ไป หรือใกล้สูญพันธุ์อีกหลายชนิด สัตว์ป่าในวงศ์สัตว์กีบมีการลดจำนวนอย่างต่อเนื่อง และบางชนิดก็สูญพันธุ์ไป เช่น สมัน เป็นต้น แม้ว่าจะมีการนำเข้าสัตว์กีบบางชนิดเพื่อเป็นการทดแทน แต่กลับจะทำให้พันธุกรรมดั้งเดิมสูญเสียไป ดังนั้นจึงควรมีการวิจัยค้นหาดีเอ็นเอบ่งชี้ (DNA marker) เพื่อตรวจสอบความเป็นพันธุกรรมดั้งเดิมของสัตว์ป่าไทย ซึ่งสามารถใช้เป็นข้อมูลยืนยันในการขึ้นทะเบียนพันธุ์สัตว์ของประเทศไทย นอกเหนือจากข้อมูลทางรูปร่างและสมรรถภาพทั่วไป

สัตว์ป่าวงศ์สัตว์กีบหลายชนิดได้ถูกจัดให้เป็นสัตว์ป่าสงวน เพราะเป็นสัตว์ที่หายากและใกล้สูญพันธุ์หรืออาจสูญหายไปแล้ว เช่น ละองละมั่ง (Brow-antlered Deer หรือ Eld′s Deer) เก้งหม้อหรือเก้งดำ หรือเก้งดง (Fea′s Barking Deer หรือ Fea′s Rib-faced Deer) และเนื้อทราย สาเหตุสำคัญที่ทำให้ประชากรของสัตว์ป่าวงศ์สัตว์กีบในธรรมชาติลดน้อยลงจนใกล้สูญพันธุ์ และสูญพันธุ์ไปแล้วบางชนิดนั้นก็มาจากการถูกล่า (หนังและเขาของสัตว์วงศ์นี้สวยงามและมีราคาสูงเป็นที่ต้องการของนักสะสมซากสัตว์ป่า) และป่าที่อยู่อาศัยถูกทำลาย (บุญส่ง, 2535)

กวางจัดเป็นสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม กีบคู่ เคี้ยวเอื้อง จัดอยู่ในวงศ์ Cervidae กวางในวงศ์นี้ที่พบในประเทศไทยมี 4 ชนิด คือ สมัน (*Cervus schomburhki Blyth*) ละองละมั่ง (*Cervus eldi McClelland*) เนื้อทราย (*Cervus porcinus Zimmermann*) และกวางป่า (*Cervus unicolor Kerr*) นอกจากนี้ยังพบกวางในสกุลอื่นอีก เช่น เก้งหรือฟาน (Barking Deer) ซึ่งมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Muntiacus muntjak Zimmermann* และเก้งหม้อ (*Muntiacus feae Thomus and Doria*)

การประยุกต์ใช้ประโยชน์จากเทคนิค Microsatellite Markers เพื่อเป็นดีเอ็นเอบ่งชี้ ในการบ่งชี้ หรือเครื่องหมายของลักษณะใดลักษณะหนึ่ง (Molecular Markers หรือ DNA Markers) Microsatellite DNA มีคุณสมบัติที่ดีในด้านเป็นตัวบ่งชี้ (markers) เพราะมีการกระจายและความหลากหลายสูง (Highly Polymorphism) (Crooijmans et al., 1996) รวมทั้งสามารถตรวจสอบได้ง่ายด้วยเทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction) ด้วยคุณสมบัติดังกล่าวนี้ปัจจุบันจึงนิยมใช้ Microsatellite DNA เป็น DNA Markers ที่สำคัญในการตรวจสอบวินิจฉัยความแตกต่างของยีนระหว่างสายพันธุ์ หรือหาความสัมพันธ์ของลักษณะที่มีความสำคัญในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด

Microsatellite DNA ส่วนใหญ่นำมาประยุกต์ใช้สำหรับการสร้างแผนที่ยีน (Gene Mapping) โดยเฉพาะกับลักษณะที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เช่น ในไก่ (Cheng et al., 1995) และในโค (Arranz et al., 1998) และมีการวิจัยหาลักษณะเฉพาะตัวทางพันธุกรรมและความสัมพันธ์ของไก่ประจำท้องถิ่น (Local Chicken) ในไก่แอฟริกา เอเชีย และอเมริกาใต้ ด้วยการใช้ Microsatellite DNA จำนวน 22 โลไซ และหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในรูปแบบของ Phylogenetic tree (Wimmers et al., 2000) นอกจากนี้ Microsatellite DNA ยังสามารถนำมาใช้ในการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมได้สำหรับการใช้ microsatellite ในสัตว์ตระกูลกวาง (Cervidae) พบรายงานใน Flagstad et al. (2000) และใน Coulson et al. (1998)

วัตถุประสงค์ของการศึกษา

1. ค้นหาดีเอ็นเอบ่งชี้ (DNA marker) สำหรับสัตว์ป่าในวงศ์สัตว์กีบของไทย คือ กวางป่า เนื้อทราย ละองละมั่ง และเก้ง

2. ตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมเพื่อประเมินลำดับความใกล้ชิดกันของสายวิวัฒนาการของสัตว์ป่าในวงศ์สัตว์กีบของไทย

อุปกรณ์และวิธีการศึกษา

ตัวอย่างและการเก็บตัวอย่างเลือด

เก็บตัวอย่างเลือด จำนวน 81 ตัวอย่าง จากกวางป่าคละเพศจำนวน 32 ตัว เนื้อทรายคละเพศจำนวน13 ตัว ละองละมั่งคละเพศจำนวน 14 ตัว และเก้งคละเพศจำนวน 22 ตัว จากสถานีเพาะเลี้ยงสัตว์ป่าเขาค้อ อำเภอเขาค้อ จังหวัดเพชรบูรณ์ โดยเก็บตัวอย่างเลือดจากเส้นเลือดดำที่คอ (jugular vein) ด้วยกระบอกฉีดยาขนาด 10 ml. เข็มฉีดยาขนาดเบอร์ 18 เก็บตัวอย่างเลือดจำนวน 8-10 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองขนาด 10 ml. ที่ใส่0.5M EDTA เพื่อป้องกันการแข็งตัว ของเลือด จากนั้นนำตัวอย่างเลือดแช่เย็นทันที ก่อนที่จะนำไปสกัดดีเอ็นเอในขั้นตอนต่อไป ในห้องปฏิบัติการพันธุศาสตร์และเทคโนโลยีชีวภาพภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

การสกัดดีเอ็นเอ นำตัวอย่างเลือดของสัตว์แต่ละตัวมาปั่นแยกส่วนเม็ดเลือดขาว และเม็ดเลือดแดงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบ/นาที ประมาณ 20 นาที จากนั้นนำส่วนของเม็ดเลือดขาว (buffy coat) ไปแยกสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป PURE-GENE™ (Gentra Inc., MA) ตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วย 0.8 % agarose gel electrophoresis จากนั้นตรวจสอบความเข้มข้นดีเอ็นเอของแต่ละตัวอย่างด้วยเครื่อง spectrophotometer ปรับความเข้มข้นสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้ให้มีความเข้มข้น 100 ng/μl เก็บสารละลายไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส ก่อนที่จะนำไปวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป

การตรวจสอบแถบดีเอ็นเอสัตว์ป่าวงศ์สัตว์กีบ เลือกใช้ไมโครแซทเทิลไลท์ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับดีเอ็นเอกวางจำนวน 8 โลไซ (CSSM26, BM203, PM4440, TGLA431, AGLA293, BM2320, BM1706, TGLA337) นอกจากนี้ยังเลือกใช้ไมโครแซทเทิลไลท์ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับโครโมโซมสัตว์กีบจำพวกโค อีก 5 โลไซ (MB101, MB079, BL41, BR4502, HUJII77) รวมทั้งหมดจำนวน 13 โลไซ ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่ (Polymerase Chain Reaction, PCR) ด้วยส่วนผสม ทั้งหมดจำนวน 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วยดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) ความเข้มข้น 50 ng/μl จำนวน 1 ไมโครลิตร, 1X PCR บัฟเฟอร์ จำนวน 1 ไมโครลิตร (10X PCR buffer), แมกนีเซียมคลอไรท์ ความเข้มข้น 50 mM จำนวน 0.8 ไมโครลิตร, dNTP ความเข้มข้น 10mM/μl จำนวน 1 ไมโครลิตร และไพรเมอร์ในส่วนของ forward และ reverse ความเข้มข้น 5μM/μl ชนิดละ 1 ไมโครลิตร, เอนไซม์ Taq DNA Polymerase ความเข้มข้น 5U/μl จำนวน 0.1 ไมโครลิตร (Promega, San Diego, CA) น้ำกลั่น (sterilized distilled water) จำนวน 4.1 ไมโครลิตร

การทำปฏิกิริยาลูกโซ่จะใช้เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออัตโนมัติ PCR (GeneAmp PCR System 9600, Perkin-Elmer Applied Biosystems, CA) ก่อนการทำงานของปฏิกิริยาลูกโซ่ กำหนดอุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เพื่อเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบให้แยกเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวอย่างสมบูรณ์ จากนั้นเริ่มปฏิกิริยาลูกโซ่ จำนวน 35 รอบ ตามวงรอบที่อุณหภูมิต่างๆ กันคืออุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที (ดีเอ็นเอเสียสภาพแยกเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว) จากนั้นลดอุณหภูมิลงในช่วง 48-56 องศาเซลเซียส (ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมขึ้นกับไพรเมอร์แต่ละชนิด) เพื่อให้เส้นดีเอ็นเอต้นแบบจับตัวอย่างเหมาะสมกับไพรเมอร์ ใช้เวลานาน 45 วินาที และเพิ่มอุณหภูมิขึ้นที่ระดับ 72 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที ขั้นตอนนี้เพื่อให้มีการเพิ่มจำนวนเบสจากการจับตัวกันอย่างเหมาะสมของไพรเมอร์และดีเอ็นเอต้นแบบ เมื่อปฏิกิริยาลูกโซ่ทำงานครบ 35 รอบ ก่อนสิ้นสุดปฏิกิริยาให้คงอุณหภูมิที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาทีจำนวน 1 รอบ ซึ่งถือได้ว่าขั้นตอนการทำปฏิกิริยาลูกโซ่เสร็จสิ้นอย่างสมบูรณ์

จากนั้นนำผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่ (PCR product) ไปวิเคราะห์ผลการเพิ่มจำนวน ตามขั้นตอน คือ ผสม loading dye (98% deionized formamide 10mM EDTA (pH 8.0) 0.025% xylene cyanol FF 0.025% bromophenol blue) จำนวน

1 ไมโครลิตรกับ PCR product นำ PCR product เข้าเครื่อง PCR ให้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เพื่อให้ PCR product มีสภาพเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวก่อนนำไปวิเคราะห์การเพิ่มปริมาณของไมโคร-แซทเทิลไลท์ดีเอ็นเอ ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากปฏิกิริยาลูกโซ่ ด้วยเครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิส (vertical electrophoresis)(Mini Protein II, Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA) ด้วย 12 % polyacrylamide gel (Sigma, Inc., CA) ผ่านสารละลายตัวกลาง 1 M TBE buffer (0.089 M Tris base, 0.089 M boric acid, 0.002 M EDTA, pH 8.0) เป็นเวลา 50 นาที ที่กระแสไฟฟ้า 80 โวลท์ ความจุไฟฟ้า 300 มิลลิแอมแปร์ เมื่อครบกำหนดเวลาย้อมแผ่นเจล polyacrylamide ด้วย ethydium bromide (10 mg/ml) นาน 10 นาที จากนั้นตรวจดูแถบดีเอ็นเอผ่านใต้เครื่อง UV trans-illuminator เปรียบเทียบชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์กับแถบดีเอ็นเอ มาตรฐาน (DNA marker) GeneRuler™ 100 bp DNA ladder (Fermentas)

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ ข้อมูลของแถบ microsatellite DNA ที่ได้จากการวิเคราะห์จะนำมาหาความถี่อัลลีล และระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) ตามวิธีการของ Nei (1972) และสร้างแผนภาพต้นไม้ (dendrogram) ด้วยวิธี UPGMA ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป NTSYS-computer package version 2.01 (Hallis, 1984)

ผลการศึกษา

ผลการวิเคราะห์ไมโครแซทเทิลไลท์ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอกวางป่า เนื้อทราย ละองละมั่ง และเก้ง จำนวน 13 โลไซ พบไพรเมอร์ 10 โลไซ มีลำดับเบสที่จำเพาะกับลำดับเบสบนสาย ดีเอ็นเอของกลุ่มตัวอย่าง โดยไพรเมอร์ทั้ง 10 โลไซต้องการช่วงอุณหภูมิในการจับตัวกันอย่างเหมาะสม (annealing temperature, Ta) ระหว่างดีเอ็นเอต้นแบบกับไพรเมอร์ที่แตกต่างกันดังแสดงในตารางที่ 1

สำหรับไมโครแซทเทิลไลท์ไพรเมอร์ 3 โลไซ คือ BM2320, MB101, และ MB079 เป็นไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสไม่จำเพาะกับลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอของสัตว์ป่าในวงศ์สัตว์กีบของไทย

จำนวนอัลลีล และความถี่อัลลีล

จากการตรวจสอบไมโครแซทเทิลไลท์ไพรเมอร์ 10 โลไซ พบแถบดีเอ็นเอที่เกิดจากการเพิ่มปริมาณ ที่ชัดเจน แถบดีเอ็นเอที่พบมีขนาดตั้งแต่ 120-500 คู่เบส เกิดแถบดีเอ็นเอระหว่าง 1 ถึง 5 อัลลีล สำหรับไพรเมอร์ที่ทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอที่มีความหลากหลาย ที่สุดคือ ไพรเมอร์ HUJII77 จำนวน 5 อัลลีล ในกลุ่มตัวอย่างเนื้อทราย สำหรับไพรเมอร์แต่ละโลไซ จำนวนอัลลีล และช่วงความถี่อัลลีลในกลุ่มตัวอย่างแต่ละกลุ่มแสดงไว้ในตารางที่ 2

การตรวจสอบความแตกต่างรูปแบบแถบดีเอ็นเอ

ผลจากการวิเคราะห์รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันในแต่ละไพรเมอร์ พบว่ามีการเพิ่มปริมาณของแถบไมโครแซทเทิลไลท์ดีเอ็นเอที่มีหลากรูปแบบจำนวน 2-5 อัลลีล โดยไพรเมอร์ที่พบแถบดีเอ็นเอหลากรูปแบบที่สุดจำนวน 5 อัลลีล ได้แก่ ไพรเมอร์ BR4502 และ HUJII77 ดังแสดงในตารางที่ 3

ระยะห่างทางพันธุกรรม

การวิเคราะห์ระยะห่างทางพันธุกรรมของสัตว์ป่ากีบไทย (กวางป่า เนื้อทราย ละองละมั่ง และเก้ง) ในการวิจัยครั้งนี้ใช้ข้อมูลความถี่แต่ละอัลลีลจาก 10 โลไซ รวม 33 อัลลีล ในการวิเคราะห์หาค่า genetic distance ระหว่างกลุ่มตัวอย่างแต่ละกลุ่ม ทำการวิเคราะห์แบบ unbiased distance ตามวิธีของ Hallis ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป NTSYS-PC v.2.01 ผลการวิเคราะห์แสดงไว้ในตารางที่ 4

ซึ่งพบว่า กวางป่าและเก้งมีระยะห่างทางพันธุกรรมมากที่สุดคือเท่ากับ 1.00 ที่น้อยที่สุดได้แก่ เนื้อทรายกับละองละมั่ง คือ 0.848 จากข้อมูลระยะห่างทางพันธุกรรมดังกล่าว เมื่อนำไปวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมตามแผนภาพต้นไม้ (phylogenetic tree) เพื่อหาความสัมพันธ์สายวิวัฒนาการพันธุกรรม พบว่าพันธุกรรมของสัตว์ป่าวงศ์สัตว์กีบในการวิจัยครั้งนี้ถูกจำแนกจากอย่างค่อนข้างเด่นชัด เนื่องจากค่าระยะห่างทางพันธุกรรมในแต่ละคู่ที่เปรียบเทียบมีค่าสูงมากกว่า 0.8

รูปที่ 1 แสดงให้เห็นว่ากวางมีพันธุกรรมแตกต่างจากกลุ่มอื่น ๆมาก มีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างกวางและเฉลี่ยสัตว์กีบในกลุ่มอื่นเท่ากับ 0.97 (สังเกตค่า coefficient ณ จุด ที่แยกเส้นกราฟออกเป็นกิ่งของกวางและกลุ่มอื่น) และหากเทียบสัตว์กีบทั้ง 3 ในกลุ่มที่เหลือพบว่า เก้งจะมีพันธุกรรมแตกต่างจากกลุ่มเนื้อทราย และละองละมั่งโดยมีระยะห่างทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.865 (สังเกตค่า coefficient ณ จุดที่แยกเส้นกราฟออกเป็นกิ่งของเก้งและกลุ่มเนื้อทราย-ละองละมั่ง) แผนภาพที่ได้แสดงให้เห็นว่าหากใช้กวางป่าไทยเป็นฐานแล้ว เก้งจะมีความแตกต่างจากกวางป่ามากที่สุด ในขณะที่ละองละมั่ง และเนื้อทรายจะมีความแตกต่างทางพันธุกรรมจากกวางป่ารองลงมาตามลำดับ

สรุปผลการศึกษา

จากการวิจัยครั้งนี้พบว่าเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทิลไลท์สามารถนำมาวิเคราะห์ความหลากหลายและรูปแบบดีเอ็นเอสัตว์ป่าในวงศ์สัตว์กีบของไทยได้ โดยไมโครแซทเทิลไลท์ไพรเมอร์ที่มีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอหลากหลายรูปแบบที่สุด (จำนวน 5 อัลลีล) ได้แก่ BR4502 และ HUJII77 และจากการประเมินความสัมพันธ์สายวิวัฒนาการทางพันธุกรรม สามารถจำแนกพันธุกรรมของสัตว์ป่าทั้ง 4 ชนิดออกจากกันอย่างชัดเจน โดยมีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมในแต่ละคู่ที่เปรียบเทียบมีค่าสูงมากกว่า 0.8 และพบว่ากวางป่าไทยมีพันธุกรรมแตกต่างจากสัตว์ป่าในวงศ์สัตว์กีบอื่น ๆมากที่สุด

สำหรับการนำเครื่องหมายพันธุกรรมทั้ง 10 โลไซมาใช้บ่งชี้กลุ่มสัตว์ป่าวงศ์สัตว์กีบของไทยนั้น ยังไม่สามารถใช้บ่งชี้ได้ชัดเจน อย่างไรก็ตามควรได้มีการวิจัยเกี่ยวกับเครื่องหมายพันธุกรรมที่นำมาใช้เพื่อตรวจสอบและบ่งชี้ความเป็นสัตว์ป่าไทยวงศ์สัตว์กีบเพิ่มเติมอย่างต่อเนื่องในอนาคตด้วย จะทำให้ได้ประโยชน์ยิ่งขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยครั้งนี้ ได้รับการสนับสนุนงบประมาณเพื่อการวิจัยจากทุนอุดหนุนประเภททั่วไป มหาวิทยาลัยขอนแก่น ประจำปีงบประมาณ 2546 และขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่สถานีเพาะเลี้ยงสัตว์ป่าเขาค้อ อำเภอเขาค้อ จังหวัดเพชรบูรณ์ ทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างเลือด

เอกสารอ้างอิง

บุญส่ง เลขะกุล. 2535. **สัตว์ป่าที่กำลังสูญพันธุ์.** หนังสือการต่อสู้และผลงานของนายแพทย์บุญส่ง เลขะกุล. อนุสรณ์ในการพระราชทานเพลิงศพนายแพทย์บุญส่ง เลขะกุล. ณ เมรุวัดเทพศิรินทราวาส วันเสาร์ที่ 6 มิถุนายน 2535. 394 น.

Arranz, J. J., W. Coppieters, P. Berzi, N. Cambisano, B. Grisart, L. Karim, F. Marcq, L. Moreau, C. Mezer, J. Riguet, P. Simon, P. Vanmanshoven, D. Waqenaar and M. Georges. 1998. A QTL affacting milk yield and composition map to bovine chromosome 20: A confirmation. **Anim. Genet.** 29: 107-115.

Cheng, H. H., I. Levin, R. L. Vallejo, H. Khatib, J. B. Dodgson, L. B. Crittenden and J. Hillel. 1995. Development of a genetic map of the chicken with markers of high utility. **Poultry Sci.** 74: 1855-1874.

การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมและตรวจสอบดีเอ็นเอบ่งชี้สำหรับสัตว์ป่าวงศ์สัตว์กีบของไทย

The Evaluation of Genetic Diversity and Investigation of DNA Markers for Thai Wildlife: Cervidae Family

*มนต์ชัย ดวงจินดา (Monchai Duangjinda)[1]**
วิทยา ฉินชิยานนท์ (Wittaya Chinchiyanon)[2]
สนั่น เหลียงไพบูลย์ (Sanan Lengpaiboon)[2]
พิชญ์รัตน์ แสนไชยสุริยา (Pitcharat Sanchaisuriya)[1]
เทวินทร์ วงษ์พระลับ (Tevin Wongpralab)[1]
สุภร กตเวทิน (Suporn Katavetin)[1]
สจี กัณหาเรียง (Sajee Kanhareang)[1]
ยุพิน ผาสุข (Yupin Phasuk)[1]

บทคัดย่อ

ผลการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมสัตว์ป่าไทยวงศ์สัตว์กีบ ซึ่งได้แก่ กวางป่า (*Cervus unicolor*), เนื้อทราย (*Cervus porcinus*), ละองละมั่ง (*Cervus eldi*) และเก้ง (*Muntiacus muntjak*) จำนวนทั้งหมด 81 ตัวอย่าง ด้วยไมโครแซทเทิลไลท์ไพรเมอร์จำนวน 13 โลไซ พบไมโครแซทเทิลไลท์ไพรเมอร์ 10 โลไซ คือ SSM26, BM203, PM4440, TGLA431, AGLA293, BM1706, TGLA337, BL41, BR4502 และ HUJII77 เท่านั้นที่มีความจำเพาะสำหรับพันธุกรรมสัตว์ป่าในวงศ์สัตว์กีบของไทย พบการเพิ่มจำนวนของชิ้นส่วนดีเอ็นเอหลายรูปแบบ ระหว่าง 1-5 อัลลีล การจำแนกกลุ่มด้วยระยะห่างทางพันธุกรรม (Nei's genetic distance) และแผนภาพต้นไม้พันธุกรรม พบว่าสัตว์กีบทั้ง 4 กลุ่มมีพันธุกรรมที่จำแนกจากกันได้ชัดเจน โดยทุกกลุ่มมีระยะห่างทางพันธุกรรมมากกว่า 0.8 ผลการวิจัยครั้งนี้พบว่าเนื้อทรายกับละองละมั่งมีความใกล้ชิดกัน และกวางป่าไทยมีพันธุกรรมที่แตกต่างจากสัตว์กีบอื่น ๆ อย่างชัดเจน

Abstract

The results for genetic diversity analysis in Thai Cervidae family (N=81), which were Sambar deer (*Cervus unicolor*), Hog deer (*Cervus porcinus*), Brow-antlered deer (*Cervus eldi*), Barking deer (*Muntiacus muntjak*), using 13 loci of microsatellites found that only 10 loci of SSM26, BM203, PM4440, TGLA431, AGLA293, BM1706, TGLA337, BL41, BR4502 and HUJII77 were specific for detecting genetic diversity in Cervidae family. The DNA fragment length showed 1-5 alleles per locus. Construction of dendrogram from Nei's genetic distance found that all Cervidae could be classified separately with distance above 0.8. The result showed that Hog deer was related to Brow-antlered deer. In addition, the genetic of Thai Sambar deer was noticeably different from other Cervidae.

คำสำคัญ: ไมโครแซทเทิลไลท์ กวาง เนื้อทราย ละองละมั่ง เก้ง

Keywords: microsatellite, Sambar deer, Eld's deer, Brow-antlered deer, Barking deer

[1]ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
[2]กรมอุทยานแห่งชาติสัตว์ป่าและพันธุ์พืช กระทรวงเกษตรและสหกรณ์
**corresponding author, e-mail: monchai@kku.ac.th*

บทนำ

ประเทศไทยแม้ว่าจะมีสัตว์ป่าอยู่มากมายหลายชนิด แต่ส่วนใหญ่กำลังตกอยู่ในภาวะเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ เนื่องจากสัตว์ป่าไทยมีจำนวนลดลงอย่างต่อเนื่องทุกปี จวบจนปัจจุบันสัตว์ป่าหลายชนิดได้สูญพันธุ์ไป หรือใกล้สูญพันธุ์อีกหลายชนิด สัตว์ป่าในวงศ์สัตว์กีบมีการลดจำนวนอย่างต่อเนื่อง และบางชนิดก็สูญพันธุ์ไป เช่น สมัน เป็นต้น แม้ว่าจะมีการนำเข้าสัตว์กีบบางชนิดเพื่อเป็นการทดแทน แต่กลับจะทำให้พันธุกรรมดั้งเดิมสูญเสียไป ดังนั้นจึงควรมีการวิจัยค้นหาดีเอ็นเอบ่งชี้ (DNA marker) เพื่อตรวจสอบความเป็นพันธุกรรมดั้งเดิมของสัตว์ป่าไทย ซึ่งสามารถใช้เป็นข้อมูลยืนยันในการขึ้นทะเบียนพันธุ์สัตว์ของประเทศไทย นอกเหนือจากข้อมูลทางรูปร่างและสมรรถภาพทั่วไป

สัตว์ป่าวงศ์สัตว์กีบหลายชนิดได้ถูกจัดให้เป็นสัตว์ป่าสงวน เพราะเป็นสัตว์ที่หายากและใกล้สูญพันธุ์หรืออาจสูญหายไปแล้ว เช่น ละองละมั่ง (Brow-antlered Deer หรือ Eld′s Deer) เก้งหม้อหรือเก้งดำ หรือเก้งดง (Fea′s Barking Deer หรือ Fea′s Rib-faced Deer) และเนื้อทราย สาเหตุสำคัญที่ทำให้ประชากรของสัตว์ป่าวงศ์สัตว์กีบในธรรมชาติลดน้อยลงจนใกล้สูญพันธุ์ และสูญพันธุ์ไปแล้วบางชนิดนั้นก็มาจากการถูกล่า (หนังและเขาของสัตว์วงศ์นี้สวยงามและมีราคาสูงเป็นที่ต้องการของนักสะสมซากสัตว์ป่า) และป่าที่อยู่อาศัยถูกทำลาย (บุญส่ง, 2535)

กวางจัดเป็นสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม กีบคู่ เคี้ยวเอื้อง จัดอยู่ในวงศ์ Cervidae กวางในวงศ์นี้ที่พบในประเทศไทยมี 4 ชนิด คือ สมัน (*Cervus schomburhki Blyth*) ละองละมั่ง (*Cervus eldi McClelland*) เนื้อทราย (*Cervus porcinus Zimmermann*) และกวางป่า (*Cervus unicolor Kerr*) นอกจากนี้ยังพบกวางในสกุลอื่นอีก เช่น เก้งหรือฟาน (Barking Deer) ซึ่งมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Muntiacus muntjak Zimmermann* และเก้งหม้อ (*Muntiacus feae Thomus and Doria*)

การประยุกต์ใช้ประโยชน์จากเทคนิค Microsatellite Markers เพื่อเป็นดีเอ็นเอบ่งชี้ ในการบ่งชี้ หรือเครื่องหมายของลักษณะใดลักษณะหนึ่ง (Molecular Markers หรือ DNA Markers) Microsatellite DNA มีคุณสมบัติที่ดีในด้านเป็นตัวบ่งชี้ (markers) เพราะมีการกระจายและความหลากหลายสูง (Highly Polymorphism) (Crooijmans et al., 1996) รวมทั้งสามารถตรวจสอบได้ง่ายด้วยเทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction) ด้วยคุณสมบัติดังกล่าวนี้ปัจจุบันจึงนิยมใช้ Microsatellite DNA เป็น DNA Markers ที่สำคัญในการตรวจสอบวินิจฉัยความแตกต่างของยีนระหว่างสายพันธุ์ หรือหาความสัมพันธ์ของลักษณะที่มีความสำคัญในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด

Microsatellite DNA ส่วนใหญ่นำมาประยุกต์ใช้สำหรับการสร้างแผนที่ยีน (Gene Mapping) โดยเฉพาะกับลักษณะที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เช่น ในไก่ (Cheng et al., 1995) และในโค (Arranz et al., 1998) และมีการวิจัยหาลักษณะเฉพาะตัวทางพันธุกรรมและความสัมพันธ์ของไก่ประจำท้องถิ่น (Local Chicken) ในไก่แอฟริกา เอเชีย และอเมริกาใต้ ด้วยการใช้ Microsatellite DNA จำนวน 22 โลไซ และหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในรูปแบบของ Phylogenetic tree (Wimmers et al., 2000) นอกจากนี้ Microsatellite DNA ยังสามารถนำมาใช้ในการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมได้สำหรับการใช้ microsatellite ในสัตว์ตระกูลกวาง (Cervidae) พบรายงานใน Flagstad et al. (2000) และใน Coulson et al. (1998)

วัตถุประสงค์ของการศึกษา

1. ค้นหาดีเอ็นเอบ่งชี้ (DNA marker) สำหรับสัตว์ป่าในวงศ์สัตว์กีบของไทย คือ กวางป่า เนื้อทราย ละองละมั่ง และเก้ง

2. ตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมเพื่อประเมินลำดับความใกล้ชิดกันของสายวิวัฒนาการของสัตว์ป่าในวงศ์สัตว์กีบของไทย

อุปกรณ์และวิธีการศึกษา

ตัวอย่างและการเก็บตัวอย่างเลือด

เก็บตัวอย่างเลือด จำนวน 81 ตัวอย่าง จากกวางป่าคละเพศจำนวน 32 ตัว เนื้อทรายคละเพศจำนวน13 ตัว ละองละมั่งคละเพศจำนวน 14 ตัว และเก้งคละเพศจำนวน 22 ตัว จากสถานีเพาะเลี้ยงสัตว์ป่าเขาค้อ อำเภอเขาค้อ จังหวัดเพชรบูรณ์ โดยเก็บตัวอย่างเลือดจากเส้นเลือดดำที่คอ (jugular vein) ด้วยกระบอกฉีดยาขนาด 10 ml. เข็มฉีดยาขนาดเบอร์ 18 เก็บตัวอย่างเลือดจำนวน 8-10 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองขนาด 10 ml. ที่ใส่0.5M EDTA เพื่อป้องกันการแข็งตัว ของเลือด จากนั้นนำตัวอย่างเลือดแช่เย็นทันที ก่อนที่จะนำไปสกัดดีเอ็นเอในขั้นตอนต่อไป ในห้องปฏิบัติการพันธุศาสตร์และเทคโนโลยีชีวภาพภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

การสกัดดีเอ็นเอ นำตัวอย่างเลือดของสัตว์แต่ละตัวมาปั่นแยกส่วนเม็ดเลือดขาว และเม็ดเลือดแดงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบ/นาที ประมาณ 20 นาที จากนั้นนำส่วนของเม็ดเลือดขาว (buffy coat) ไปแยกสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป PURE-GENE™ (Gentra Inc., MA) ตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วย 0.8 % agarose gel electrophoresis จากนั้นตรวจสอบความเข้มข้นดีเอ็นเอของแต่ละตัวอย่างด้วยเครื่อง spectrophotometer ปรับความเข้มข้นสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้ให้มีความเข้มข้น 100 ng/μl เก็บสารละลายไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส ก่อนที่จะนำไปวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป

การตรวจสอบแถบดีเอ็นเอสัตว์ป่าวงศ์สัตว์กีบ เลือกใช้ไมโครแซทเทิลไลท์ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับดีเอ็นเอกวางจำนวน 8 โลไซ (CSSM26, BM203, PM4440, TGLA431, AGLA293, BM2320, BM1706, TGLA337) นอกจากนี้ยังเลือกใช้ไมโครแซทเทิลไลท์ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับโครโมโซมสัตว์กีบจำพวกโค อีก 5 โลไซ (MB101, MB079, BL41, BR4502, HUJII77) รวมทั้งหมดจำนวน 13 โลไซ ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่ (Polymerase Chain Reaction, PCR) ด้วยส่วนผสม ทั้งหมดจำนวน 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วยดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) ความเข้มข้น 50 ng/μl จำนวน 1 ไมโครลิตร, 1X PCR บัฟเฟอร์ จำนวน 1 ไมโครลิตร (10X PCR buffer), แมกนีเซียมคลอไรท์ ความเข้มข้น 50 mM จำนวน 0.8 ไมโครลิตร, dNTP ความเข้มข้น 10mM/μl จำนวน 1 ไมโครลิตร และไพรเมอร์ในส่วนของ forward และ reverse ความเข้มข้น 5μM/μl ชนิดละ 1 ไมโครลิตร, เอนไซม์ Taq DNA Polymerase ความเข้มข้น 5U/μl จำนวน 0.1 ไมโครลิตร (Promega, San Diego, CA) น้ำกลั่น (sterilized distilled water) จำนวน 4.1 ไมโครลิตร

การทำปฏิกิริยาลูกโซ่จะใช้เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออัตโนมัติ PCR (GeneAmp PCR System 9600, Perkin-Elmer Applied Biosystems, CA) ก่อนการทำงานของปฏิกิริยาลูกโซ่ กำหนดอุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เพื่อเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบให้แยกเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวอย่างสมบูรณ์ จากนั้นเริ่มปฏิกิริยาลูกโซ่ จำนวน 35 รอบ ตามวงรอบที่อุณหภูมิต่างๆ กันคืออุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที (ดีเอ็นเอเสียสภาพแยกเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว) จากนั้นลดอุณหภูมิลงในช่วง 48-56 องศาเซลเซียส (ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมขึ้นกับไพรเมอร์แต่ละชนิด) เพื่อให้เส้นดีเอ็นเอต้นแบบจับตัวอย่างเหมาะสมกับไพรเมอร์ ใช้เวลานาน 45 วินาที และเพิ่มอุณหภูมิขึ้นที่ระดับ 72 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที ขั้นตอนนี้เพื่อให้มีการเพิ่มจำนวนเบสจากการจับตัวกันอย่างเหมาะสมของไพรเมอร์และดีเอ็นเอต้นแบบ เมื่อปฏิกิริยาลูกโซ่ทำงานครบ 35 รอบ ก่อนสิ้นสุดปฏิกิริยาให้คงอุณหภูมิที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาทีจำนวน 1 รอบ ซึ่งถือได้ว่าขั้นตอนการทำปฏิกิริยาลูกโซ่เสร็จสิ้นอย่างสมบูรณ์

จากนั้นนำผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่ (PCR product) ไปวิเคราะห์ผลการเพิ่มจำนวน ตามขั้นตอน คือ ผสม loading dye (98% deionized formamide 10mM EDTA (pH 8.0) 0.025% xylene cyanol FF 0.025% bromophenol blue) จำนวน

1 ไมโครลิตรกับ PCR product นำ PCR product เข้าเครื่อง PCR ให้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เพื่อให้ PCR product มีสภาพเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวก่อนนำไปวิเคราะห์การเพิ่มปริมาณของไมโคร-แซทเทิลไลท์ดีเอ็นเอ ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากปฏิกิริยาลูกโซ่ ด้วยเครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิส (vertical electrophoresis)(Mini Protein II, Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA) ด้วย 12 % polyacrylamide gel (Sigma, Inc., CA) ผ่านสารละลายตัวกลาง 1 M TBE buffer (0.089 M Tris base, 0.089 M boric acid, 0.002 M EDTA, pH 8.0) เป็นเวลา 50 นาที ที่กระแสไฟฟ้า 80 โวลท์ ความจุไฟฟ้า 300 มิลลิแอมแปร์ เมื่อครบกำหนดเวลาย้อมแผ่นเจล polyacrylamide ด้วย ethydium bromide (10 mg/ml) นาน 10 นาที จากนั้นตรวจดูแถบดีเอ็นเอผ่านใต้เครื่อง UV trans-illuminator เปรียบเทียบชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์กับแถบดีเอ็นเอ มาตรฐาน (DNA marker) GeneRuler™ 100 bp DNA ladder (Fermentas)

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ ข้อมูลของแถบ microsatellite DNA ที่ได้จากการวิเคราะห์จะนำมาหาความถี่อัลลีล และระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) ตามวิธีการของ Nei (1972) และสร้างแผนภาพต้นไม้ (dendrogram) ด้วยวิธี UPGMA ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป NTSYS-computer package version 2.01 (Hallis, 1984)

ผลการศึกษา

ผลการวิเคราะห์ไมโครแซทเทิลไลท์ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอกวางป่า เนื้อทราย ละองละมั่ง และเก้ง จำนวน 13 โลไซ พบไพรเมอร์ 10 โลไซ มีลำดับเบสที่จำเพาะกับลำดับเบสบนสาย ดีเอ็นเอของกลุ่มตัวอย่าง โดยไพรเมอร์ทั้ง 10 โลไซต้องการช่วงอุณหภูมิในการจับตัวกันอย่างเหมาะสม (annealing temperature, Ta) ระหว่างดีเอ็นเอต้นแบบกับไพรเมอร์ที่แตกต่างกันดังแสดงในตารางที่ 1

สำหรับไมโครแซทเทิลไลท์ไพรเมอร์ 3 โลไซ คือ BM2320, MB101, และ MB079 เป็นไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสไม่จำเพาะกับลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอของสัตว์ป่าในวงศ์สัตว์กีบของไทย

จำนวนอัลลีล และความถี่อัลลีล

จากการตรวจสอบไมโครแซทเทิลไลท์ไพรเมอร์ 10 โลไซ พบแถบดีเอ็นเอที่เกิดจากการเพิ่มปริมาณ ที่ชัดเจน แถบดีเอ็นเอที่พบมีขนาดตั้งแต่ 120-500 คู่เบส เกิดแถบดีเอ็นเอระหว่าง 1 ถึง 5 อัลลีล สำหรับไพรเมอร์ที่ทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอที่มีความหลากหลาย ที่สุดคือ ไพรเมอร์ HUJII77 จำนวน 5 อัลลีล ในกลุ่มตัวอย่างเนื้อทราย สำหรับไพรเมอร์แต่ละโลไซ จำนวนอัลลีล และช่วงความถี่อัลลีลในกลุ่มตัวอย่างแต่ละกลุ่มแสดงไว้ในตารางที่ 2

การตรวจสอบความแตกต่างรูปแบบแถบดีเอ็นเอ

ผลจากการวิเคราะห์รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันในแต่ละไพรเมอร์ พบว่ามีการเพิ่มปริมาณของแถบไมโครแซทเทิลไลท์ดีเอ็นเอที่มีหลากรูปแบบจำนวน 2-5 อัลลีล โดยไพรเมอร์ที่พบแถบดีเอ็นเอหลากรูปแบบที่สุดจำนวน 5 อัลลีล ได้แก่ ไพรเมอร์ BR4502 และ HUJII77 ดังแสดงในตารางที่ 3

ระยะห่างทางพันธุกรรม

การวิเคราะห์ระยะห่างทางพันธุกรรมของสัตว์ป่ากีบไทย (กวางป่า เนื้อทราย ละองละมั่ง และเก้ง) ในการวิจัยครั้งนี้ใช้ข้อมูลความถี่แต่ละอัลลีลจาก 10 โลไซ รวม 33 อัลลีล ในการวิเคราะห์หาค่า genetic distance ระหว่างกลุ่มตัวอย่างแต่ละกลุ่ม ทำการวิเคราะห์แบบ unbiased distance ตามวิธีของ Hallis ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป NTSYS-PC v.2.01 ผลการวิเคราะห์แสดงไว้ในตารางที่ 4