การศึกษาการจัดเรียงตัวของลำดับเบสไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอในช้างไทย

The Study of Nucleotides Arrangement of Mitochondrial DNA in Thai Elephants (*Elephas maximus indicus*)

อุมาพร ใหม่แก้ว[1*] วรวิทย์ วัชชวัลคุ[2] วรวิทย์ สิริพลวัฒน์[3] สิทธวีร์ ทองทิพย์ศิริเดช[1, 2]
สิทธิเดช มหาสาวังกุล[4] พิพัฒนฉัตร ดิศกุล[5] อนุชัย ภิญโญภูมินทร์[2]
Umaporn Maikaew[1*] Worawidh Wajjwalku[2] Voravit siripholwat[3] Sitthavee Thongtipsiridech[1, 2]
Sittidet Mahasawankul[4] Phiphatanachatr Diskul[5] Anuchai Pinyopummin[2]

บทคัดย่อ

การลดจำนวนลงอย่างต่อเนื่องของช้างในประเทศไทยส่งผลให้เกิดการเพิ่มโอกาสในการสูญเสียความหลากหลายทางพันธุกรรม การศึกษาพันธุกรรมทางสายแม่โดยการวิเคราะห์การจัดเรียงตัวของลำดับเบสของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ (mtDNA) สามารถนำมาใช้ศึกษาความสัมพันธ์และความหลากหลายทางพันธุกรรมเพื่อเป็นแนวทางในการอนุรักษ์ การศึกษานี้ได้ทำการศึกษาลำดับเบสทั้งหมดของ mtDNA ในช้างของศูนย์อนุรักษ์ช้างไทย จังหวัดลำปาง โดยสกัดดีเอ็นเอจากเลือด แล้วนำมาหาลำดับเบสด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ผลการศึกษาลำดับเบสของ mtDNA ทั้งหมดของช้าง 1 เชือก พบว่ามีเบสจำนวน 16,847 คู่เบส จากการใช้ Primers 20 คู่ (accession number EF588275) จากนั้นทำการหาลำดับเบสเพื่อจัดกลุ่ม (haplotype) ของช้าง 11 เชือกจากศูนย์อนุรักษ์ช้างไทย โดยวิเคราะห์ส่วนของ 5′ cytochrome b ร่วมกับส่วน 3′ cytochrome b ถึง

คำสำคัญ: ช้างไทย ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ

Keywords: Thai elephant, mitochondrial DNA, *Elephas maximus indicus*

[1] ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140
Center for Agricultural Biotechnology, Kamphaengsaen Campus, Kasetsart University, Nakhonpathom, 73140

[2] คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140
Faculty of Veterinary Medicine, Kamphaengsaen Campus, Kasetsart University, Nakhonpathom, 73140

[3] คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140
Faculty of Agriculture, Kamphaengsaen Campus, Kasetsart University, Nakhonpathom, 73140

[4] สถาบันคชบาลแห่งชาติ อ.เมือง จ.ลำปาง 52000
National Elephant Institute, Muang, Lampang, 52000

[5] โรงช้างต้น พระตำหนักจิตรลดารโหฐาน พระราชวังดุสิต กรุงเทพมหานคร 10300
Royal Elephant Stable, Chitrlada palace, Bangkok, 10300

* Corresponding author: au_elephant@yahoo.com

left domain ของ control region ผลการศึกษาพบว่าจากการเปรียบเทียบลำดับเบสทั้งหมดของช้างในการศึกษาครั้งนี้กับช้างเอเชีย ช้างแอฟริกา และช้างแมมมอท พบว่าช้างไทยซึ่งเป็นช้างเอเชียมีความใกล้ชิดกับช้างแมมมอทมากกว่าช้างแอฟริกา นอกจากนี้การศึกษาในช้าง 11 เชือก พบว่าจัดช้างได้ 6 haplotypes จากความแตกต่างกัน 9 และ 30 ตำแหน่ง บนความยาว 250 คู่เบส และ 927 คู่เบส ของส่วน 5′ end cytochrome b และ 3′ end cytochrome b ถึง left domain ของ control region ตามลำดับ การศึกษาครั้งนี้เป็นการยืนยันถึงความใกล้ชิดของสายวิวัฒนาการระหว่างช้างเอเชียกับช้างแมมมอทและข้อมูลที่ได้รับจากการจัดกลุ่ม haplotype ยังสามารถใช้เป็นแนวทางในการวางแผนอนุรักษ์ช้างไทย

Abstract

Thai elephant (*Elephas maximus indicus*) continues to decline in numbers and genetic diversity. Therefore, genetic diversity in elephant has been studied for breeding plan. The study of nucleotides arrangement of mitochondrial DNA, maternal inheritance, may help the elephant conservation. We sampled 11 elephants from Thai Elephant conservation center, Lampang by extracting DNA from blood. One elephant was used to PCR amplifying by 20 primer pairs and sequencing. The first complete mitochondrial DNA 16,847 base pairs (bp) sequence of Thai elephant has been reported here, deposited in GenBank and given accession number EF588275. Our phylogenetic analyses show that the Thai elephant is more closely related to the mammoth than african elephant. 5′end cytochrome 250 bp and 3′end cytochrome to left domain of the control region 927 bp were used to identify the animal and could genetically be devided into 6 haplotypes. They are identified by 9 and 30 positions of nucleotide that are different of 5′end cytochrome and 3′end cytochrome to left domain of the control region, respectively.

บทนำ

ช้างในประเทศไทยได้ลดจำนวนลงอย่างต่อเนื่อง จากที่เคยมีช้างเลี้ยงในอดีตมากกว่าหนึ่งหมื่นเชือก แต่ในปัจจุบันเหลือเพียงประมาณ 2,500 เชือก เนื่องจากช้างเลี้ยงมีโอกาสที่จะผสมพันธุ์และเกิดลูกน้อยลง มีการป่วยและตายเพิ่มขึ้น ในปางช้างต้องการช้างที่เชื่องและควบคุมง่าย จึงนิยมใช้แต่ช้างเพศเมียเป็นส่วนใหญ่ โดยมีช้างเพศผู้ไม่กี่เชือกที่ถูกใช้เป็นพ่อพันธุ์ และยังมีรายงานที่พบว่าคุณภาพน้ำเชื้อของช้างไทยที่รีดเก็บด้วยวิธี manual collection มีคุณภาพต่ำมาก (นิกร และคณะ, 2544) ทำให้ความหลากหลายทางพันธุกรรมที่เกิดจากการผสมพันธุ์ตามธรรมชาติ ด้วยช้างเพียงกลุ่มเดียวมีโอกาสทำให้ความหลากหลายต่ำด้วย ทำให้สถานการณ์ช้างเลี้ยงในปัจจุบันนอกจากมีจำนวนลดลงแล้ว

ยังเกิดการสูญเสียความหลากหลายทางพันธุกรรมร่วมด้วย ในส่วนของช้างป่าปัจจุบันคาดว่ามีจำนวนรวมกันในทุกผืนป่าไม่เกิน 3000 ตัว (มัทนา, 2548) เนื่องจากพื้นที่ป่าที่อยู่อาศัยลดลง ซึ่งช้างต้องการพื้นที่หากิน 500 ตารางกิโลเมตร (Vidya et al., 2005) และป่าหลายแห่งถูกตัดขาดออกจากกัน ช้างที่อยู่อาศัยภายในผืนป่าต่างๆ ไม่สามารถอพยพระหว่างป่าได้ การผสมพันธุ์จึงเกิดขึ้นแต่ภายในกลุ่มทำให้ความหลากหลายทางพันธุกรรมลดลง ประกอบกับในปัจจุบันข้อมูลการประเมินจำนวนช้างป่าโดยอาศัยหลักการประเมินทางอ้อมพบว่าไม่มีผืนป่าใดที่มีจำนวนช้างมากกว่า 500 ตัว ซึ่งตามหลักของการคงความหลากหลายทางพันธุกรรม ในผืนป่าแต่ละพื้นที่ควรมีจำนวนช้างอย่างน้อย 500 ตัว จึงจะทำให้เกิดการผสมพันธุ์และคงลักษณะทางพันธุกรรมที่ดีไว้ได้ (Santiapillai and Jackson, 1990)

มีการนำเทคนิคทางด้านชีวโมเลกุลมาใช้ในการศึกษาทางความหลากหลายทางพันธุกรรมในสัตว์ เช่น ควาย (Kikkawa et al., 1997) สัตว์ตระกูลกวาง (Balakrishnan et al., 2003; Pang et al., 2003) ในช้างได้มีการใช้ลำดับเบสบริเวณ cytochrome b มาใช้แยกช้างเอเชีย ช้างแอฟริกา และช้างแมมมอท (Thomas et al., 2000) นอกจากนี้ยังมีการใช้ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอมาจัดกลุ่ม haplotype ของช้างเอเชีย (Fernando et al., 2000; Fleischer et al., 2001) ในประเทศไทยได้มีการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในช้างไทย โดยการหาลำดับเบสบริเวณ 5′ end cytochrome b ของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ สามารถแบ่งช้างไทยได้ 8 haplotypes (A-H) (ปรีดา และคณะ, 2546) ในการศึกษาทำการศึกษาลำดับเบสในส่วน 3′ end cytochrome b ถึง left domain ของ control region เพิ่มขึ้น โดยคาดว่าอาจทำให้พบกลุ่มของช้าง (haplotype) เพิ่มมากขึ้นและจะศึกษาการจัดเรียงตัวของลำดับเบสของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอทั้งหมดของช้างไทย เพื่อเป็นประโยชน์ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของช้างในอนาคต

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

การเก็บตัวอย่างเลือด

ทำการเจาะเก็บตัวอย่างเลือดช้างต้น 11 เชือก จากศูนย์อนุรักษ์ช้างไทย จังหวัดลำปาง (No.96-106) ที่บริเวณหลอดเลือดดำหลังหู (ear vein) ด้วยเข็มฉีดยาเบอร์ 18 เก็บเลือดใส่ในขวดเก็บเลือดที่มี EDTA ประมาณ 1000 μl วนขวดให้ EDTA ละลาย เพื่อป้องกันการแข็งตัวของเลือด หรือเก็บเลือดใส่ใน microcentrifuge tube ที่มี D-solution (Chomczynski and Sacchi, 1987) ประมาณ 200 μl ผสมให้เข้ากัน แล้วเก็บไว้ในตู้เย็น -20 องศาเซลเซียส รอการสกัดดีเอ็นเอ

การสกัดดีเอ็นเอ

การสกัดดีเอ็นเอใช้วิธี Phenol-chloroform (Sambrook et al., 1989) โดยใช้ตัวอย่างเลือด 100 μl หลังจากสกัดทำการละลายดีเอ็นเอด้วย Tris-EDTA buffer 15 μl ตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis เก็บสารละลายไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR

ทำการหาลำดับเบสไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอทั้งหมดของช้างไทยจะใช้ตัวอย่างหมายเลข 96 (No.96) ซึ่ง Primer ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR จะออกแบบจากลำดับเบสไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอครบวงของช้างเอเชียที่มีรายงานใน GenBank หมายเลข NC_005129 และประยุกต์จากลำดับเบสไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอครบวงของช้างแมมมอท (Krause et al., 2006) โดยใช้ primer ทั้งหมด 20 คู่ (Table 1) ส่วนการจัดกลุ่ม haplotype ของช้างทั้ง 11 เชือกนั้นจะทำการศึกษาโดยใช้บริเวณ 5′end cytochrome b ซึ่งใช้ primer Mito-CB1 และ Mito-CB2 (ปรีดา และคณะ, 2546) และบริเวณ 3′end cytochrome b ถึง left domain ของ control region โดยใช้ primer Mito-CB3 และ 22A Re (Table 1) โดย PCR reaction มีส่วนผสมทั้งหมด 25 μl ประกอบด้วย 16 μl deionized water, 2.5 μl 10x PCR buffer, 0.75 μl 50 mM $MgCl_2$, อย่างละ 1 μl ของ forward และ reverse primer, 1 μl 5 mM dNTP, 0.25 Tag DNA polymerase (Invitrogen®, USA) and 2.5 μl ดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) ใช้เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออัตโนมัติ PTC-200 (Peltier Thermal Cycler machine, USA) ขั้นตอนในปฏิกิริยาประกอบด้วย predenature ที่ 94˚C เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเข้าสู่รอบของการเพิ่มชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ จำนวน 35 รอบ เริ่มจาก denature ที่ 94˚C เป็นเวลา 20 วินาที annealing (ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมขึ้นกับ primer แต่ละคู่ (Table 1)) 30 วินาที extention 72˚C 45 วินาที และเมื่อครบจำนวนรอบ อุณหภูมิจะเข้าสู่ขั้นตอนของ final extention ที่ 72˚C เป็นเวลา 2 นาที และ final incubation ที่ 4˚C ตลอดไป นำ PCR product ที่ได้ไปตรวจสอบด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis ถ้าพบ primer-dimer หรือ PCR product ขนาดที่ไม่ต้องการให้ตัดเจลในบริเวณที่ต้องการแล้วทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้ QIAGEN® gel purification columns (Fernando et al., 2003b)

การหาลำดับเบส

นำ PCR product ที่ได้มาติดฉลากด้วยสารฟลูออเรสเซน จาก ABI PRISM® BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems®, USA) โดยใช้ forward และ reverse primer ทำการส่งหาลำดับเบสด้วยเครื่อง Automated DNA sequencing ที่หน่วยบริการชีวภาพ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ นำลำดับเบสที่ได้ไปเปรียบเทียบกับลำดับเบสใน GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) และทำการวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยโปรแกรม Bioedit (http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html) และ Multipipmaker (http://pipmaker.bx.psu.edu/cgi-bin/multipipmaker)

ผลการทดลอง

การหาลำดับเบสไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอทั้งหมดของช้างไทย ด้วยตัวอย่างเลือดของช้างหมายเลข 96 โดยใช้ Primers ทั้งหมด 20 คู่ ซึ่งขนาดของ PCR product ที่ได้จาก Primers แต่ละคู่

และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการจับตัวกัน (annealing temperature) ของ Primers แต่ละคู่ได้แสดงไว้ใน Table 1 ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยโปรแกรม Multipipmaker พบว่ามีความยาวทั้งสิ้น 16,847 คู่เบส ประกอบด้วย 2 rRNA genes (12S rRNA และ 16S rRNA), 22 tRNA, 13 protein coding sequence ซึ่งได้รายงานไว้ใน GenBank โดยมี accession number EF588275 และเมื่อนำลำดับเบสทั้งหมดที่ได้มาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของสายวิวัฒนาการพันธุกรรม (Phylogenetic tree) ของช้างไทย (No.96) เปรียบเทียบกับลำดับเบสของช้างเอเชีย ช้างแอฟริกาและช้างแมมมอทที่มีรายงานใน GenBank โดยใช้พยูนเป็นสัตว์นอกกลุ่ม (outgroup) ด้วยโปรแกรม MEGA version 3.1 แบบ Bootstrap (Figure 1) พบว่าช้างไทยซึ่งเป็นช้างเอเชียมีความใกล้ชิดกับช้างแมมมอทมากกว่าช้างแอฟริกา

ส่วนการหาลำดับเบสเพื่อจัดกลุ่ม haplotype ของช้าง 11 เชือกจากศูนย์อนุรักษ์ช้างไทย โดยวิเคราะห์ส่วนของ 5′ cytochrome b 250 คู่เบส พบความแตกต่างของลำดับเบส 9 ตำแหน่ง ซึ่งสามารถแบ่งช้างได้ 3 haplotypes A-C (ปรีดา และคณะ, 2546) (Table 2) และเมื่อวิเคราะห์ลำดับเบสส่วน 3′ cytochrome b ถึง left domain ของ control region 927 คู่เบส พบความแตกต่างของลำดับเบส 30 ตำแหน่ง และสามารถจัดช้างได้ 6 haplotypes 1-6 (Table 3)

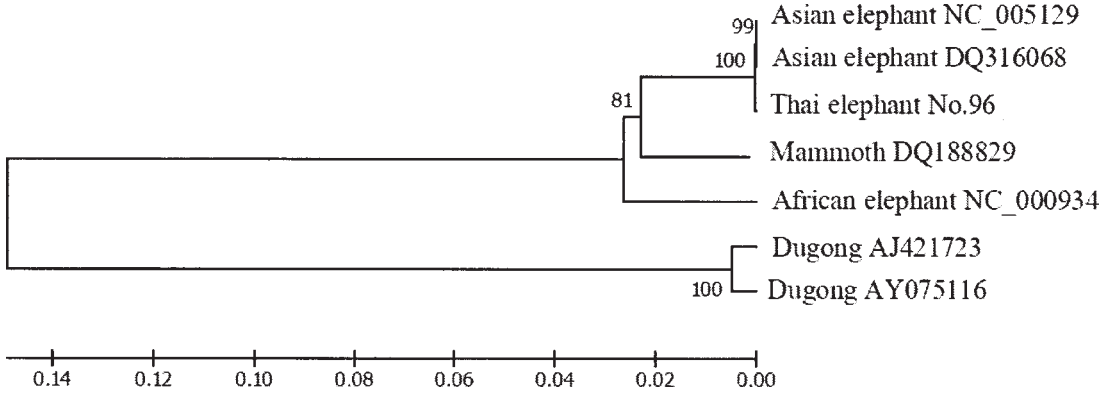

Figure 1 Dendrogram showing genetic relationships between Thai's elephant (No.96), Asian elephant (accession number NC_005129 and DQ316068), African elephant (accession number NC_000934), Mammoth (accession number DQ188829) and Dugong (accession number AJ421723 and AY075116).

Table 1 Primers used for amplification of Thai's elephant mtDNA genome and annealing temperature.

Pair	Primer	Forward primer 5' - 3'		Reverse primer 5' - 3'	bp	Tm (°C)
1	1A Fw	GGGAAACAGCAGTAGTAAATATT	2A Re	TCACTATTTTGCCACATAGATGA	1165	55
2	2A Fw	ATAGAGATAGTACCGCAAGGG	3A Re	TTTTTCTTCTCCGAGGTCACC	1067	55
3	3A Fw	CACGAGGGTTTAACTGTCTCT	4A Re	CTACTGCTCGTAGGGCTCC	1078	55
4	4B Fw	TGAGCCCCTCTTCCAATACC	5B Re	CATTGTCCTGAGTATATTAGGTT	1161	55
5	6A Fw	CAATCCACGATCCACAGARGC	7A Re	AAGATTTTCGTGGGATTGAAGC	1073	55
6	7A Fw	GGTTAAAACAGACCAAGAGCC	8A Re	AATATAGACTTCAGGGTGTCC	1108	55
7	8B Fw	TAACGGATCGCAATCTCAATAC	9A Re	ATGGAAGTGAAGAAGTTCTTCTA	1134	55
8	9B Fw	GTTTCAAGCCAACTCTATAACC	10B Re	TTCGTTCACTTCTTTTTTCAAGG	1037	55
9	11A Fw	GAAGCTATAATAGCACTAACCTT	12B Re	TCAGTAGCTTCCTAGCTCAG	1239	55
10	12B Fw	TGATGACGAGATGTGGTTCGA	13B Re	CATAGTAACGAAGATATTAGGTG	1197	55
11	14A Fw	GAATGAACTAAATATGGTACTTAG	15A Re	GTAGTATCCCATACCCTCCTA	1106	55
12	15B Fw	ATAGTAAAAATACCTCTATATGG	16A Re	ACTTTTATCTGGAGTTGCACCA	966	55
13	16B Fw	GTTTAACCAAAACATTAGGTTGT	ND4r	GTAGTGCTCAGGTGTTGAT	1417	55
14	ND3f	GCTAACACAGCAGCTCTA	Mito-CB2	CTCAGAATGATATTTGTCCTCA	2345	55
15	NADH5	ACAACACCCCAAATAACCATACC	19B Re	GGCTACTGAGGAGTATCCTG	689	55
16	Mito-CB1	TCCAACATCTCAGCATGATGAA	195Re	GTTGKCCTCCRATTCATGTRAG	925	55
17	Mito-CB3	CACGAAACAGGCTCAAACAA	22A Re	CCCACAATTGATGGGCCCGG	1078	62
18	22B Fw	TTAACTACCTACCTCCGAGAAA	23A Re	TTTGGGGTTTGACAGGATAAAAA	883	62
19	23A FW	AGTCAATGCTCGGAGGAGATA	23A Re	TTTGGGGTTTGACAGGATAAAAA	522	55
20	23A Fw	AGTCAATGCTCGGAGGAGATA	1A Re	CCGCGGTTGCTGGCACGA	1051	62

Table 2 Polymorphic sites among haplotypes are shown. The numerical position of each polymorphic site is indicated above each position (accession number NC_005129). A period denotes a matching base with the topmost sequence.

Haplotype	Numerical position of nucleotide sequence									Number
	14342	14393	14414	14417	14468	14489	14496	14502	14513	
A	T	A	T	C	C	T	C	T	T	100, 101, 104, 105
B	.	G	C	T	T	C	T	C	C	96, 97, 98, 99, 103, 106
C	C	G	C	T	C	C	T	C	C	102

Table 3 Polymorphic sites among haplotypes are shown. The numerical position of each polymorphic site is indicated above each position, vertical reading (accession number NC_005129). A period denotes a matching base with the top-most sequence.

Haplotype	Numerical position of nucleotide sequence																															No.	Mito-CB1 - Mito-CB2
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
	4	4	4	4	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5		
	8	9	9	9	9	0	0	0	1	1	1	1	2	3	3	4	5	5	5	5	5	5	5	6	6	6	6	6	7	7			
	4	1	3	4	8	0	3	4	1	8	9	9	5	3	9	2	1	6	7	8	8	9	9	0	1	2	3	8	0	4			
	0	3	9	8	7	5	2	1	5	0	0	7	1	3	6	7	8	5	4	4	5	5	6	5	8	2	4	7	9	5			
BV	A	T	T	T	T	T	C	T	T	T	C	C	T	G	G	T	T	C	A	C	A	C	C	T	T	T	G	G	C	C		96, 98	B1
BH	.	C	C	.	C	.	.	.	C	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	T	G	.	T	.	.	C	A	.	.	.		102	C
BN	.	.	C	.	C	.	.	.	C	.	.	.	.	A	.	.	.	.	G	T	G	.	T	.	.	C	A	A	.	T		97, 99, 103, 106	B2
AE	G	.	.	C	.	C	T	C	.	C	T	.	C	A	A	C	.	T	G	.	.	T	G	C	C	.	.	.	T	T		101, 104	A1
AD1	.	.	.	C	.	C	T	C	.	C	T	.	C	A	A	C	C	T	G	.	.	T	G	C	C	.	.	.	T	T		100	A2
AD2	G	.	.	C	.	C	T	C	.	C	T	.	C	A	A	C	C	T	G	.	.	T	G	C	C	.	.	.	T	T		105	A3

บทวิจารณ์

เทคนิค PCR และการหาลำดับ nucleotide เป็นเทคนิคที่รวดเร็วในการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอเป้าหมาย และสามารถนำมาใช้ศึกษาความสัมพันธ์และความหลากหลายทางพันธุกรรม จากการหาลำดับเบสทั้งหมดของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอในช้างไทย พบว่ามีความยาวทั้งสิ้น 16,847 คู่เบส โดยลำดับเบสของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของช้างเอเชียที่มีรายงานใน GenBank มีความยาว 16,831, 16,902, 16,902 คู่เบส (accession number AJ428946, NC_005129, DQ316068 ตามลำดับ) การศึกษาการเปรียบเทียบดูความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree) พบว่าช้างไทยซึ่งเป็นช้างเอเชียมีความใกล้ชิดกับช้างแมมมอทและช้างแอฟริกาตามลำดับ โดยให้ผลเหมือนการรายงานของ Krause et al. (2006) และ Rogaev et al. (2006) ที่ศึกษาลำดับเบสไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอทั้งหมดของช้างแมมมอท และจากการศึกษาลำดับเบสเพียงบางส่วนของ cytochrome b (Yang et al., 1996) พบว่าแมมมอทมีความใกล้ชิดกับช้างเอเชียมากกว่าช้างแอฟริกา แต่ Noro et al. (1998) ได้ศึกษาในส่วนของ cytochrome b ทั้งหมด (1,137 คู่เบส) และ 12s ribosomal RNA (961 คู่เบส) กลับพบว่าช้างแมมมอทมีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับช้างแอฟริกามากกว่าช้างเอเชีย นอกจากการศึกษาเพื่อดูความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของช้างแล้ว Fernando et al. (2003a) ยังทำการศึกษาในระดับชนิดย่อย (subspecies) โดยศึกษาส่วนของ D-loop และ microsatellite พบว่าช้างที่บอร์เนียว ประเทศอินโดนีเซียน่าจะเป็นชนิดย่อยใหม่ของช้างเอเชียด้วย ในการศึกษาของ Fleischer et al. (2001) ได้ทำการแยกช้างเอเชียและช้างแอฟริกา โดยได้ศึกษาในส่วนของ 3′end cytochrome b, tRNA และ control region และยังจัดช้างเอเชียออกเป็น 2 กลุ่มย่อย (clade A and B)

ส่วนการหาลำดับเบสเพื่อจัดกลุ่ม haplotype ของช้าง 11 เชือก จากศูนย์อนุรักษ์ช้างไทย โดยวิเคราะห์ส่วนของ 5′ cytochrome b 250 คู่เบส พบความแตกต่างของลำดับเบส 9 ตำแหน่ง ซึ่งสามารถแบ่งช้างได้ 3 haplotypes (A-C) (ปรีดา และคณะ, 2546) และเมื่อวิเคราะห์ลำดับเบสส่วน 3′ cytochrome b ถึง left domain ของ control region 927 คู่เบส จะพบความแตกต่างของลำดับเบส 30 ตำแหน่ง และสามารถแบ่งช้างออกได้เป็น 6 haplotypes ในการศึกษาของ Fernando et al. (2000) ได้ทำการศึกษาในบริเวณ left domain ของ control region และจัดกลุ่มช้างเอเชียไว้ 17 haplotypes (A-Q) และ Fernando et al. (2003a) ได้รายงานเพิ่มเป็น 25 haplotype เมื่อนำลำดับเบสในส่วน 3′ cytochrome b ถึง left domain ของ control region ของช้างทั้ง 11 เชือก ไปเปรียบเทียบกับรายงานของ Fernando et al. (2003b) พบว่าช้างทั้ง 11 เชือก จัดอยู่ใน haplotype BV (No. 96, 98), BN (No. 97, 99, 103, 106), AD (No. 100, 105), BH (No. 102) และ AE (No. 101, 104) โดยในกลุ่ม AD การศึกษาครั้งนี้พบว่าที่ลำดับเบส 14840 มีความแตกต่างของเบส ทำให้สามารถแยกออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ AD1 (No.100) และ AD2 (No.105) ดังนั้นการใช้ส่วนของ

3′end cytochrome b ถึง left domain ของ control region มาจัดกลุ่ม (haplotype) จะสามารถจัดกลุ่มของช้างได้ 6 haplotypes ซึ่งมากกว่าการใช้ส่วน 5′end cytochrome b (3 haplotypes) มาจัดกลุ่ม เมื่อทราบลำดับเบสไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอทั้งหมดของช้างไทยแล้วในอนาคตจะสามารถทำการเปรียบเทียบลำดับเบสของช้างไทยในตำแหน่งอื่นๆ เพิ่มเติมจากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ใช้ลำดับเบสบางส่วนของยีน cytochrome b และ control region ได้ ซึ่งอาจทำให้พบ haplotypes ของช้างไทยเพิ่มมากขึ้น ทั้งนี้การพบ haplotypes ของช้างไทยเพิ่มขึ้นจะเป็นประโยชน์ในการวางแผนการผสมพันธุ์ช้างไทยต่อไปในอนาคตได้

เอกสารอ้างอิง

นิกร ทองทิพย์ ศรัณย์ จันทร์สิทธิเวช ทวีโภค อังควาณิช สิทธิเดช มหาสาวังกุล ปิยวรรณ สุธรรมาภินันท์ วุฒิวงศ์ ธีระพันธ์ มังกร ดำยัง พรชัย สัญฐิติเสรี และอนุชัย ภิญโญภูมิมินทร์. 2544. การศึกษาเบื้องต้นถึงลักษณะน้ำเชื้อของช้างเลี้ยงในประเทศไทย. รายงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 39 สาขาสัตวแพทยศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพมหานคร. หน้า 312-315.

ปรีดา เลิศวัชระสารกุล นิกร ทองทิพย์ สุปราณี บุญโนนแต้ วรวิทย์ วัชวัลลคุ สิทธิเดช มหาสาวังกุล ทวีโภค อังควาณิช และศรันย์ จันทร์สิทธิเดช. 2546. ความหลากหลายของรหัส0พันธุกรรมในส่วนยีน cytochrome b ของช้างไทย. วิทยาสารกำแพงแสน 1: 33-39.

มัทนา ศรีกระจ่าง. 2548. เอกสารประกอบการสัมมนาการใช้เทคโนโลยีชีวภาพเพื่อการอนุรักษ์ช้างและสัตว์ป่า. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์วิทยาเขตกำแพงแสน กรุงเทพมหานคร.

Balakrishnan, C.N., Monfort, S.L., Gaur, A., Singh, L. and Sorenson, M.D. 2003. Phylogeography and conservation genetics of Eld's deer (*Cervus eldi*). Mol. Ecol. 12: 1-10.

Chomczynski, P. and Sacchi, N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal. Biochem. 162: 156-159.

Fernando, P., Pfrender, M.E., Encalada, S.E. and Lande, R. 2000. Mitochondrial DNA variation, phylogeography and population structure of the Asian elephant. Heredity. 84: 362-372.

Fernando, P., Vidya, T.N.C., Pyne, J., Stuewe, M., Davison, G., Alfred, R.J., Andau, P., Bosi E., Kilbourn, A. and Melnick, D.J. 2003a. DNA analysis indicates that Asian elephants are native to Borneo and are therefore a high priority for conservation. PLOS biol. 1(1): 110-115.

Fernando, P., Vidya, T.N.C. Rajapakse, C., Dangolla, A. and Melnick, D.J. 2003b. Reliable non-invasive genotyping: fantasy or reality? J. Hered. 94: 115-123.

Fleischer, R.C., Perry, E.A., Muralidharan, K., Stevens, E.E. and Wemmer, C.M. 2001. Phylogeography of the Asian elephant (*Elephas maximus*) based on mitochondrial DNA. Evolution 55(9): 1882-1892.

Greenwood, A.D. and Pääbo, S. 1999. Nuclear insertion sequence of mitochondrial DNA predominate in hair but not in blood of elephants. Mol. Ecol. 8: 133-137.

Kikkawa, Y., Yonekawa, H., Suzuki, H. and Amano, T. 1997. Analysis of genetic diversity of domestic water buffaloes and anoas based on variations in the mitochondrial gene for cytochrome b. Ani. Gen. 28: 195-201.

Krause, J., Dear, P.H., Pollack, J.L., Slatkin, M., Spriggs, H., Barnes, I., Lister, A.M., Ebersberger, I., Pääbo, S. and Hofreiter, M. 2006. Multiplex amplification of the mammoth mitochondrial genome and evolution of Elephantidae. Nature. 724-727.

Noro, M., Masuda, R., Dubrovo, I.A., Yoshida, M.C. and Kato, M. 1998. Molecular phylogenetic inference of the Woolly *mammoth Mammuthus primigenius*, based on complete sequences of mitochondrial cytochrome b and 12S ribosomal RNA genes. J. Mol. Evol. 46: 314-326.

Pang, J., Hoelzel, A.R., Zeng, Z. and Zhang, Y. 2003. Lack of mtDNA control region variation Eld's deer: Consequence of a recent population bottleneck? Conservation genetic. 4: 109-112.

Rogaev, E.I., Moliaka, Y.K., Malyarchuk, B.A., Kondrashov, F.A., Derenko, M.V., Chumakov, I. and Grigorenko, A.P. 2006. Complete mitochondrial genome and phylogeny of Pleistocene Mammoth *Mammuthus primigenius.* PLOS boil. 4(3): 403-410.

Sambrook, K., Fritsch, E.F. and Maniatis T. 1989. Molecular Cloning a Laboratory Manual. 2nd. Cold Spring Habor Laboratory Press, USA. 1549p.

Santiapillai, C. and Jackson, P. 1990. The Asian elephant: An action plan for it concervation. IUCN/SSC Asian elephant specialist group, ICUN, Gland. 79p.

Thomas, M.G., Hagelberg, E., Jones, H.B., Yang, Z. and Lister A.M. 2000. Molecular and morphological evidence on the phylogeny of Elephantidae. Proc. R. Soc. Land. B. 267: 2493-2500.

Vidya, T.N.C., Fernando, P., Melnick, D.J. and Sukumar, R. 2005. Population differentiation within and among Asian elephant (*Elephas maximus*) population in southern India. Nature 94: 71-80.

Yang, H., Golenberg, E.M. and Shosshani, J. 1996. Phylogenetic resolution within the Elephntidae using fossil DNA sequence from the American mastodon (*Mammut americanum*) as an outgroup. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93: 1190-1194.