บทที่ 2
แนวคิด ทฤษฎี และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

แนวคิด ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

ความหมายของสัตว์ป่า

"สัตว์ป่า"ตามพระราชบัญญัติสงวนและคุ้มครองสัตว์ป่า พ.ศ.2535 (2535) หมายถึง สัตว์ทุกชนิดไม่ว่าจะเป็นสัตว์บก สัตว์น้ำ สัตว์ปีก แมลงหรือแมง ซึ่งโดยสภาพธรรมชาติย่อมเกิดและดำรงชีวิตอยู่ในป่าหรือในน้ำ และให้หมายความรวมถึงไข่ของสัตว์ป่าเหล่านั้นทุกชนิดด้วย แต่ไม่หมายความรวมถึงสัตว์พาหนะที่ได้จดทะเบียนทำตั๋วรูปพรรณตามกฎหมายว่าด้วยสัตว์พาหนะและสัตว์พาหนะที่ได้มาจากการสืบพันธุ์ของสัตว์พาหนะดังกล่าว โดยแบ่งสัตว์ป่า ออกเป็น 2 ประเภท ประกอบด้วย

1. สัตว์ป่าสงวน หมายถึง สัตว์ป่าที่หายากตามบัญชีท้ายพระราชบัญญัติสงวนและคุ้มครองสัตว์ป่า พ.ศ. 2535 และตามที่จะกำหนดโดยตราเป็นพระราชกฤษฎีกามีอยู่ 19 ชนิด คือ นกเจ้าฟ้าหญิงสิริธร แรด กระซู่ กูปรีหรือโคไพร ควายป่า ละองหรือละมั่ง สมันหรือเนื้อสมัน เลียงผา กวางผา นกแต้วแล้วท้องดำ นกกระเรียน แมวลายหินอ่อน สมเสร็จ เก้งหม้อ พะยูนหรือหมูน้ำ วาฬบรูด้า วาฬโอมูระ เต่ามะเฟือง และฉลามวาฬ (ปิ่น บุตรี, 2558)

2. สัตว์ป่าคุ้มครอง หมายถึง สัตว์ป่าตามที่กฎกระทรวงกำหนดให้เป็นสัตว์ป่าคุ้มครอง โดยแบ่งเป็นสัตว์ป่าจำพวกสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม 202 ชนิด สัตว์ป่าจำพวกนก 952 ชนิด สัตว์ป่าจำพวกสัตว์เลื้อยคลาน 92 ตัว สัตว์ป่าจำพวกสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก 12 ชนิด สัตว์ป่าจำพวกสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังหรือแมลง 20 ชนิด สัตว์ป่าจำพวกปลา 14 ชนิด และสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังอื่น ๆ 12 ชนิด รวม 1,302 ชนิด (พระราชบัญญัติสงวนและคุ้มครองสัตว์ป่า พ.ศ. 2535, 2535)

ประโยชน์ของสัตว์ป่า

มนุษย์มีความสัมพันธ์กับสัตว์ป่ามาเป็นเวลาช้านาน นับตั้งแต่อดีต มนุษย์ล่าและนำเนื้อสัตว์ป่ามาเป็นอาหาร ใช้ผลิตภัณฑ์จากสัตว์ป่าเป็นเครื่องนุ่งห่ม และยารักษาโรค ตลอดจนจับสัตว์มาฝึกใช้งาน และยิ่งเมื่อมนุษย์มีความเจริญมากขึ้นก็ยิ่งใช้ประโยชน์จากสัตว์ได้กว้างขวางยิ่งขึ้น อาทิเช่น ใช้สัตว์ป่าในการทำสงคราม ใช้ในการแสดงต่าง ๆ ใช้ในการโฆษณาสินค้า ใช้ในการทดลองวิทยาศาสตร์สาขาต่าง ๆ เป็นต้น ดังนั้นจึงเป็นที่ยอมรับกันโดยทั่วไปว่า สัตว์ป่ามีคุณประโยชน์ต่อมนุษย์มากมาย ดังนี้ (ศุภวิทย์ เปี่ยมพงศ์สานต์ และคณะ, 2533; ประเสริฐ คำแสน, 2544)

1. ประโยชน์ด้านเศรษฐกิจ คือ การสร้างรายได้จากสัตว์ป่า เช่น การนำเนื้อสัตว์ป่าไปทำอาหาร การขายสัตว์ป่าเพื่อนำไปเลี้ยง

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

2. ประโยชน์ด้านวิชาการ คือ นำสัตว์ป่ามาเป็นสัตว์ทดลองวิทยาศาสตร์ การแพทย์ หรือนำมาเลี้ยงไว้ในสวนสัตว์ เพื่อเป็นแหล่งให้ความรู้เรื่องการดำรงชีพของสิ่งมีชีวิตในธรรมชาติ

3. ประโยชน์ด้านการรักษาความงามและคุณค่าทางจิตใจ คือ การใช้สัตว์ป่าเป็นสิ่งบันดาลใจให้เกิดความสุข เช่นการฟังเสียงนกร้อง การดูลักษณะและสีสันของสัตว์ป่าแต่ละประเภท

4. ประโยชน์ด้านการพักผ่อนหย่อนใจของมนุษย์ ด้วยการไปดูวิธีการดำรงชีวิตของสัตว์ป่าหรือดูความแปลกของสัตว์ป่าแต่ละชนิด

ปัญหาของทรัพยากรสัตว์ป่า

สัตว์ป่ามีการลดจำนวนลงหรือเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์เกิดจากปัจจัยหลายประการ ได้แก่

1. การทำลายที่อยู่อาศัย การขยายพื้นที่เพาะปลูก พื้นที่อยู่อาศัยเพื่อการดำรงชีพของมนุษย์ได้ทำลายที่อยู่อาศัยและที่ดำรงชีพของสัตว์ป่าไปอย่างไม่รู้ตัว

2. สภาพธรรมชาติ การลดลงหรือสูญพันธุ์ไปตามธรรมชาติของสัตว์ป่า เนื่องจากการปรับตัวของสัตว์ป่าให้เข้ากับการดำรงชีวิตในสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงอยู่ตลอดเวลา สัตว์ป่าชนิดที่ปรับตัวได้ก็จะมีชีวิตรอด หากปรับตัวไม่ได้จะล้มตายไป ทำให้มีจำนวนลดลงและสูญพันธุ์ในที่สุด

3. การล่าโดยตรง หากเป็นการล่าโดยสัตว์ป่าด้วยกันเอง สัตว์ป่าจะไม่ลดลงหรือสูญพันธุ์อย่างรวดเร็ว

4. เนื่องจากสารพิษ เมื่อเกษตรกรใช้สารเคมีในการเพาะปลูก เช่น ยาปราบศัตรูพืช จะทำให้เกิดสารพิษตกค้างในสิ่งแวดล้อม ทำให้สารพิษไปสะสมในสัตว์ป่ามาก หากสารพิษมีจำนวนมากพออาจจะตาย หรือมีปริมาณลดลง และสูญพันธุ์ไป (ศุภวิทย์ เปี่ยมพงศ์สานต์ และคณะ, 2533)

การจัดการและอนุรักษ์สัตว์ป่า

การจัดการและอนุรักษ์สัตว์ป่า คือการเข้าไปจัดการเกี่ยวกับสัตว์ป่า เพื่อให้สัตว์ป่าให้ประโยชน์ต่อสังคมอย่างยั่งยืนและตลอดไป เป็นที่ยอมรับกันแล้วว่าการลดลงของประชากรสัตว์ป่าหลายชนิด รวมทั้งการสูญพันธุ์ของสัตว์ป่ามักจะเกิดขึ้นจากปัจจัยที่สำคัญสองประการคือ การทำลายถิ่นที่อยู่อาศัย และการล่าหรือฆ่าสัตว์โดยไม่มีกฎเกณฑ์ ดังนั้น การจัดการปัญหาที่มีประสิทธิภาพจึงจะต้องหาทางลดการกระทบที่เป็นต้นเหตุ โดยการอนุรักษ์ทรัพยากรสัตว์ป่าโดยมีแนวทางดังนี้ (สุวัฒน์ ควรชม , 2543; ประเสริฐ คำแสน, 2544)

1. การอนุรักษ์แหล่งที่อยู่อาศัย แหล่งน้ำ แหล่งอาหาร ให้อยู่ในสภาพที่ดีเพื่อให้สัตว์ป่าได้อยู่อาศัยอย่างปลอดภัย

สถาบันวิทยบริการ มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี RAMBHAI BARNI RAJABHAT UNIVERSITY

2. การใช้ประโยชน์จากสัตว์ป่า จะต้องหาวิธีที่จะนำเอาสัตว์ป่าต่าง ๆ มาใช้ให้เกิดประโยชน์แก่สังคมในทางที่เหมาะสม

3. การป้องกันและปราบปราม ควบคุมการค้าสัตว์ป่า และออกกฎหมายห้ามล่าสัตว์ป่าเพื่อป้องกันไม่ให้สัตว์ป่าลดจำนวนลงหรือสูญพันธุ์

บทลงโทษแก่ผู้ล่าและผู้ค้าสัตว์ป่า

พระราชบัญญัติสงวนและคุ้มครองสัตว์ป่า พ.ศ. 2535 มีความมุ่งหมายเพื่อรักษาสมดุลของธรรมชาติในด้านสัตว์ป่า และรักษาพันธุ์สัตว์ป่าที่หายาก หรือใกล้จะสูญพันธุ์ เพื่อป้องกันการลักลอบล่าสัตว์ป่าจึงต้องมีกฎหมายควบคุม ป้องกัน และปราบปรามผู้กระทำความผิดโดยมีบทลงโทษดังตัวอย่างต่อไปนี้

มาตรา 10 มีสัตว์ป่าสงวน สัตว์ป่าคุ้มครอง ซากของสัตว์ป่าสงวน หรือสัตว์ป่าคุ้มครองไว้ในครอบครองโดยไม่ได้รับอนุญาต มีโทษจำคุกไม่เกินสี่ปี หรือปรับไม่เกินสี่หมื่นบาท หรือทั้งจำทั้งปรับ

มาตรา 20 ค้าสัตว์ป่าสงวน สัตว์ป่าคุ้มครอง ซากของสัตว์ป่าสงวน หรือสัตว์ป่าคุ้มครอง หรือผลิตภัณฑ์ที่ทำจากซากของสัตว์ป่าโดยไม่ได้รับอนุญาต มีโทษจำคุกไม่เกินสี่ปี หรือปรับไม่เกินสี่หมื่นบาท หรือทั้งจำทั้งปรับ

มาตรา 55 ช่วยซ่อนเร้น ช่วยจำหน่าย ช่วยพาเอาไปเสีย ซื้อ รับจำนำ รับซากของสัตว์ป่าที่ได้มาจากการกระทำความผิดตามกฎหมายอันได้มาโดยมิชอบตามพระราชบัญญัติ (อุดมศักดิ์ สิทธิพงษ์, 2549)

พื้นที่ที่ทำการศึกษา

อำเภอเขาชะเมา จังหวัดระยอง มีอุทยานแห่งชาติที่สำคัญ คือ อุทยานแห่งชาติเขาชะเมา-เขาวง ครอบคลุมพื้นที่ 52,300 ไร่ หรือ 83.68 ตารางกิโลเมตร ในอำเภอแกลง อำเภอเขาชะเมา จังหวัดระยอง และอำเภอแก่งหางแมว จังหวัดจันทบุรี เป็นแหล่งท่องเที่ยวทางภาคตะวันออกของประเทศ มีสภาพเป็นป่าดงดิบที่สมบูรณ์ เป็นแหล่งกำเนิดต้นน้ำลำธารของจังหวัดระยอง มีสัตว์ป่าชุกชุม และมีธรรมชาติที่สวยงาม เช่น น้ำตก หน้าผา ถ้ำ ภูมิประเทศบริเวณเขาชะเมาส่วนใหญ่ประกอบด้วยเทือกเขาสูงชัน เป็นสันเขา พืชพรรณเป็นสังคมของป่าดิบชื้นมีพื้นที่ร้อยละ 80 สังคมป่าดิบเขามีพื้นที่ร้อยละ 10 สังคมป่าดิบแล้งมีพื้นที่ร้อยละ 8 และสังคมป่าเขาหินปูน มีพื้นที่ร้อยละ 2 จากการศึกษาและสำรวจข้อมูลด้านสัตว์ป่าในพื้นที่พบว่ามีจำนวนของสัตว์ป่าไม่น้อยกว่า 137 ชนิด จาก 113 สกุล ใน 70 วงศ์ (ไสว วังหงษา, 2551) แบ่งเป็น 5 ประเภท คือ

1. สัตว์ป่าสะเทินน้ำสะเทินบก มีไม่น้อยกว่า 10 ชนิด จาก 5 สกุล ใน 4 วงศ์ เช่น กบหนอง เขียด ปาด คางคก เป็นต้น

2. สัตว์เลื้อยคลานมีไม่น้อยกว่า 24 ชนิด จาก 20 สกุล ใน 12 วงศ์ เช่น งูเหลือม งูหลาม ตะกวด กิ้งก่า ตุ๊กแกป่า เต่าใบไม้ เป็นต้น

3. นก มีไม่น้อยกว่า 68 ชนิด จาก 58 สกุล ใน 32 วงศ์ เช่น ไก่ฟ้าพญาลอ ไก่ป่า นกแอ่นตาล นกกระแตแต้แว้ด นกปรอดเหลืองหัวจุก เป็นต้น

4. สัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม มีมากกว่า 35 ชนิด เช่น ชะนีมงกุฎช้างป่า กระรอกหลากสี หนูค้างคาว หมูป่า โดยมีสัตว์ใกล้สูญพันธุ์รวมอยู่ 3 ชนิด ได้แก่ ช้างป่า วัวแดง และเสือโคร่ง

5. ปลา 14 ชนิด เช่น ปลาซิวหางแดง ปลาสร้อยหางนก ปลากดเหลือง ปลาหมอช้างเหยียบ เป็นต้น

สารพันธุกรรมหรือดีเอ็นเอ

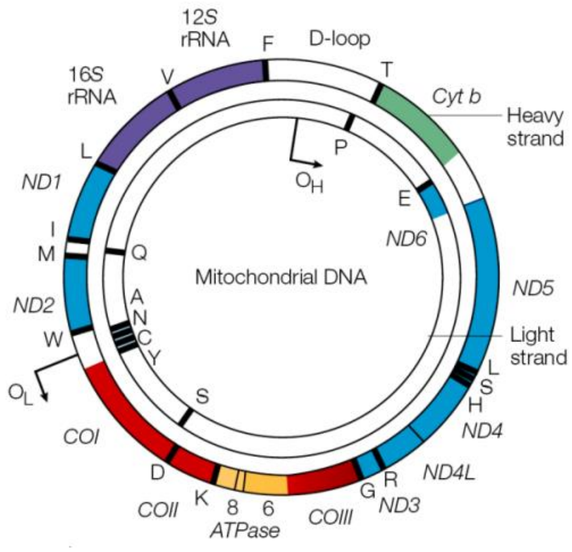
สารพันธุกรรมหรือดีเอ็นเอ (DNA) เป็นสารชีวโมเลกุล ใช้เป็นรหัสสำหรับการสร้างโปรตีนที่จำเป็นสำหรับการดำรงชีวิต สารพันธุกรรมทั้งหมดที่อยู่ภายในเซลล์ (Genome) เป็นข้อมูลทางพันธุกรรม ที่ทำให้สิ่งมีชีวิตนั้นดำรงชีพอยู่ได้อย่างเป็นระบบ โดยหน่วยพื้นฐานทางพันธุกรรมที่ถูกถอดรหัสสำหรับการสร้างโปรตีนเรียกว่า ยีน (Gene)

ดีเอ็นเอ (DNA) หรือกรดดีออกซีไรโบนิวคลีอิก (Deoxyribonucleic acid) เป็นสารประกอบจำพวกกรดนิวคลีอิก (Nucleic acid) พบภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตทุกชนิด ได้แก่ พืช สัตว์ มนุษย์ และแบคทีเรีย ดีเอ็นเอมีรูปร่างลักษณะเป็นเกลียวคู่ (Double helix) โดยมีพอลินิวคลีโอไทด์ (Polynucletide) 2 สาย เรียงตัวขนานกันในทิศทางตรงกันข้าม เข้าคู่และพันเกลียวเวียนขวา ภายในเซลล์ของพืชและสัตว์จะพบดีเอ็นเอได้ 2 แหล่ง คือ ดีเอ็นเอในนิวเคลียส (Nuclear DNA) และดีเอ็นเอที่อยู่ภายนอกนิวเคลียสซึ่งเป็นดีเอ็นเอที่พบในไซโตพลาสซึม โดยพืชมีดีเอ็นเออยู่ในคลอโรพลาสต์ (Chloroplast) และสัตว์มีดีเอ็นเออยู่ในไมโตคอนเดรีย (Mitochondria) ดีเอ็นเอในไซโตพลาสซึมนั้นมีลักษณะเป็นเกลียวคู่และเป็นวงกลมปลายปิด มีกระบวนการจำลองตัวเอง และถ่ายทอดข้อมูลทางพันธุกรรมเป็นอิสระจากกระบวนการของดีเอ็นเอในนิวเคลียส แต่ผลผลิตที่ได้ระหว่างดีเอ็นเอในนิวเคลียสและดีเอ็นเอในไซโตพลาสซึมทำหน้าที่ร่วมกันคือ ทำให้สิ่งมีชีวิตนั้น ๆ สามารถดำรงชีวิตได้อย่างมีประสิทธิภาพและปกติ (ศิวพร อินต๊ะหล่อ , 2555)

ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ (Mitochondrial DNA; mtDNA)

ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ คือ ดีเอ็นเอที่อยู่ในไมโตคอนเดรีย มีลักษณะเป็นวงกลมปลายปิดสายคู่ (Circular Double-Stranded) เป็นดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็ก ซึ่งไมโตคอนเดรียทำหน้าที่เสมือนเป็นโรงงานผลิตพลังงานสำหรับใช้ภายในเซลล์จากกระบวนการหายใจระดับเซลล์ (Cellular respiration) ในเซลล์ของมนุษย์และในสัตว์ส่วนใหญ่ ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอมีความยาวประมาณ 16,568 คู่เบส หรือประมาณร้อยละ 0.001 ของดีเอ็นเอทั้งหมดในเซลล์หนึ่งเซลล์ ที่มีจำนวนคู่เบสทั้งหมดถึง 3 ล้านคู่เบส ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ 1 วง มีทั้งบริเวณที่ทำหน้าที่ในการถอดรหัสยีนที่ทำ

หน้าที่ในกระบวนการหายใจระดับเซลล์ และส่วนที่ไม่มีการถอดรหัส ที่เรียกว่า D-loop หรือ คอนโทรล รีเจียล (Control region) ในส่วนของยีนที่ทำหน้าที่ในการถอดรหัสนั้น สามารถถอดรหัส ได้ทั้งหมด 37 ยีน ในจำนวนนี้มี 13 ยีน ที่สามารถแปลรหัสไปเป็นโปรตีน เช่น ยีนไซโตโครม บี (Cytochrome b) ไซโตโครมออกซิเดส (Cytochrome oxidase) และ เอทีพี ซินเทส (ATP synthase) (ภาพที่ 2.1) (สุทัศน์ ดวงจิตร, 2554)



ภาพที่ 2.1 โครงสร้างของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ
ที่มา: Taylor & Turbbull (2005)

ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอมีคุณสมบัติที่แตกต่างจากนิวเคลียร์ดีเอ็นเอ (Nuclear DNA) หลายประการ ซึ่งในไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ มีความแปรผันสูงกว่านิวเคลียร์ดีเอ็นเอจึงพบความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์ในไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอสูงระหว่างสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกัน ในขณะเดียวกันความผันแปรเหล่านั้นเกิดขึ้นน้อยมากระหว่างสมาชิกของสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกัน เนื่องจากกลไกธรรมชาติในการควบคุมความผันแปรในลำดับเบสส่วนนี้ เพื่อรักษาสภาพและองค์ประกอบของโปรตีนให้คงที่และไม่ให้ส่งผลกระทบใดต่อสิ่งชีวิต คุณสมบัติดังกล่าวนับว่ามีความสำคัญในการนำมาใช้จำแนกสิ่งมีชีวิตต่างชนิดออกจากกันได้อย่างน่าเชื่อถือ นอกจากนี้ ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอมีจำนวนชุดต่อเซลล์มาก ในขณะที่นิวเคลียร์ดีเอ็นเอมีเพียง 2 ชุด (Diploid Cell) ทั้งนี้จำนวนชุดของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ ในแต่ละเซลล์ยังมีความแตกต่างกันด้วย ขึ้นอยู่กับประเภทของเซลล์นั้น ๆ ในเซลล์ที่ต้องการพลังงานมากจะมีไมโตคอนเดรียมาก ส่งผลให้จำนวนไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอมากขึ้นด้วย เป็นสัดส่วน เช่น เซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย จำนวน

ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอมีมากกว่า 100,000 ชุด เซลล์ร่างกายมีประมาณ 200-1,700 ชุด เป็นต้น แต่โดยเฉลี่ยแล้วในเซลล์ หนึ่ง ๆ จะมีจำนวนไมโตคอนเดรียลจำนวนประมาณ 400-500 ชุด ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอมีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมภายนอกมากกว่านิวเคลียร์ดีเอ็นเอ จึงถูกรักษาสภาพได้ดีกว่าและมีอัตราการเสื่อมสภาพน้อยกว่า ทั้งนี้ เนื่องจากโครงสร้างของไมโตคอนเดรียที่เป็นเยื่อหุ้มสองชั้นช่วยในการป้องกันการเสื่อมสภาพของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ (ฐิติกา กิจพิพิธ และภูวดล ธนะเกียรติไกร, 2556)

ยีนไซโตโครม บี เป็นยีนที่อยู่ในโครงสร้างจีโนมของไมโตคอนเดรียล ดีเอ็นเอ มีรหัสในการสร้างรงควัตถุที่มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งอิเล็กตรอนในกระบวนการหายใจระดับเซลล์ ดีเอ็นเอที่อยู่ในส่วนของยีนไซโตโครม บี เป็นดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็ก และพบอยู่ในสัตว์ทุกชนิด แต่จะมีการสร้างโปรตีนที่มีความจำเพาะกับสัตว์แต่ละชนิดเท่านั้น จากคุณสมบัติดังกล่าว ทำให้มีการนำดีเอ็นเอของยีนไซโตโครม บี มาใช้ในการตรวจพิสูจน์เพื่อระบุชนิดในสัตว์ (Species Identification) (มีณญา บุญเจริญ, 2555)

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction; PCR)

ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสหรือเทคนิค PCR เป็นเทคนิคสำหรับเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมหรือดีเอ็นเอในหลอดทดลอง ให้มีปริมาณมากเป็นล้านๆเท่าในระยะเวลาอันรวดเร็ว โดยอาศัยหลักการจำลองโมเลกุลดีเอ็นเอ (DNA Replication) ซึ่งเป็นการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอสายใหม่จากดีเอ็นเอต้นแบบในหลอดทดลอง

สารเคมีที่เกี่ยวข้องในปฏิกิริยา PCR

สารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR มีดังต่อไปนี้ (มีณญา บุญเจริญ, 2555)

1. Deoxynucleotides (dNTPs) เป็นนิวคลีโอไทด์ ซึ่งเป็นหน่วยย่อยสำหรับนำไปสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่

2. DNA polymerase เป็นเอนไซม์สำหรับสังเคราะห์ดีเอ็นเอ โดยช่วยเร่งปฏิกิริยาการเชื่อมต่อนิวคลีโอไทด์ใหม่เข้ากับไพรเมอร์

3. Primer เป็นดีเอ็นเอเริ่มต้นสายสั้น ๆ ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบของการสังเคราะห์ ในการทำ PCR จึงต้องทราบลำดับเบสของดีเอ็นเอที่ต้องการจะเพิ่มจำนวนเพื่อใช้ในการสร้างไพรเมอร์จำเพาะ

4. PCR buffer เป็นสารละลายที่ควบคุมสภาวะของการทำปฏิกิริยาให้เหมาะสม เช่น pH และเกลือต่าง ๆ ซึ่งจะต้องมีอนุมูลแมกนีเซียม (Mg^{2+}) อยู่ด้วย

5. Template คือ ดีเอ็นเอต้นแบบที่ต้องการเพิ่มปริมาณ (ศิริพร วงศ์ดินดำ, 2549)

หลักการพื้นฐานของ PCR คล้ายกับการจำลองโมเลกุลของดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นในเซลล์ โดยใช้ดีเอ็นเอทั้งสองสายของโมเลกุลที่เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่ ซึ่งเร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ DNA polymerase ซึ่งปฏิกิริยา PCR ใน 1 รอบจะประกอบไปด้วย 3 ขั้นตอน ดังนี้

1. Denaturation เป็นขั้นตอนการทำให้ดีเอ็นเอสายคู่แยกเป็นสายเดี่ยว โดยอาศัยความร้อนที่อุณหภูมิสูงประมาณ 94-95 องศาเซลเซียส

2. Annealing เป็นขั้นตอนที่ลดอุณหภูมิลงมาที่ประมาณ 45-60 องศาเซลเซียส เพื่อให้ Primer สามารถเข้าเกาะกับดีเอ็นเอต้นแบบสายเดี่ยวตรงบริเวณลำดับเบสคู่สม

3. Extension เป็นขั้นตอนการขยายสายดีเอ็นเอ โดยการต่อนิวคลีโอไทด์เข้าที่ปลาย 3’ ของ Primer แล้วมีการขยายสายดีเอ็นเอสายใหม่จากทิศทาง 5’ ไป 3’ โดยอาศัยเอนไซม์ DNA polymerase ซึ่งปกติใช้อุณหภูมิอยู่ในช่วง 70-75 องศาเซลเซียส (ปรีชา ประเทพา, 2543)

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การลักลอบล่าและค้าสัตว์ป่าหรือผลิตภัณฑ์จากชิ้นส่วนของสัตว์ป่าเป็นปัญหาที่พบทั่วโลก จนสัตว์หลายชนิดมีปริมาณลดลงอย่างต่อเนื่องและเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ ในปัจจุบัน นิติวิทยาศาสตร์สัตว์ป่าได้เข้ามามีบทบาทสำคัญในการตรวจพิสูจน์ชนิดของตัวอย่างวัตถุพยานที่ได้จากการยึดหรือจับกุมโดยใช้ข้อมูลทางพันธุกรรม เพื่อสามารถใช้เป็นหลักฐานประกอบการพิจารณาการใช้กฎหมายลงโทษผู้กระทำความผิดเกี่ยวกับสัตว์ป่าได้ ต่อไปนี้เป็นตัวอย่างรายงานการวิจัยการใช้ข้อมูลทางพันธุกรรมเพื่อตรวจพิสูจน์ชนิดของสัตว์ป่า

กณิตา อุ่ยถาวร และคณะ (2554) ศึกษาการตรวจสอบทางพันธุกรรมเพื่อใช้จำแนกเพศของเสือโคร่ง โดยมีวัตถุประสงค์ในการจำแนกเพศของลูกเสือโคร่งที่ไม่สามารถระบุเพศจากลักษณะภายนอกได้จำนวน 2 ตัวอย่าง คือ ตัวอย่าง Tigb1 และ Tigb2 โดยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของยีนที่อยู่บนโครโมโซมเพศ ได้แก่ยีน SRY ซึ่งพบอยู่บนโครโมโซมวาย และยีนในตำแหน่ง PTZF คือ ยีน ZFX และ ZFY ซึ่งพบอยู่บนโครโมโซมเอ็กซ์และวาย ตามลำดับ ผลจากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าตัวอย่างลูกเสือโคร่ง Tigb1 เป็นเสือโคร่งเพศเมีย เนื่องจากไม่พบ แถบดีเอ็นเอจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของยีน SRY และจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในตำแหน่ง PTZF พบว่ามีจีโนไทป์เป็นแบบโฮโมไซโกต (Homozygous genotype) ในขณะที่ตัวอย่างลูกเสือโคร่ง Tigb2 พบว่าเป็นเสือโคร่งเพศผู้ทั้งนี้เนื่องจากพบแถบดีเอ็นเอจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของยีน SRY และ จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในตำแหน่ง PTZF พบว่ามีจีโนไทป์เป็นแบบเฮตเทอโรไซโกต (Heterozygous genotype) วิธีการที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการจำแนกเพศของสัตว์ป่าชนิดอื่น ๆ ได้

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

กณิตา อุ่ยถาวร และคณะ (2555) ศึกษาการจำแนกชนิดของตัวอย่างนอแรดที่ไม่ทราบชนิด โดยการศึกษาข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีนไซโตโครม บี ผลจากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีนในไซโตโครม บี ของตัวอย่างนอแรดกับฐานข้อมูลนิวคลีโอไทด์สากล (GenBank) พบว่าข้อมูลพันธุกรรมของตัวอย่างนอแรดที่ใช้ในการศึกษา มีความคล้ายคลึงกับข้อมูลทางพันธุกรรมของแรดขาว (*Ceratotherium simum*) มากที่สุด และผลจากการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยการสร้าง Phylogenetic tree ด้วยวิธี Neighbor-joining (NJ) พบว่าตัวอย่างนอแรดนั้นรวมเข้ากับเป็นกลุ่มเดียวกับแรดขาว ด้วยค่าระดับความเชื่อมั่นถึง 99% โดยสรุปได้ว่าตัวอย่างนอแรดนี้ เป็นนอของแรดขาวที่มีถิ่นอาศัยในทวีปแอฟริกา

กณิตา อุ่ยถาวร และคณะ (2555) ศึกษาการจำแนกสายพันธุ์ของเสือโคร่งในกรงเลี้ยง โดยนำลูกเสือโคร่ง 3 ตัว มาพิสูจน์ความสัมพันธ์ความเป็นแม่-ลูก จากตัวอย่างเลือดของลูกเสือโคร่ง 2 ตัว และตัวอย่างมูลจากเสือโคร่งเพศเมียที่อ้างว่าเป็นแม่ 1 ตัวโดยการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนบนไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ คือ ยีนไซโตโครม บี และ NADH dehydrogenase subunit 2 (ND2) นำรหัสพันธุกรรมของตัวอย่างไปเปรียบเทียบกับข้อมูลพันธุกรรมของเสือโคร่ง 6 สายพันธุ์ ด้วยวิธี Blastn และสร้าง Phylogenetic tree ด้วยวิธี Neighbor-joining (NJ) ผลการตรวจพิสูจน์พบว่า ลูกเสือโคร่ง 2 ตัว เป็นเสือโคร่งสายพันธุ์เบงกอล (*Panthera tigris tigris*) และเสือโคร่งเพศเมียที่อ้างว่าเป็นแม่เป็นสายพันธุ์อินโดไชนิส (*Panthera tigris corbetti*) สรุปได้ว่า ลูกเสือโคร่งทั้ง 2 ตัว และเสือเพศเมียที่อ้างว่าเป็นแม่ไม่มีความสัมพันธ์เป็นแม่ลูกกัน

ฐิติกา กิจพิพิธ และภูวดล ธนะเกียรติไกร (2556) รายงานว่างานนิติวิทยาศาสตร์มีความสำคัญในการบังคับใช้กฎหมายหรืออนุสัญญาคุ้มครองสัตว์ป่า ทั้งในประเทศและระหว่างประเทศ โดยนำหลักฐานทางวิทยาศาสตร์มาใช้ประโยชน์ นิติวิทยาศาสตร์สัตว์ป่าส่วนใหญ่เป็นการระบุชนิดของสัตว์ (Species Identification) จากชิ้นส่วนที่ได้จากการตรวจยึด แต่ชิ้นส่วนของสัตว์ป่าอาจมีลักษณะเสื่อมสภาพหรือผ่านการแปรรูปด้วยสารเคมีเพื่อการค้าจึงไม่สามารถระบุชนิดของสิ่งมีชีวิต จากลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้ การตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอจึงเป็นเครื่องมือสำคัญในงานนิติวิทยาศาสตร์ที่พิสูจน์ให้เห็นว่าข้อมูลทางพันธุกรรมนั้นเป็นเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพในการนำมาใช้จัดจำแนกชนิดของสิ่งมีชีวิตและสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในงานนิติวิทยาศาสตร์สัตว์ป่าได้อย่างมีประสิทธิภาพ

หน่วยปฏิบัติการนิติวิทยาศาสตร์สัตว์ป่า (2554) กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพันธุ์พืช ได้ดำเนินการตรวจสอบตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ไม่ทราบชนิด ที่ตรวจยึดจากร้านอาหารป่าแห่งหนึ่งบริเวณบ้านหนองเสม็ด อำเภอโนนดินแดง จังหวัดบุรีรัมย์ เพื่อมาตรวจพิสูจน์จำนวน 1 ตัวอย่าง โดยใช้ลำดับ

นิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีนไซโตโครม บี ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 495 คู่เบส ผลจากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีอยู่ในฐานข้อมูล Genbank โดยใช้โปรแกรม Blastn พบว่าตัวอย่างชิ้นเนื้อ มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายกับหมูป่า (*Sus scrofa*) และผลจาการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดย การสร้าง Phylogenetic tree พบว่าตัวอย่างชิ้นเนื้อมีความเหมือนกับหมูป่า (*Sus scrofa*) และรวมเข้าเป็นกลุ่มเดียวกันด้วยระดับความเชื่อมั่น 99%

Tsai และคณะ (2007) ได้เข้าร่วมในการตรวจสอบวัตถุพยาน ที่ได้จากคดีการกระทำความผิดเกี่ยวกับสัตว์ป่าสงวน ประจำปี 2006 ถึง 2007 ของกระทรวงการเกษตร วัตถุพยานจำนวน 5 ชิ้น ประกอบด้วย ขนสัตว์จำนวน 2 ชิ้น อวัยวะเพศของสัตว์เพศผู้ อัณฑะ และชิ้นเนื้อของสัตว์อย่างละ 1 ชิ้น การตรวจสอบครั้งนี้ผู้ตรวจสอบได้ใช้เทคนิค Nested PCR ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอรวมทั้งใช้ไพรเมอร์ในส่วน ของยีนไซโตโครม บี ที่สามารถใช้ระบุชนิดสัตว์ จากการตรวจสอบวัตถุพยานแล้วพบว่า ขนสัตว์ทั้ง 2 ชิ้น เป็นขนของแมว และอวัยวะเพศของสัตว์เพศผู้ อัณฑะ และชิ้นเนื้อของสัตว์ อย่างละ 1 ชิ้นนั้นเป็นของวัว โดยการตรวจสอบวัตถุพยาน ในครั้งนี้มีความแม่นยำไม่ต่ำกว่า 99.7% จากผลดังกล่าวสามารถใช้เป็นหลักฐานยืนยันการกระทำความผิดและใช้ดำเนินคดีกับผู้กระทำความผิดในคดีเกี่ยวกับการลักลอบล่าสัตว์ป่าหรือค้าสัตว์ผิด กฎหมายได้

Jun และคณะ (2011) รายงานผลการตรวจพิสูจน์ทางด้านนิติวิทยาศาสตร์สัตว์ป่า 2 กรณีศึกษาในประเทศเกาหลีใต้ โดยกรณีแรกเป็นการตรวจพิสูจน์ชนิดของขนสัตว์ที่คาดว่าจะเป็นหมีดำและตัวอย่างในอีกกรณีหนึ่งเป็นตัวอย่างหนังของสัตว์ที่คาดว่าอยู่ในวงศ์เสือ โดยวิเคราะห์รหัสพันธุกรรมของยีนไซโตโครม บี ยีนไซโตโครม ออกซิเดส I (COI) และส่วนของคอนโทรล รีเจียนในไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ ผลการตรวจพิสูจน์ทางพันธุกรรมพบว่า ตัวอย่างของกรณีแรกเป็นตัวอย่างเส้นขนของหมีดำจากฟาร์มที่ถูกนำมาเลี้ยง กรณีที่สองมีที่มาจากหนังของสัตว์ประเภทสุนัข การศึกษาในครั้งนี้พิสูจน์ให้เห็นว่าข้อมูลทางพันธุกรรมนั้นเป็นเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพในการนำมาใช้จัดจำแนกชนิดของสิ่งมีชีวิตและสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในงานนิติวิทยาศาสตร์สัตว์ป่าได้อย่างมีประสิทธิภาพ

Dubey, Meganathan และ Haque (2011) ศึกษาการระบุชนิดของงูที่ใกล้สูญพันธุ์บางชนิดในประเทศอินเดียโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีนไซโตโครมออกซิเดส I (COI) ในรูปของ DNA mini-barcoding ซึ่งออกแบบชุดไพรเมอร์จำนวน 2 ชุด ในการเพิ่มปริมาณลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ที่มีความยาว 175 และ 245 คู่เบส ผลจากการเปรียบเทียบรหัสพันธุกรรมของตัวอย่างกับรหัสพันธุกรรมในฐานข้อมูลพันธุกรรม GenBank และ BOLD พบว่ามีค่าความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมอยู่ในช่วง 98-100% ซึ่งเป็นค่าที่ยอมรับได้นำมาใช้เป็นเกณฑ์เพื่อการระบุชนิดของสิ่งมีชีวิต

การศึกษาในครั้งนี้พิสูจน์ให้เห็นว่าข้อมูล DNA mini-barcoding เป็นเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพในการนำมาใช้จำแนกชนิดของงูในประเทศอินเดีย และสามารถที่จะนำข้อมูลพันธุกรรมนี้ไปตรวจพิสูจน์ชนิดของตัวอย่างที่เป็นผลิตภัณฑ์จากงูได้

Ciavaglia และคณะ (2015) ได้ดำเนินการตรวจพิสูจน์ชนิดของสัตว์ในวงศ์งูเหลือม (Pythons) โดยมีวัตถุประสงค์ในการพัฒนาคู่ไพรเมอร์ที่จะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของยีนไซโตโครม บี ในไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ เพื่อใช้ข้อมูลทางพันธุกรรมในการระบุชนิดและจัดจำแนกชนิดของงู ผลการตรวจพิสูจน์พบว่า ไพรเมอร์ที่ถูกพัฒนาขึ้นมานั้นมีประสิทธิภาพ โดยมีความจำเพาะกับตัวอย่างที่เป็นงูในวงศ์งูเหลือม และรหัสพันธุกรรมในส่วนของยีนดังกล่าว สามารถนำมาใช้ระบุชนิดของงูในวงศ์นี้ได้ คือสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของยีนไซโตโครม บี ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 377 คู่เบส

RAMBHAI BARNI RAJABHAT UNIVERSITY
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี