

## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

#### ผลของการสกัดดีเอ็นเอ

จากการตัวอย่างนำชิ้นส่วน ชิ้นเนื้อ หรืออวัยวะของสัตว์ที่คาดว่าจะป็นสัตว์ป่า ที่ขายในตลาด 3 แห่ง และจากผู้ค้าเร่ จำนวน 19 ตัวอย่าง ที่คาดว่าจะป็นสัตว์ป่า ได้แก่ กระจง (รหัส WL-01) กระเล็น (รหัส WL-02, WL-11) กระรอก (รหัส WL-03, WL-05, WL-09, WL-15) กวาง (รหัส WL-04) เลียงผา (รหัส WL-06) เต่า (รหัส WL-07) เก้ง (รหัส WL-08, WL-10) เม่น (รหัส WL-12) อีเห็น (รหัส WL-13) พังพอน (รหัส WL-14) ลิง (รหัส WL-16) หมูป่า (รหัส WL-17, WL-19) และ อ้น (WL-18) มาสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป FavorPrep™ Tissue Genomic DNA Extraction Kit (Favorgen, Taiwan) และตรวจสอบผลของการสกัดดีเอ็นเอ ด้วยวิธี Agarose Gel Electrophoresis พบว่าสามารถสกัดดีเอ็นเอได้ทั้งหมด 19 ตัวอย่าง (ตารางที่ 4.1) โดยดีเอ็นเอที่สกัดได้ พบว่ามีคุณภาพดี มีแถบดีเอ็นเอชัดเจน แต่พบว่าปนเปื้อนด้วยโปรตีนและอาร์เอ็นเอ เล็กน้อย (ไม่แสดงผล)

ตารางที่ 4.1 ผลการสกัดดีเอ็นเอ การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR และผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (Sequencing)

รหัส ตัวอย่าง	สัตว์ที่คาดว่าจะป็น	ผลการทดลอง		
		สกัด DNA	PCR	Sequencing
WL- 01	กระจง	✓	✓	✓
WL- 02	กระเล็น	✓	✓	✓
WL- 03	กระรอก	✓	✓	✓
WL- 04	กวาง	✓	✓	✓
WL- 05	กระรอก	✓	✓	✓
WL- 06	เลียงผา	✓	✓	✓
WL- 07	เต่า	✓	✓	✓
WL- 08	เก้ง	✓	✓	✓

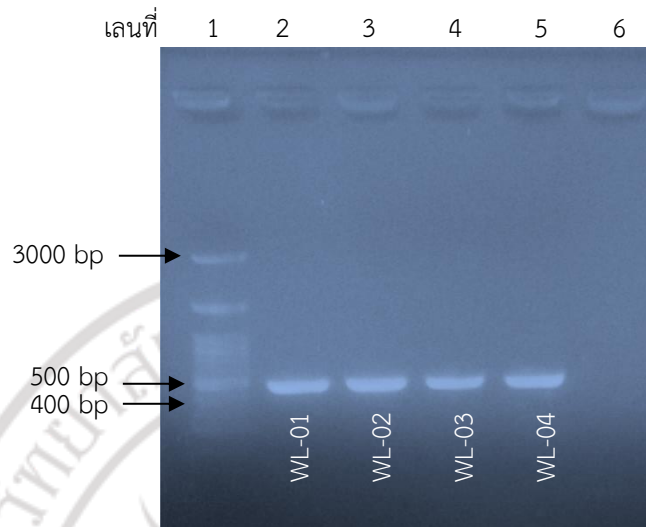
ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

รหัส ตัวอย่าง	สัตว์ที่คาดว่าจะเป็น	ผลการทดลอง		
		สกัด DNA	PCR	Sequencing
WL- 09	กระรอก	√	√	√
WL- 10	แก้ง	√	√	√
WL- 11	กระเล็น	√	√	√
WL- 12	เม่น	√	√	√
WL- 13	อีเห็น	√	√	√
WL- 14	พังพอน	√	√	√
WL- 15	กระรอก	√	√	√
WL-16	ลิง	√	√	√
WL-17	หมูป่า	√	√	√
WL-18	อื่น	√	√	√
WL-19	หมูป่า	√	√	√

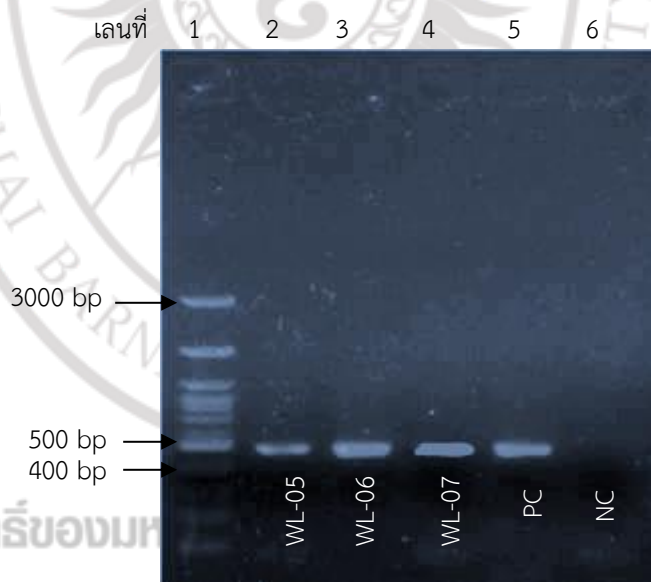
หมายเหตุ: เครื่องหมาย √ หมายถึง ได้ผลการทดลอง

#### ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของยีนไซโตโครม บี ด้วยเทคนิค PCR

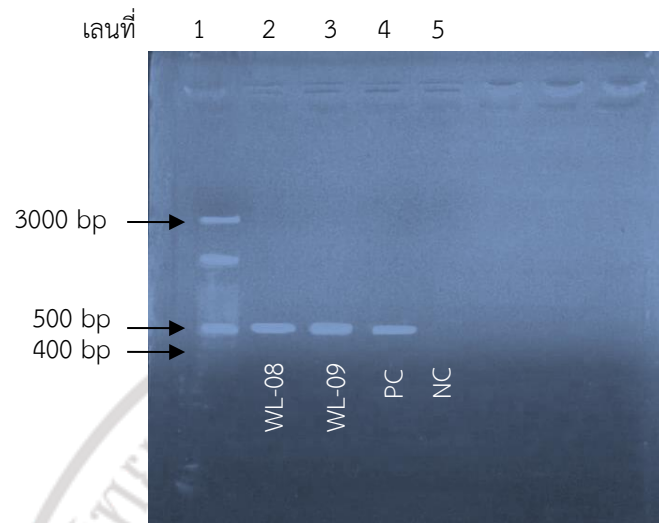
จากขั้นตอนการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยเทคนิค PCR แล้ววิเคราะห์ผล PCR ด้วยเทคนิค Agarose Gel Electrophoresis โดยใช้ Agarose gel ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ และ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder (biotechrabbit GmbH, Germany) เป็นตัวเปรียบเทียบ พบว่าตัวอย่างทั้งหมดจำนวน 19 ตัวอย่าง ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 500 bp ตัวอย่างแสดง ดังภาพที่ 4.1- 4.5)



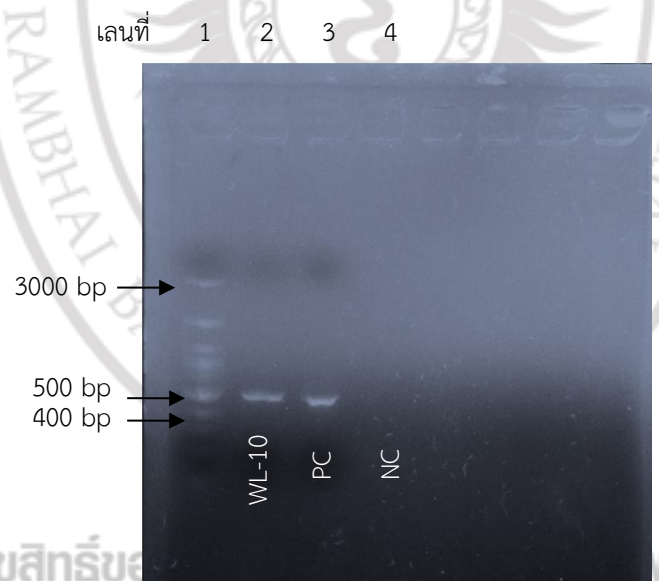
ภาพที่ 4.1 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR และตรวจสอบผลด้วยวิธี Agarose Gel Electrophoresis ของตัวอย่าง WL-01, WL-02, WL-03 และ WL-04 เลขที่ 1: ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder เลขที่ 2: WL-01 กระจง เลขที่ 3: WL-02 กระเส้น เลขที่ 4: WL-03 กระรอก เลขที่ 5: WL-04 กวาง



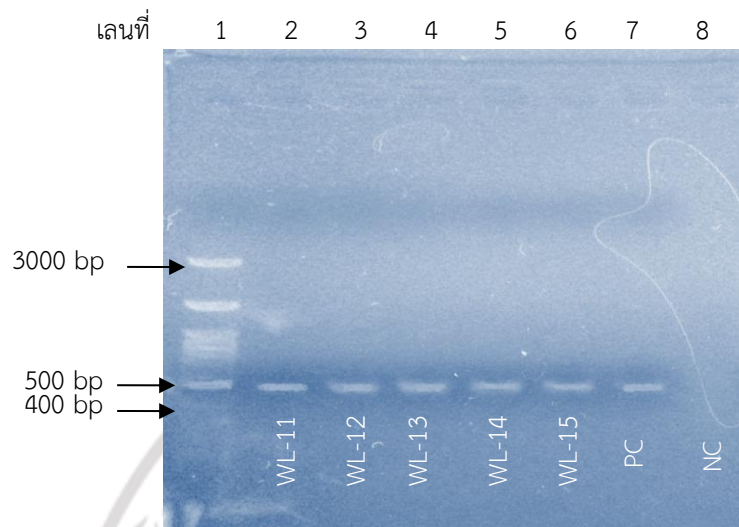
ภาพที่ 4.2 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR และตรวจสอบผลด้วยวิธี Agarose Gel Electrophoresis ของตัวอย่าง WL-05, WL-06 และ WL-07 เลขที่ 1: ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder เลขที่ 2: WL-05 กระรอก เลขที่ 3: WL-06 เลียงผา เลขที่ 4: WL-07 เต่า เลขที่ 5: PC (Positive control) (WL-08) เลขที่ 6: NC (Negative control)



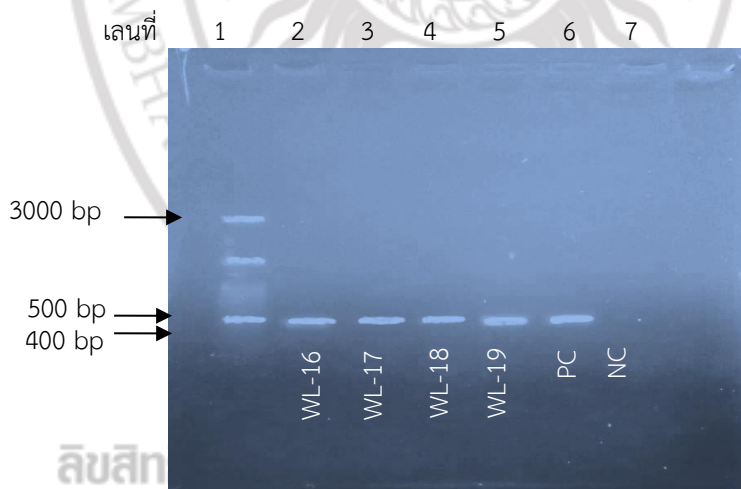
**ภาพที่ 4.3** ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR และตรวจสอบผลด้วยวิธี Agarose Gel Electrophoresis ของตัวอย่าง WL-08 และ WL-09 เลขที่ 1: ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder เลขที่ 2: WL-08 เก้ง เลขที่ 3: WL-09 กระรอก เลขที่ 4: PC (Positive control) (WL- 02) เลขที่ 5: NC (Negative control)



**ภาพที่ 4.4** ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR และตรวจสอบผลด้วยวิธี Agarose Gel Electrophoresis ของตัวอย่าง WL-10 เลขที่ 1: ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder เลขที่ 2: WL-10 เก้ง เลขที่ 3: PC (Positive control) (WL- 08) เลขที่ 4: NC (Negative control)



**ภาพที่ 4.5** ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR และตรวจสอบผลด้วยวิธี Agarose Gel Electrophoresis ของตัวอย่าง WL-11, WL-12, WL-13, WL-14 และ WL 15 เลนที่ 1: ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder เลนที่ 2: WL-11 กระเล็น เลนที่ 3: WL-12 เม่น เลนที่ 4: WL-13 อีเห็น เลนที่ 5: WL-14 พังพอน เลนที่ 6: WL-15 กระรอก เลนที่ 7: PC (Positive control) (WL- 08) เลนที่ 8: NC (Negative control)



**ภาพที่ 4.6** ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR และตรวจสอบผลด้วยวิธี Agarose Gel Electrophoresis ของตัวอย่าง WL-16, WL-17, WL-18 และ WL-19 เลนที่ 1: ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder เลนที่ 2: WL-16 ลิง เลนที่ 3: WL-17 หมูป่า เลนที่ 4: WL-18 อ้น เลนที่ 5: WL-19 หมูป่า เลนที่ 6: PC (Positive control) (WL- 08) เลนที่ 7: NC (Negative control)



### ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไซโตโครม บี

ภายหลังจากการวิเคราะห์ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR และพบว่าตัวอย่าง ทั้ง 19 ตัวอย่าง ที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 500 bp ดังแสดงผลในข้อ 4.2 นำตัวอย่าง ทั้งหมดไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ซึ่งได้ผลลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้ง 15 ตัวอย่าง (ภาคผนวก) โดยมีความ ยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์อยู่ในช่วง 407-490 bp (ตารางที่ 4.2)

ตารางที่ 4.2 ความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ (bp) ในแต่ละตัวอย่าง

รหัสตัวอย่าง	สัตว์ที่คาดว่าจะเป็น / ลักษณะของ ตัวอย่าง	ความยาวลำดับ นิวคลีโอไทด์ของยีนไซโตโครม บี (คู่เบส)
WL-01	กระจง / ซิ่นเนื้อ	467
WL-02	กระเล็น / ซิ่นเนื้อ	459
WL-03	กระรอก / ซิ่นเนื้อ	457
WL-04	กวาง / ซิ่นเนื้อ	415
WL-05	กระรอก / ซิ่นส่วนขา	462
WL-06	เสียงผา / ซิ่นเนื้อ	460
WL-07	เต่า / ซิ่นเนื้อ	490
WL-08	แก้ง / ซิ่นเนื้อ	460
WL-09	กระรอก / ซิ่นเนื้อ	487
WL-10	แก้ง / ซิ่นเนื้อ	463
WL-11	กระเล็น / ซิ่นเนื้อ	461
WL-12	เม่น / ซิ่นเนื้อ	466
WL-13	อีเห็น / ซิ่นเนื้อ	458
WL-14	พังพอน / ซิ่นเนื้อ	407
WL-15	กระรอก / ซิ่นเนื้อ	413
WL-16	ลิง / ซิ่นเนื้อ	477
WL-17	หมูป่า / ซิ่นเนื้อ	466
WL-18	อ้น / ซิ่นเนื้อ	473
WL-19	หมูป่า / ซิ่นเนื้อ	462

ผลจากการเปรียบเทียบความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไซโตโครม บี ของตัวอย่างที่คาดว่าจะเป็นสัตว์ป่าทั้ง 19 ตัวอย่าง กับสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ ในฐานข้อมูลพันธุกรรมสากล GenBank เพื่อระบุชนิด พบว่ามีตัวอย่างจำนวน 17 ตัวอย่าง ที่ระบุได้ว่าเป็นสัตว์ป่า โดยมีค่าความคล้ายคลึงทางพันธุกรรม (% Similarity) อยู่ในช่วง 87-100% (ตารางที่ 4.3) โดยพบว่าเป็นสัตว์ในกลุ่มสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม 16 ตัวอย่าง และเป็นสัตว์ในวงศ์กระรอก (Sciuridae) มากที่สุด มี 6 ตัวอย่าง (ตัวอย่าง WL-02, WL-03, WL-05, WL-09, WL-11 และ WL-15) ซึ่งผลการตรวจสอบรหัสพันธุกรรมพบว่ามีค่าความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมกับกระรอก *Dremomys pernyi* พญากระรอกดำ กระรอกสวน กระรอกหลากสี และกระรอกบินเล็กแก้มขาว ตามลำดับ สัตว์วงศ์กวาง (Cervidae) มี 3 ตัวอย่าง (ตัวอย่าง WL-04, WL-08 และ WL-10) ระบุชนิดได้เป็นกวางป่า (WL-04 และ WL-10) และแก้งธรรมดา ตามลำดับ ส่วนอีก 7 ตัวอย่าง (ตัวอย่าง WL-01, WL-06, WL-12, WL-13, WL-14, WL-16 และ WL-18) อยู่ในวงศ์กระเจง Tragulidae, วงศ์วัวและควาย Bovidae, วงศ์เม่น Hystricidae, วงศ์ชะมดและอีเห็น Viverridae, วงศ์พังพอน Herpestidae, วงศ์ลิง Cercopithecidae และวงศ์อื่น Spalacidae มีอย่างละ 1 ตัวอย่าง โดยมีความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมกับกระเจงเล็ก เลียงผา เม่นใหญ่ อีเห็นข้างลาย พังพอนเล็ก ลิงมะแคคหางสิงโต และอ้นกลาง ตามลำดับ และพบว่ามีสัตว์ในกลุ่มสัตว์เลื้อยคลาน 1 ตัวอย่าง (รหัส WL-07) อยู่ในวงศ์ Testudinidae คือ เต่าเหลือง (*Indotestudo elongata*)

**ตารางที่ 4.3** ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไซโตโครม บี ของตัวอย่างที่คาดว่าจะเป็นสัตว์ป่าจำนวน 19 ตัวอย่าง กับสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ ในฐานข้อมูลพันธุกรรมสากล GenBank

รหัสตัวอย่าง	ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูลพันธุกรรมสากล GenBank			
	ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อไทย	ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรม (% similarity)	GenBank accession number
WL-01	<i>Tragulus kanchil</i>	กระเจงเล็ก	95%	JN632709
WL-02	<i>Dremomys pernyi</i>	-	87%	KP708711
WL-03	<i>Ratufa bicolor</i>	พญากระรอกดำ	90%	KF575124
WL-04	<i>Rusa unicolor</i>	กวางป่า	100%	MF177005
WL-05	<i>Callosciurus erythraeus</i>	กระรอกสวน	95%	KY117538
WL-06	<i>Capricornis sumatraensis</i>	เลียงผา	100%	FJ207534
WL-07	<i>Indotestudo elongata</i>	เต่าเหลือง	99%	DQ080043
WL-08	<i>Muntiacus muntjak</i>	แก้งธรรมดา	99%	KY117560

## ตารางที่ 4.3 (ต่อ)

รหัสตัวอย่าง	ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูลพันธุกรรมสากล GenBank			
	ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อไทย	ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรม (% similarity)	GenBank accession number
WL-09	<i>Callosciurus finlaysonii</i>	กระรอกหลากสี	94%	KY117540
WL-10	<i>Rusa unicolor</i>	กวางป่า	99%	MF177002
WL-11	<i>Dremomys pernyi</i>	-	88%	KP708711
WL-12	<i>Hystrix brachyurus</i>	เม่นใหญ่	97%	JQ991599
WL-13	<i>Paradoxurus hermaphroditus</i>	อีเห็นข้างลาย	99%	FJ881676
WL-14	<i>Herpestes javanicus</i>	พังพอนเล็ก	100%	DQ519059
WL-15	<i>Hylopetes phayrei</i>	กระรอกบินเล็ก แก้มขาว	96%	AB126252
WL-16	<i>Macaca silenus</i>	ลิงมะแคคหางสิงโต	95%	KM679363
WL-17	<i>Sus scrofa</i>	หมู	99%	EF545585
WL-18	<i>Rhizomys pruinosus</i>	อ้นกลาง	93%	KC789518
WL-19	<i>Sus scrofa</i>	หมู	99%	EF545585

หมายเหตุ : เครื่องหมาย - หมายถึง ไม่พบชื่อไทย

ตัวอย่างรหัส WL-17 และ WL-19 ได้ผลจากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีนไซโตโครม บี เป็นหมู (*Sus scrofa*) แต่ยังไม่สามารถระบุได้แน่ชัดว่าเป็นหมูป่า (*Sus scrofa scrofa*) หรือหมูบ้าน (*Sus scrofa domesticus*) จึงนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างดังกล่าวไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลพันธุกรรมสัตว์ป่าของกรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไซโตโครม บี ของหมูป่า จำนวน 5 sequences (รหัส Wild boar 12, 14, 15, 16 และ 19) และหมูบ้านจำนวน 6 sequences (รหัส Domestic pig 02, 04, 06, 07, 10 และ 11) โดยการนำ Multiple sequences alignment แล้วนำไปสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ด้วยวิธี NJ แสดงผลการวิเคราะห์ในหัวข้อถัดไป

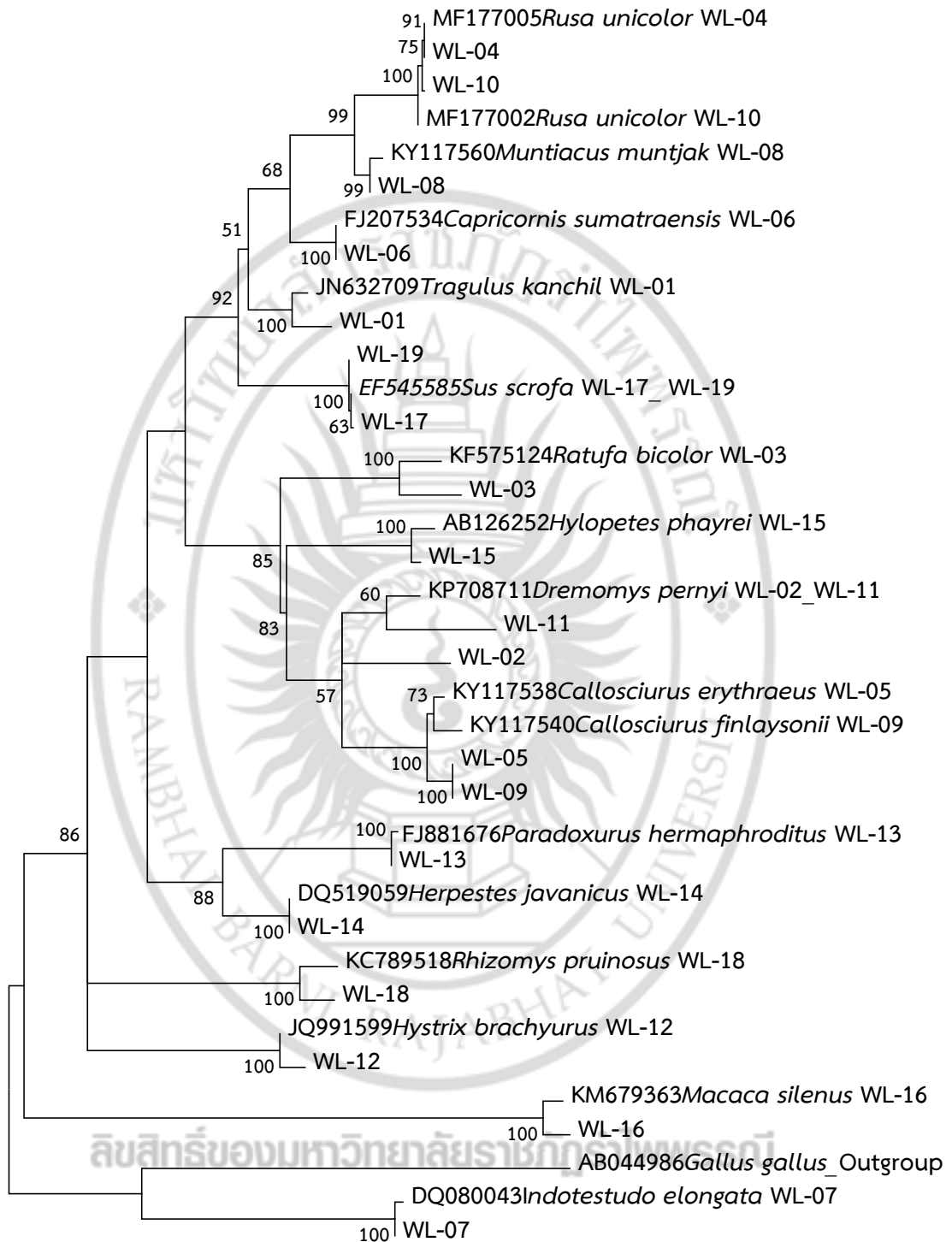
### ผลการสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree)

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษารั้งนี้กับตัวอย่างที่นำลำดับนิวคลีโอไทด์มาจากฐานข้อมูลพันธุกรรมสากล GenBank (ตารางที่ 3.2) โดยการสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการด้วยวิธี Maximum likelihood (ML) ผลที่ได้แสดงดังภาพที่ 4.7 พบว่าสามารถจำแนก

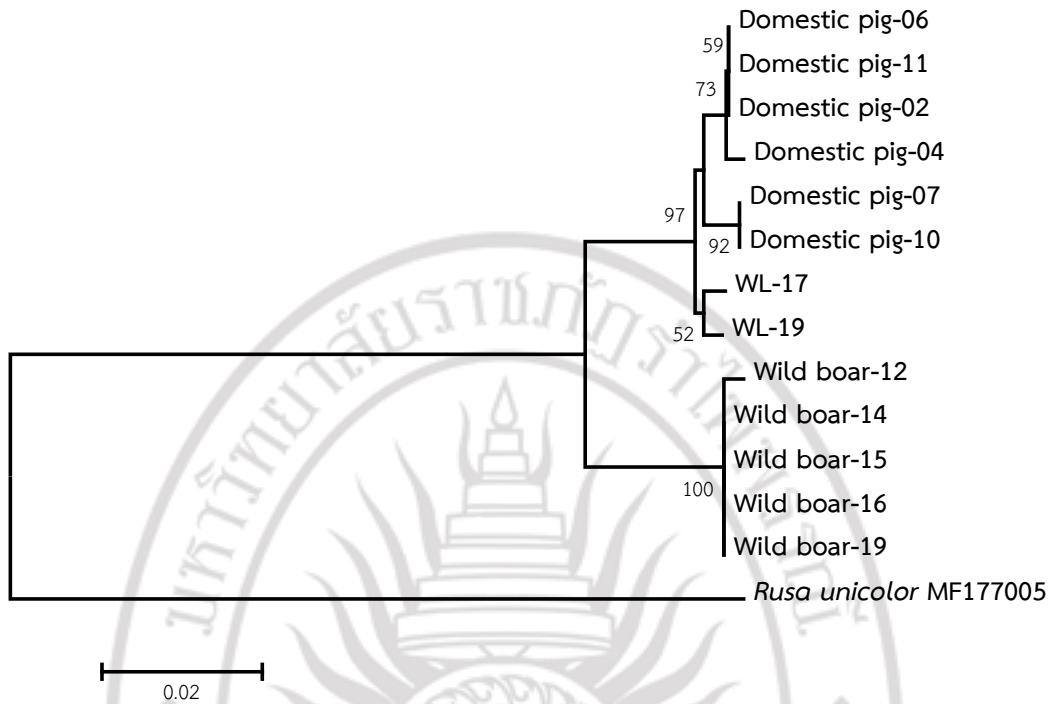


ตัวอย่างชิ้นส่วน ชิ้นเนื้อ หรืออวัยวะ ที่คาดว่าจะเป็นสัตว์ป่า จำนวน 19 ตัวอย่าง ได้ทั้งหมด 13 ชนิด แบ่งออกเป็น 5 กลุ่มใหญ่ ๆ ได้แก่ อันดับ (Order) Artiodactyla, Rodentia, Carnivora, Testudines และ Primates โดยอันดับ Artiodactyla พบว่ามี 4 วงศ์ (Family) ได้แก่ วงศ์ Tragulidae ประกอบด้วย กระเจงเล็ก (รหัส WL-01) วงศ์ Bovidae ประกอบด้วย เลียงผาใต้ (รหัส WL-06) วงศ์ Cervidae ประกอบด้วย กวางป่า (รหัส WL-04 และ WL-10) และแก้งธรรมดา (รหัส WL-08) และวงศ์ Suidae ประกอบด้วย หมูบ้าน (รหัส WL-17 และ WL-19) อันดับ Rodentia พบว่ามี 3 วงศ์ ได้แก่ วงศ์ Sciuridae ประกอบด้วย กระรอก *Dremomys pernyi* (รหัส WL-02, WL-11) พญากระรอกดำ (รหัส WL-03) กระรอกสวน (WL-05) กระรอกหลากสี (รหัส WL-09) และ กระรอกบินเล็กแก้มขาว (WL-15) วงศ์ Hystricidae ประกอบด้วย เม่นใหญ่ (WL-12) และ วงศ์ Spalacidae ประกอบด้วย อังกลาง (รหัส WL-18) อันดับ Carnivora พบว่ามี 2 วงศ์ ได้แก่ วงศ์ Viverridae ประกอบด้วย อีเห็นข้างลาย (รหัส WL-13) และ วงศ์ Herpestidae ประกอบด้วย พังพอนเล็ก (รหัส WL-14) อันดับ Testudines พบว่ามี 1 วงศ์ ได้แก่ วงศ์ Testudinidae ประกอบด้วย เต่าเหลือง (รหัส WL-07) และ อันดับ Primates พบว่ามี 1 วงศ์ ได้แก่ วงศ์ Cercopithecidae ประกอบด้วย ลิงมะแคคทางสิงโต (รหัส WL-16)

ในการศึกษาครั้งนี้ มีตัวอย่างชิ้นเนื้อที่คาดว่าจะเป็นหมูป่าอีก 2 ตัวอย่าง (รหัสตัวอย่าง WL-17 และ WL-19) ซึ่งผลจากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ระบุได้ว่าเป็นหมู (*Sus scrofa*) (ตารางที่ 4.3) แต่ยังไม่สามารถระบุได้แน่ชัดว่าเป็นหมูป่า (*Sus scrofa scrofa*) หรือหมูบ้าน (*Sus scrofa domesticus*) จึงนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างดังกล่าวไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลพันธุกรรมสัตว์ป่าของกรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไซโตโครม บี ของหมูป่า จำนวน 5 sequences (รหัส Wild boar 12, 14, 15, 16 และ 19) และหมูบ้านจำนวน 6 sequences (รหัส Domestic pig 02, 04, 06, 07, 10 และ 11) โดยการทำให้ Multiple sequences alignment แล้วนำไปสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ด้วยวิธี ML โดยใช้โปรแกรม MEGA v.6.0 (Tamura et al., 2013) และใช้รหัสพันธุกรรมของกวางป่า (*Cervus unicolor*) จากฐานข้อมูล GenBank (GenBank accession number: EF035448) เป็นตัวอย่างนอกกลุ่ม (Outgroup) ทดสอบความเชื่อมั่นของ tree ที่ได้ด้วยการทดสอบ bootstrap จำนวน 1,000 ซ้ำ โดยผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าตัวอย่าง WL-17 และ WL-19 รวมเข้าเป็นกลุ่มเดียวกันกับหมูบ้าน ด้วยค่าความเชื่อมั่นสูงถึง 97% และแยกออกจากกลุ่มหมูป่าอย่างชัดเจน (ภาพที่ 4.8) ผลที่ได้นี้สามารถระบุได้ว่า ตัวอย่าง WL-17 และ WL-19 นั้นเป็นหมูบ้าน



ภาพที่ 4.7 ผลการสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษากับตัวอย่างลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูลพันธุกรรม GenBank



ภาพที่ 4.8 ผลการสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) แสดงให้เห็นว่าตัวอย่าง WL-17 และ WL-19 รวมเข้าเป็นกลุ่มเดียวกันกับหมูบ้าน (Domestic pig) ด้วยค่าความเชื่อมั่น 97% และแยกออกจากกลุ่มหมูป่า (Wild boar) อย่างชัดเจน บ่งชี้ว่าตัวอย่าง WL-17 และ WL-19 นั้นเป็นหมูบ้าน