BRT 541050

ความหลากหลายชนิดพันธุกรรมของนกขุนทองในประเทศไทย

เพชร ศรีสุรเมธีกร

วิทยานิพนธ์เสนอต่อมหาวิทยาลัยรามคำแหง
เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีววิทยา)
ปีการศึกษา 2545

An 13

8 มิ.ย. 2546

โครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย
c/o ศูนย์วิจัยและฝึกอบรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ
อาคารสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
73/1 ถนนพระรามที่ 6 เขตราชเทวี
กรุงเทพฯ 10400

ความหลากหลายเชิงพันธุกรรมของนกขุนทองในประเทศไทย

เพชร ศรีสุรเมธีกร

วิทยานิพนธ์เสนอต่อมหาวิทยาลัยรามคำแหง
เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต(ชีววิทยา)
ปีการศึกษา 2545

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยรามคำแหง

ISBN 974-09-0276-6

GENETIC DIVERSITY OF HILL MYNAHS IN THAILAND

PETCH SRISURAMATIKORN

A THESIS PRESENTED TO RAMKHAMHAENG UNIVERSITY

IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS

FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE

(BIOLOGY)

2002

COPYRIGHTED BY RAMKHAMHAENG UNIVERSITY

ISBN 974-09-0276-6

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ ความหลากหลายเชิงพันธุกรรมของนกขุนทองในประเทศไทย
ชื่อผู้เขียน นายเพชร ศรีสุรเมธีกร
ภาควิชาและคณะ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
รองศาสตราจารย์ ดร. มณี อัชวรานนท์ ประธานกรรมการ
อาจารย์ ดร. ธิดารัตน์ เอกสิทธิกุล
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นวลฉวี เวชประสิทธิ์

มหาวิทยาลัยรามคำแหงอนุมัติให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร. สุรพล ราชภัณฑารักษ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.มณี อัชวรานนท์)

.....กรรมการ
(อาจารย์ ดร. ธิดารัตน์ เอกสิทธิกุล)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นวลฉวี เวชประสิทธิ์)

BRT 541050

บทคัดย่อ

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ : ความหลากหลายเชิงพันธุกรรมของนกขุนทองในประเทศไทย
ชื่อผู้เขียน : นายเพชร ศรีสุรเมธีกร
ชื่อปริญญา : วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา : ชีววิทยา
ปีการศึกษา : 2545
คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์:
1. รองศาสตราจารย์ ดร. มณี อัชวรานนท์ ประธานกรรมการ
2. อาจารย์ ดร. ธิดารัตน์ เอกสิทธิกุล
3. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นวลฉวี เวชประสิทธิ์

จากการพบความแตกต่างแปรผันเชิงสัณฐานวิทยาของนกขุนทอง (*Gracula religiosa*) ในประเทศไทย และได้จำแนกนกขุนทองเป็น 5 กลุ่ม ได้แก่ นกขุนทองเหนือ นกขุนทองเหนือกลาย นกขุนทองกลุ่มผสม นกขุนทองใต้กลาย และนกขุนทองใต้ จึงทำให้เกิดสมมติฐานการวิจัยว่า ความแตกต่างดังกล่าว มีความแตกต่างแปรผันหรือความหลากหลายเชิงพันธุกรรมเข้ามาเกี่ยวข้องด้วยหรือไม่

การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบสมมติฐานดังกล่าว โดย (1) หาแหล่งตัวอย่างเนื้อเยื่อที่เหมาะสมในการสกัดดีเอ็นเอ ออกมาศึกษาจาก กล้ามเนื้อ เลือด โคนขน และปลายขน (2) ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ของนกขุนทองทั้ง 5 กลุ่ม จากผลผลิตปฏิกิริยาลูกโซ่ ของยีนไซโตโครมออกซิเดสบี ในไมโตคอนเดรียลจีโนม

จากการศึกษาพบว่า (1) กล้ามเนื้อเป็นแหล่งที่มีความเหมาะสมในการสกัดดีเอ็นเอออกมาศึกษา (2) มีเอนไซม์ตัดจำเพาะ 3 ชนิดจากทั้งหมด 12 ชนิดที่ใช้ตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ให้รูปแบบที่ปรากฏเป็นแถบลายพิมพ์ชัดเจนที่สุด ได้แก่ เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bsa* JI, *Bst* YI, และ *Pst* I ซึ่งเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้ง 3 ชนิดให้รูปแบบ

ที่เหมือนกันคือ รูปแบบ A ยกเว้น เอนไซม์ *Bsa* JI ให้รูปแบบที่แตกต่างกันออกไปคือ รูปแบบ B

การศึกษาในครั้งนี้ พบว่า รูปแบบที่เป็นแถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ มีความแตกต่างกันไม่ชัดเจน และยังไม่พบความสัมพันธ์กับความแตกต่างแปรผันเชิงสัณฐานวิทยาที่จำแนกนกขุนทองเป็น 5 กลุ่ม แต่ทำให้ทราบข้อมูลพื้นฐานเบื้องต้นที่สามารถจำแนกนกขุนทองเป็น 2 กลุ่มโดยไม่ยึดแบบแผนทางสัณฐานวิทยา ซึ่งมีค่าความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์ภายในประชากร และระหว่างประชากรโดยเฉลี่ยเท่ากับ 0.0028 และ 0.0061 ตามลำดับ ส่วนความห่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรโดยเฉลี่ยมีค่าเท่ากับ 0.0034 และสามารถสร้างแนวโน้มของความสัมพันธ์เชิงพันธุกรรมได้

อย่างไรก็ตาม ควรเพิ่มจำนวนยีนชนิดต่าง ๆ ทั้งในไมโตคอนเดรียลจีโนม และนิวเคลียร์จีโนม และ เอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่าง ๆ รวมทั้ง ตัวอย่างนกขุนทองที่ใช้ในการศึกษาให้มากขึ้น ซึ่งจะทำให้สามารถทดสอบนัยสำคัญทางสถิติได้ว่า มีความแตกต่างแปรผัน หรือความหลากหลายเชิงพันธุกรรมเกิดขึ้นกับกลุ่มประชากรของนกขุนทองในประเทศไทย

ABSTRACT

Thesis Title : Genetic Diversity of Hill Mynahs in Thailand

Student 's Name : Mr. Petch Srisuramatikorn

Degree Sought : Master of Science

Major : Biology

Academic Year : 2002

Advisory Committee :

1. Associate Professor Dr. Manee Archawaranon Chairperson
2. Dr. Thidarat Eksittikul
3. Assistant Professor Dr. Nuanchawee Wetprasit

The study of morphological measurements of Hill Mynahs *(Gracula religiosa)* in Thailand showed that there were five different groups of morphological variation: northern, modified northern, intermediate, modified southern, and southern groups. A hypothesis that genetic diversity got involve in their morphological variation was raised.

The objective of this study was to test the above-mentioned hypothesis by (1) examining the most available tissue for DNA extraction from muscle, blood, and feather and (2) employing PCR-RFLP technique (cytochrome oxidase b gene) to study genetic diversity among five groups of Hill Mynahs.

The study showed that (1) muscle tissue was the most suitable for DNA extraction and (2) the haplotypes from restriction enzyme (*Bsa* JI, *Bst* YI, and *Pst* I) gave obvious patterns, of which these patterns had similarity (A haplotype) except *Bsa* JI gave a different pattern (B haplotype).

Although the results from this study have not been concluded that these haplotypes among five different Hill Mynah groups were obviously different or any relationships with their morphological variation, it could be classified Hill Mynahs into two groups. The estimated average nucleotide diversity within and among populations were 0.0028 and 0.0061, respectively. The estimated average nucleotide distance among populations was 0.0034. The tendency of phylogenetic tree was shown.

However, The further study on the number and various types of genes in mitochondrial and nuclear genomes, different restriction enzymes and more specimens are taken into consideration in order to indicate if there is, more or less, genetic diversity among various Hill Mynah phenotypes in Thailand.

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นวลฉวี เวชประสิทธิ์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ทำหน้าที่กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์และสอบวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณอาจารย์ ดร. ธิดารัตน์ เอกสิทธิกุล กรรมการที่ปรึกษาและสอบวิทยานิพนธ์ เป็นผู้ให้คำแนะนำเทคนิคทางชีวเคมีกับข้าพเจ้า ทั้งได้ให้ความเป็นกันเองในการแสดงความคิดเห็นที่แตกต่างของข้าพเจ้า และให้ความอนุเคราะห์ใช้ เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมีบางชนิดที่ขาดแคลนซึ่งจำเป็นต้องใช้ในการทดลองและบันทึกผลการทดลอง

ขอขอบพระคุณอาจารย์ ดร. ศิราวุธ กลิ่นบุหงา ที่ให้ความอนุเคราะห์คำนวณข้อมูลด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป และได้กรุณาวิพากษ์วิจารณ์ผลของงานที่เป็นวิทยานิพนธ์นี้

ขอขอบพระคุณอาจารย์ดวงพร สีหนันทวงศ์ (นักศึกษาปริญญาเอก จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) ที่ให้ความอนุเคราะห์แนวทางการทำการทดลอง Nested PCR และจำแนกรูปแบบแถบดีเอ็นเอ แม้ว่าข้าพเจ้าจะไม่เคยได้รับคำแนะนำโดยตรงก็ตาม

ขอขอบพระคุณอาจารย์สิทธิรักษ์ รอยตระกูล (Ph.D. student, Leiden University, The Netherlands) เป็นผู้ให้ความอนุเคราะห์ แนะนำแนวทางการทำการทดลองในด้านเนื้อหาที่เป็นเทคนิคทางชีวเคมีของเค้าโครงวิทยานิพนธ์ (proposal) และให้ ความกรุณาตรวจสอบ ซักถาม เพื่อความเข้าใจในงานที่ทำ รวมทั้งการเสนอแนะความคิดเห็นต่าง ๆ ซึ่งเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อผลของงานที่ข้าพเจ้าได้พยายามทำ

ขอขอบพระคุณเจ้าของเงินทุน ซึ่งได้รับการสนับสนุนจากโครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย ซึ่งร่วมจัดตั้งโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ รหัสโครงการ BRT 541050

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาชีววิทยา และเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง ที่ให้ความสะดวกในการเบิกจ่ายอุปกรณ์ และสารเคมีบางชนิดที่จำเป็นต้องใช้ในการศึกษาครั้งนี้

ขอขอบคุณ คุณพรชัย วงศ์วาสนา และสวนนกรามคำแหง ที่ให้ความอนุเคราะห์เรื่องกลุ่มตัวอย่างนกขุนทอง และการจัดเตรียมเอกสารต่าง ๆ

ขอขอบคุณเพื่อน ๆ และน้อง ๆ (ชีววิทยา มหาวิทยาลัยรามคำแหง ของข้าพเจ้าทุกคน) ที่ทำงานและเรียนที่มหาวิทยาลัยอื่น ๆ ที่ได้แสดงน้ำใจไมตรีต่อข้าพเจ้าอย่างไม่เสื่อมคลาย

ขอขอบคุณ น้อง ๆ ของข้าพเจ้าทุกคนที่ให้ความเข้าใจ และให้กำลังใจในสถานะของความเป็นนักศึกษา และได้อนุเคราะห์ตรวจคำผิดในเนื้อหาวิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ทรงพระคุณอันประเสริฐ ได้แก่ บิดาและมารดาของข้าพเจ้า เป็นผู้เห็นคุณค่าของการศึกษา และให้ความเข้าใจในความเป็นไป ที่ต้องดำเนินการศึกษาในหัวข้อของวิทยานิพนธ์นี้

สุดท้ายนี้ ขอขอบพระคุณประธานที่ปรึกษาและสอบวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร. มณี อัชวรานนท์ เป็นผู้ให้โอกาสทุก ๆ อย่างกับข้าพเจ้า โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ให้ข้าพเจ้าได้ทำในสิ่งที่ข้าพเจ้ารัก คือ งานที่เป็นเนื้อหาของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

เพชร ศรีสุรเมธีกร

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	(4)
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	(6)
กิตติกรรมประกาศ	(8)
สารบัญตาราง	(13)
สารบัญภาพประกอบ	(14)
บทที่	
1 บทนำ	1
ความนำ	1
ความสำคัญของปัญหา	3
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	7
ขอบเขตของการวิจัย	7
สมมติฐานของการวิจัย	7
นิยามศัพท์เฉพาะ	8
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	10
2 วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	11
ชีววิทยาของนกขุนทอง	11
อนุกรมวิธานของนกขุนทอง	11
แหล่งอาศัยของนกขุนทอง	12
ลักษณะรูปร่างภายนอกของนกขุนทอง	13
พันธุศาสตร์ประชากร	16
3 วิธีดำเนินการวิจัย	36
ตัวอย่างนกขุนทอง	36
เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการวิจัย	36

บทที่ หน้า

เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย..... 37

วิธีเก็บรวบรวมข้อมูลและสถิติที่ใช้ในการวิจัย..... 38

การเตรียมเนื้อเยื่อที่จะศึกษาหาแหล่งที่เหมาะสม
ในการสกัดดีเอ็นเอ..... 38

การสกัดดีเอ็นเอ..... 39

การหาความเข้มข้น การตรวจสอบความบริสุทธิ์
และการตรวจสอบคุณลักษณะทางกายภาพ
ของดีเอ็นเอที่สกัดได้..... 45

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (ยีนไซโตโครมออกซิเดสบี)
โดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่..... 47

การสกัดผลผลิตปฏิกิริยาลูกโซ่ จากอะกาโรสเจล
โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป (QIAquick Gel Extraction Kit)
ด้วยเทคนิคการแยกปั่น 49

การทำ Nested PCR เพื่อพิสูจน์ว่า ผลผลิตจาก
ปฏิกิริยาลูกโซ่ เป็นยีนไซโตโครมออกซิเดสบี..... 50

การใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ เพื่อตรวจสอบ
ลายพิมพ์ยีนไซโตโครมออกซิเดสบี..... 51

รวบรวม และคัดเลือกรูปแบบแถบดีเอ็นเอ
ที่ให้ Polymorphism มากที่สุด
และตรวจสอบขนาดที่เป็นแถบของดีเอ็นเอ..... 51

วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของรูปแบบแถบดีเอ็นเอ
จากนกขุนทองตัวอย่าง..... 52

4 ผลการทดลอง..... 53

ผลการสกัดดีเอ็นเอแบบรวมทั้งหมด..... 53

ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่..... 61

บทที่ หน้า

ผลการตรวจสอบลายพิมพ์ยีนไซโตโครมออกซิเดสบี
ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ..... 65

การจัดจำแนกตัวอย่างนกขุนทองจากลายพิมพ์
ยีนไซโตโครมออกซิเดสบีที่ได้จาก
เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bsa* JI, *Bst* YI, และ *Pst* I..... 83

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของรูปแบบแถบลายพิมพ์
ยีนไซโตโครมออกซิเดสบี ของนกขุนทองตัวอย่าง..... 83

5 สรุป อภิปรายผลการทดลองและข้อเสนอแนะ..... 89

บรรณานุกรม..... 96

ประวัติผู้เขียน..... 104

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	บทบาทของดีเอ็นเอ และอาร์เอ็นเอโมเลกุล.....	1
2	ความแตกต่างแปรผันเชิงลักษณะปรากฏในประชากรธรรมชาติ ของสัตว์มีกระดูกสันหลังชนิดต่าง ๆ.....	5
3	ชื่อชนิดย่อยของนกขุนทองที่สัมพันธ์กับแหล่งอาศัยต่าง ๆ.....	12
4	ลักษณะแผ่นหนังสีเหลืองที่ใช้จำแนกนกขุนทองในประเทศไทย เป็น 5 กลุ่ม.....	15
5	ชื่อของเอนไซม์ตัดจำเพาะที่สัมพันธ์กับชื่อวิทยาศาสตร์ ของจุลชีพที่สร้างเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดนั้น ๆ.....	21
6	เอนไซม์ตัดจำเพาะทั้ง 3 ชนิด.....	22
7	ความเข้มข้นของอะกาโรสเจลที่เหมาะสำหรับ การแยกดีเอ็นเอขนาดต่าง ๆ.....	28
8	ค่าอัตราส่วนระหว่างการดูดกลืนที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตรของสารละลายดีเอ็นเอ ที่สกัดได้จากกล้ามเนื้อโดยใช้สารละลายฟีนอล เพื่อกำจัดโปรตีน.....	59

สารบัญภาพประกอบ

ภาพที่		หน้า
1	ลักษณะแผ่นหนังสีเหลืองที่ใช้จำแนกนกขุนทองในประเทศไทย เป็น 5 กลุ่ม.....	14
2	ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ 1 รอบ 3 ขั้นตอน.....	24
3	หลักการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบที่เรียกว่า ปฏิกิริยาลูกโซ่.....	26
4	ผลการสกัดดีเอ็นเอแบบรวมทั้งหมด (Total genomic DNA หรือ total cellular DNA) จากกล้ามเนื้อโดยใช้เทคนิค salting-out เพื่อกำจัดโปรตีน.....	54
5	ผลการสกัดดีเอ็นเอแบบรวมทั้งหมด (Total genomic DNA หรือ total cellular DNA) จากเลือดโดยใช้เทคนิค salting-out เพื่อกำจัดโปรตีน.....	55
6	ผลการสกัดดีเอ็นเอแบบรวมทั้งหมด (Total genomic DNA หรือ total cellular DNA) จากโคนขนโดยใช้เทคนิค salting-out เพื่อกำจัดโปรตีน.....	56
7	ผลการสกัดดีเอ็นเอแบบรวมทั้งหมด (Total genomic DNA หรือ total cellular DNA) จากกล้ามเนื้อ เลือด โคนขน และปลายขน โดยใช้เทคนิค salting-out เพื่อกำจัดโปรตีน.....	57
8	ผลการสกัดดีเอ็นเอแบบรวมทั้งหมด (Total genomic DNA หรือ total cellular DNA) จากกล้ามเนื้อ โดยใช้สารละลายฟีนอล เพื่อกำจัดโปรตีน.....	58
9	ค่าการดูดกลืนที่ความยาวคลื่น ตั้งแต่ 200 จนถึง 350 นาโนเมตร (wavelength scan) ของสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้จากกล้ามเนื้อ โดยใช้สารละลายฟีนอล เพื่อกำจัดโปรตีน.....	60

ภาพที่ หน้า

10 ผลผลิตจากปฏิกิริยาลูกโซ่ขนาดประมาณ 650 คู่เบส ที่คาดว่าเป็นส่วนหนึ่งของยีนไซโตโครมออกซิเดสบี..... 62

11 ผลผลิตจากปฏิกิริยาลูกโซ่ (ยีนไซโตโครมออกซิเดสบี) ที่ผ่านขั้นตอนการสกัดด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป (QIAquick Gel Extraction Kit)..... 63

12 การใช้เทคนิค Nested PCR เพื่อยืนยันว่า ยีนที่มีขนาด 650 คู่เบส เป็นส่วนหนึ่งของยีนไซโตโครมออกซิเดสบี..... 64

13 รูปแบบที่ปรากฏเป็นแถบของยีนไซโตโครมออกซิเดสบี ของนกขุนทองแต่ละกลุ่มภายหลังการตรวจสอบลายพิมพ์ ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bsa* JI ในอะกาโรสเจล ที่มีความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์..... 66

14 รูปแบบที่ปรากฏเป็นแถบของยีนไซโตโครมออกซิเดสบี ของนกขุนทองเหนือ (N_1) ภายหลังการตรวจสอบลายพิมพ์ ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Pst* I, *Bst* YI, และ *Bsa* JI ในอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์..... 70

15 รูปแบบที่ปรากฏเป็นแถบของยีนไซโตโครมออกซิเดสบี ของนกขุนทองเหนือ (N_4) ภายหลังการตรวจสอบลายพิมพ์ ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Pst* I, *Bst* YI, และ *Bsa* JI ในอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์..... 71

16 รูปแบบที่ปรากฏเป็นแถบของยีนไซโตโครมออกซิเดสบี ของนกขุนทองแต่ละกลุ่ม จากตรวจสอบลายพิมพ์ ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bsa* JI ซึ่งได้จาก ภาพที่ 13, 14, และ 15..... 72

ภาพที่ หน้า

17 รูปแบบที่ปรากฏเป็นแถบของยีนไซโตโครมออกซิเดสบี
ของนกขุนทองแต่ละกลุ่มภายหลังการตรวจสอบลายพิมพ์
ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bst* YI ในอะกาโรสเจล
ที่มีความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์..... 73

18 รูปแบบที่ปรากฏเป็นแถบของยีนไซโตโครมออกซิเดสบี
ของนกขุนทองแต่ละกลุ่ม จากการตรวจสอบลายพิมพ์
ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bst* YI ซึ่งได้จาก
ภาพที่ 14, 15, และ 17..... 77

19 รูปแบบที่ปรากฏเป็นแถบของยีนไซโตโครมออกซิเดสบี
ของนกขุนทองแต่ละกลุ่มภายหลังการตรวจสอบลายพิมพ์
ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Pst* I ในอะกาโรสเจล
ที่มีความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์..... 78

20 รูปแบบที่ปรากฏเป็นแถบของยีนไซโตโครมออกซิเดสบี
ของนกขุนทองแต่ละกลุ่ม จากการตรวจสอบลายพิมพ์
ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Pst* I ซึ่งได้จาก
ภาพที่ 14, 15, และ 19..... 82

บทที่ 1
บทนำ

ความนำ

กรดนิวคลีอิก ได้แก่ ดีเอ็นเอ (DNA) และอาร์เอ็นเอ (RNA) เป็นชีวโมเลกุลที่เป็นสารพันธุกรรม (genetic material) จากการค้นพบ บทบาทของดีเอ็นเอ และ อาร์เอ็นเอ ซึ่งมีพื้นฐานการค้นพบโครงสร้างโมเลกุลทั้งสองในสิ่งมีชีวิต ดังตารางที่ 1 ทำให้ประจักษ์ว่า การกำหนดโครงสร้างและการดำเนินกิจกรรมต่าง ๆ รวมทั้งคุณลักษณะที่จำเพาะของสิ่งมีชีวิตในแต่ละชนิดเกิดขึ้นที่ระดับโมเลกุล

ตารางที่ 1 บทบาทของดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอโมเลกุล

ดีเอ็นเอ	อาร์เอ็นเอ
1. มีขนาดจำเพาะในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด มีหน้าที่หลัก คือ ถ่ายทอดพันธุกรรม และลักษณะกรรมพันธุ์โดยผ่านกระบวนการคัดลอกแบบ (transcription) และ แปลรหัส (translation)	1. มีหลายชนิดและหลายขนาดและมีบทบาทหน้าที่แตกต่างกันคือ -tRNA: เป็นตัวปรับและแปลรหัสพันธุกรรม -rRNA: เป็นโครงสร้างของไรโบโซม (ribosome) -mRNA: เป็นตัวนำรหัสพันธุกรรม (codon) -RNA: ที่เกี่ยวกับกระบวนการตัดต่อ(splicing or processing) ให้ได้เป็นสาย mRNA ที่มีรหัสพันธุกรรมต่อเนื่องกันตลอดสาย
2. เป็นหน่วยพันธุกรรมเท่านั้น	2. นอกจากมีคุณสมบัติเป็นหน่วยพันธุกรรมแล้ว ยังมีคุณสมบัติเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาได้เหมือนเอนไซม์เรียกว่า กลุ่มไรโบไซม์ (ribozyme)
3. เป็นต้นแบบสำหรับการสร้างอาร์เอ็นเอโมเลกุล โดยใช้เอนไซม์อาร์เอ็นเอโพลีเมอร์เรส (RNA polymerase)	3. เป็นต้นแบบเพื่อการสร้างดีเอ็นเอโมเลกุล โดยใช้เอนไซม์รีเวิสทรานสคริปเตส (reverse transcriptase)

(ดัดแปลงจาก: วิสุทธิ์ ใบไม้ 2536, 314)

ที่มา: วิสุทธิ์ ใบไม้. 2536. ยีนกับการสังเคราะห์โปรตีน. ใน **พันธุศาสตร์**, หน้า 314. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพมหานคร: เจ้าพระยาระบบการพิมพ์.

การค้นพบดังกล่าว ทั้งดีเอ็นเอ และอาร์เอ็นเอ โมเลกุลถือว่าเป็นหลักฐานทางวิวัฒนาการที่สำคัญอันหนึ่ง (มณี อัชวรานนท์ 2525, 43-139) และ มีผลต่อทฤษฎีกำเนิดของสิ่งมีชีวิตนั้นคือ แนวคิดที่เชื่อว่า อาร์เอ็นเอ โมเลกุลเป็นต้นกำเนิดของระบบพันธุกรรม (วิสุทธิ์ ใบไม้ 2536, 312) ซึ่งเป็นแนวคิดที่สอดคล้องกับการให้คำจำกัดความของคำว่า "วิวัฒนาการ" ในตำราเรื่อง "วิวัฒนาการ" มณี อัชวรานนท์ ได้อธิบายว่า

"วิวัฒนาการ คือ กลไกของสิ่งมีชีวิตชั้นสูงที่มีบรรพบุรุษมาจากสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำ โดยมีการเปลี่ยนแปลงเรื่อย ๆ มาเพื่อให้เข้ากับกลไกของธรรมชาติสืบเนื่องติดต่อกันเป็นระยะเวลานาน จนกระทั่งสิ่งมีชีวิตในปัจจุบันแตกต่างจากสิ่งมีชีวิตใน สมัยโบราณโดยสิ้นเชิง ทั้งทางกายภาพ และสรีรวิทยา ส่วนใหญ่มักจะเป็นไปในแบบของการเปลี่ยนแปลง จากแบบง่าย ๆ (simple) ไปสู่แบบที่ซับซ้อน (complex) มากกว่า หรือแบบโบราณไปสู่แบบที่ทันสมัย หรือจากแบบธรรมดา ๆ (generalized) ไปสู่แบบพิเศษเฉพาะตัว (specialized) โดยมีแต่รุดหน้าไปเรื่อย ๆ ไม่มีถอยหลัง และในช่วงของวิวัฒนาการจะพบว่า สิ่งมีชีวิตมีการสูญพันธุ์โดยแบบของสิ่งมีชีวิตที่ไม่เหมาะสมกับสภาพแวดล้อมนั้นจะสูญพันธุ์ไป จะคงเหลือไว้แต่แบบของสิ่งมีชีวิตที่เหมาะสมกับสภาพแวดล้อมเท่านั้น " (มณี อัชวรานนท์ 2525, 5)

การศึกษาความแตกต่างแปรผัน หรือ ความหลากหลายเชิงพันธุกรรม เป็นองค์ความรู้พื้นฐานอันหนึ่งของความหลากหลายทางชีวภาพ ซึ่งความหลากหลายทางชีวภาพมีความคาบเกี่ยวทั้งนิเวศวิทยาและวิวัฒนาการ ตามคำอธิบายในตำราเรื่อง "Biodiversity and conservation" Michael J. Jeffries ได้กล่าวว่า

"ความหลากหลายทางชีวภาพเป็นผลลัพธ์ที่เกิดจากกระบวนการทางนิเวศวิทยา (ecological process) และกระบวนการทางวิวัฒนาการ (evolutionary process) โดยที่ขอบเขตของนิเวศวิทยา (ecological domain) มุ่งศึกษา สิ่งมีชีวิตในหน่วย ประชากร สังคมชีวิต หรือระบบนิเวศ และปฏิสัมพันธ์ของหน่วยดังกล่าวกับสิ่งแวดล้อม ซึ่งเท่ากับว่า ลักษณะปรากฏของสิ่งมีชีวิต (phenotype) เป็นแกนกลางที่จะสะท้อนให้ทราบถึงกระบวนการทางนิเวศวิทยาที่มีขอบเขตตั้งแต่ นิเวศวิทยาของสิ่งมีชีวิตชนิดเดียว หรือหน่วยเดียว จนถึงหน้าที่ของระบบนิเวศทั้งหมด ส่วนขอบเขตของวิวัฒนาการ (evolutionary domain) มุ่งศึกษากระบวนการ รูปแบบ ผลลัพธ์ทางพันธุกรรม และความ

แตกต่างแปรผันที่เกิดขึ้น ซึ่งเท่ากับว่า ลักษณะทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต (genotype) เป็นแกนกลางที่จะสะท้อนให้ทราบถึง กระบวนการทางวิวัฒนาการที่มีขอบเขตตั้งแต่ การปรับตัว (เป็นการคัดเลือกทางพันธุกรรมเพื่อตอบสนองต่อสิ่งแวดล้อม) การเปลี่ยนแปลงทางวิวัฒนาการจุลภาค (micro-evolution) จนถึง วิวัฒนาการมหภาค (macro-evolution) การกำเนิดชนิดพันธุ์ใหม่ (speciation) และการสูญพันธุ์ (extinction)" (Jeffries 1997, 39)

ดังนั้นในการวางแผนจัดการทรัพยากรทางชีวภาพในธรรมชาติ ควรได้มีการศึกษาทำความเข้าใจธรรมชาติของทรัพยากรชีวภาพเหล่านั้นให้ถ่องแท้ทุกแง่มุม เช่น การจัดการทรัพยากรสัตว์ป่าชนิดต่าง ๆ ให้ได้ผลยับยั้งการสูญพันธุ์ซึ่งก็คือ การสูญเสียทางชนิดพันธุ์ พันธุกรรม และ ผลกระทบต่อระบบนิเวศ ควรจะมีการศึกษาทำความเข้าใจกับธรรมชาติของสัตว์ป่าเหล่านั้น ให้ดีก่อน

นกขุนทองเป็นสัตว์ป่าอีกชนิดหนึ่งที่พบว่า จำนวนประชากรในป่าธรรมชาติลดลงเรื่อย ๆ ในแต่ละถิ่นที่อยู่อาศัย (มณี อัชวรานนท์ 2541, 22-24) สาเหตุจากการที่นกขุนทองเป็นที่ต้องการของผู้เลี้ยงนกมาก เนื่องมาจากสามารถเลียนเสียงต่าง ๆ รวมทั้งภาษาที่หลากหลายของมนุษย์ ได้ ประกอบกับพื้นที่ป่าลดลงจากการตัดไม้ทำลายป่า ทำให้นกไม่มีที่ทำรังและที่อยู่อาศัย ซึ่งในอนาคตนกขุนทองอาจเป็นสัตว์ป่าอีกชนิดหนึ่งที่จะไม่มีให้เห็นในป่าเมืองไทยอีกต่อไป การศึกษาถึงชีววิทยาของนกขุนทองในแง่มุมต่าง ๆ จึงเป็นการศึกษา เพื่อเป็นความรู้พื้นฐานทำให้เข้าใจ ความเป็นไปทางวิวัฒนาการและนิเวศวิทยาของสัตว์ป่าในเขตร้อน ซึ่งเป็นข้อมูลหนึ่งของการรายงาน สถานภาพความหลากหลายทางชีวภาพในประเทศไทย

ความสำคัญของปัญหา

จากการศึกษาความแตกต่างแปรผันเชิงสัณฐานวิทยา ของนกขุนทองที่มีแหล่งอาศัยกระจายทั่วประเทศไทย (Manee Archawaranon and Pornchai Wongwasana1998; Manee Archawaranon and Bongkotrat Techatraisak 2001) พบว่า นกขุนทองมีความแตกต่างแปรผันเชิงสัณฐานวิทยาตามละติจูดที่แตกต่างกันของประเทศ สามารถแบ่ง

นกขุนทองออกเป็น 5 กลุ่มย่อยตามลักษณะภายนอก ได้แก่ น้ำหนัก ขนาดของศรีษะ จะงอยปาก ความยาวของลำตัว และลักษณะของรูปร่าง แผ่นหนังสีเหลือง เป็นต้น นกขุนทอง 5 กลุ่มย่อย คือ

กลุ่มที่ 1 นกขุนทองเหนือ (Northern group)

กลุ่มที่ 2 นกขุนทองเหนือกลาย (Modified Northern group)

กลุ่มที่ 3 นกขุนทองกลุ่มผสม (Intermediate group)

กลุ่มที่ 4 นกขุนทองใต้กลาย (Modified Southern group)

กลุ่มที่ 5 นกขุนทองใต้ (Southern group)

จากข้อมูลของโครงการนี้ทำให้ทราบว่าในประชากรของนกขุนทอง มีความแตกต่างแปรผันเชิงลักษณะปรากฏ (phenotypic variation) ซึ่งอาจแบ่งเป็น 2 รูปแบบ (วิสุทธิ์ ใบไม้ 2536, 435-436) คือ

1) ลักษณะปรากฏที่แสดงความแตกต่างแปรผันต่อเนื่อง (continuous variation or quantitative variation) ได้แก่ ลักษณะที่สามารถ ชั่ง ตวง และวัด ได้

2) ลักษณะปรากฏที่แสดงความแตกต่างแปรผันไม่ต่อเนื่อง (discontinuous variation or qualitative variation) ได้แก่ ลักษณะที่สามารถสังเกต หรือตรวจสอบหรือแยกเป็นกลุ่มหรือหมวดหมู่ที่ชัดเจนได้

อย่างไรก็ตาม ความแตกต่างแปรผันเชิงสัณฐานวิทยาที่ตรวจพบในประชากรของนกขุนทองในประเทศไทยนั้น ยังจัดเป็น รูปแบบหนึ่งของความแตกต่างแปรผันเชิงลักษณะปรากฏ ที่สอดคล้องกับการรวบรวมของ Skulason and Smith (1995, 366-370; 1996, 111-131) ซึ่งตรวจพบในสัตว์มีกระดูกสันหลังชนิดอื่น ๆ ด้วย แยกเป็น 3 รูปแบบ คือ

1) ความแตกต่างแปรผันเชิงสัณฐานวิทยา

2) ความแตกต่างแปรผันเชิงพฤติกรรม

3) ความแตกต่างแปรผันเชิงชีพประวัติ

ความแตกต่างแปรผันเชิงลักษณะปรากฏทั้ง 3 รูปแบบนั้น มีความสัมพันธ์กับความแตกต่างแปรผันเชิงนิเวศวิทยา ในประชากรของปลา และสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ พบว่ามีความแตกต่างแปรผันทั้ง 3 รูปแบบ ในขณะที่สัตว์เลื้อยคลาน นก และ สัตว์เลี้ยงลูก

ด้วยน้ำนม พบเฉพาะความแตกต่างแปรผันเชิงสัณฐานวิทยา และพฤติกรรม เท่านั้น ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของสัตว์ด้วย บางชนิดพบทั้ง 3 รูปแบบ บางชนิดพบ 2 รูปแบบ และบางชนิดพบเพียงรูปแบบหนึ่งรูปแบบใดเท่านั้น ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ความแตกต่างแปรผันเชิงลักษณะปรากฏในประชากรธรรมชาติของ สัตว์มีกระดูกสันหลังชนิดต่าง ๆ

ชนิดของสิ่งมีชีวิต (สัตว์มีกระดูกสันหลัง)	**ความแตกต่างแปรผันเชิงลักษณะนิเวศ (Nature of discrete ecological differences)**	**ความแตกต่าง แปรผันเชิงลักษณะปรากฏ (Phenotypic differences)**
ปลา		
Arctic charr (*Salvelinus alpinus*)	Benthivory, planktivory, Piscivory, and migration	m, b, l
Atlantic salmon (*Salmon salar*)	Migration	l
Brook charr (*S. fontinalis*)	Benthivory, planktivory, swimming activity	b
Coho salmon (*Oncorhyncus kisutch*)	Lake versus stream habitat	m, b
Lenok (*Brachymystax lenok*)	Benthivory, planktivory, and piscivory	m, l
Pumpkinseed sunfish (*Lepomis gibbosus*)	Benthivory and planktivory	m
สัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ **Salamanders and newts**		
(*Taricha granulosa*)	Habitat, metamorphosing	m, l
(*Ambystoma tigrinum*)	Habitat/diet, cannibalism	m, l

ตารางที่ 2 (ต่อ)

ชนิดของสิ่งมีชีวิต (สัตว์มีกระดูกสันหลัง)	ความแตกต่างแปรผันเชิงลักษณะนิเวศ (Nature of discrete ecological differences)	ความแตกต่าง แปรผันเชิงลักษณะปรากฏ (Phenotypic differences)
Frogs and toads		
Spadefood toad (*Scaphiopus multiplicatus*)	Omnivory, carnivory, and cannibalism	m, l
Pacific treefrog (*Pseudacris regilla*)	Habitat selection by color morphs	m, b
สัตว์เลื้อยคลาน		
Solf-shelled turtles (*Trionyx spp*)	Insectivory, piscivory , and omnivory	m
นก		
Pacific reef heron (*Egretta sacra*)	Differences in hunting techniques associated with color	m, b
Hook-billed kite (*Chondrohierax unicinnatus*)	Feeding different size tree snails	m
Blackcap warbler (*Sylvia atricapilla*)	Differences in migratory behavior	b
สัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม		
Deer mice (*Peromyscus maniculatus*)	Woodland vs grassland habitats and diets	m, b

[m หมายถึง สัณฐานวิทยา (morphology) b หมายถึง พฤติกรรม (behavior) และ l หมายถึง ชีพประวัติ (life history)]

ที่มา: Skulason, Skuli, and Thomas B. Smith. 1995. Resource polymorphisms in vertebrates. **Trends Ecol. Evol.** 9: 366-370.

Smith, Thomas B., and Skuli Skulason . 1996. Evolutionary significance of resource polymorphisms in fishes, amphibians, and birds. **Ann. Rev. Ecol. Syst.** 27: 111-131.

ความแตกต่างแปรผันเชิงลักษณะปรากฏ มีสาเหตุมาจากพันธุกรรม แต่บางลักษณะปรากฏ อาจได้รับอิทธิพลจากสิ่งแวดล้อมด้วย ดังนั้น ความแตกต่างเชิงลักษณะปรากฏ ไม่ว่าจะตรวจสอบด้วยวิธีการใด จะสะท้อนให้ประจักษ์ถึง พื้นฐานที่แท้จริงของความแตกต่างแปรผันเชิงพันธุกรรมที่กระจายอยู่ทั่วไปในกลุ่มประชากรสิ่งมีชีวิต (วิสุทธิ์ ใบไม้ 2536, 436) ดังนั้นการศึกษาความแตกต่างแปรผัน หรือ ความหลากหลายเชิงพันธุกรรมของนกขุนทองในประเทศไทย จึงเป็นหัวข้อวิทยานิพนธ์ของการศึกษาในครั้งนี้

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อหาตัวอย่างของเนื้อเยื่อที่เหมาะสมในการสกัดดีเอ็นเอ
2. เพื่อตรวจหาดีเอ็นเอโพลีมอร์ฟีซึม (DNA polymorphism) ของนกขุนทองทั้ง 5 กลุ่ม

ขอบเขตของการวิจัย

1. ใช้ประชากรของนกขุนทองที่สวนนกรามคำแหง มหาวิทยาลัยรามคำแหง วิทยาเขตบางนา
2. ใช้ประชากรของนกขุนทองกลุ่มละ 3-5 ตัว

สมมติฐานของการวิจัย

การนำความแตกต่างแปรผันเชิงสัณฐานวิทยาของนกขุนทอง มาเป็นเครื่องชี้แนะให้ทราบถึงองค์ประกอบของยีนที่ควบคุมลักษณะนั้น ๆ ไม่สามารถที่จะบอก ความแตกต่างแปรผันเชิงพันธุกรรมได้อย่างถ่องแท้และละเอียดพอ เพราะว่าลักษณะเชิงสัณฐานวิทยาบางอย่างมิได้มีต้นเหตุมาจาก พันธุกรรมเพียงอย่างเดียวแต่อาจมีผลกระทบจากสิ่งแวดล้อมด้วย เหตุนี้ การศึกษาวิจัยในโครงการนี้ จึงมีสมมติฐานว่า ความแตกต่าง

แปรผันเชิงสัณฐานวิทยาของนกขุนทองดังกล่าวข้างต้นมีความหลากหลายเชิงพันธุกรรมเข้ามาเกี่ยวข้อง การศึกษาชีววิทยาระดับโมเลกุลจะช่วยพิสูจน์สมมุติฐานดังกล่าวนี้

นิยามศัพท์เฉพาะ

1. **นกขุนทองเหนือ** (*Gracula religiosa intermedia*) Northern group = N คือ นกขุนทองชนิดย่อยเดิมที่เคยมีรายงานไว้ เป็นนกขุนทองขนาดเล็กที่สุดในประเทศไทย แผ่นหนังสีเหลืองข้างศีรษะเชื่อมต่อกันระหว่างแผ่นหน้าและแผ่นหลัง (100%) มีถิ่นที่อยู่อาศัย ทางภาคเหนือ ภาคกลาง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคตะวันออก และภาคตะวันตกของประเทศไทย

2. **นกขุนทองเหนือกลาย** Modified Northern group = MN เป็นนกขุนทองกลุ่มใหม่ที่มีลักษณะคล้ายนกขุนทองเหนือ แต่ลักษณะของแผ่นหนังสีเหลืองที่เชื่อมต่อกันระหว่างแผ่นหน้าและแผ่นหลังมีเพียง 70-99%

3. **นกขุนทองกลุ่มผสม** Intermediate group = I เป็นนกขุนทองกลุ่มใหม่ที่มีลักษณะทั้งของนกขุนทองเหนือผสมกับนกขุนทองใต้ แผ่นหนังสีเหลืองที่เชื่อมต่อระหว่างแผ่นหน้าและแผ่นหลังมีเพียง 31-69%

4. **นกขุนทองใต้กลาย** Modified Southern group = MS เป็นนกขุนทองกลุ่มใหม่ที่มีลักษณะคล้ายนกขุนทองใต้ แต่ลักษณะของแผ่นหนังสีเหลือง แตกต่างจากของนกขุนทองใต้ แผ่นหนังสีเหลืองที่เชื่อมต่อระหว่างแผ่นหน้าและแผ่นหลังมีเพียง 1-30%

5. **นกขุนทองใต้** (*Gracula religiosa religiosa*) Southern group = S คือ นกขุนทองชนิดย่อยเดิมที่เคยมีรายงานไว้ เป็นนกขุนทองที่มีขนาดใหญ่ที่สุดที่พบในประเทศไทย แผ่นหนังสีเหลืองข้างศีรษะ ไม่มีส่วนเชื่อมต่อระหว่างแผ่นหน้าและแผ่นหลัง ดังนั้น จึงเห็นแผ่นหนังสีเหลืองของนกขุนทองใต้ขาดจากกันเป็นสองส่วนอย่างชัดเจน มีถิ่นที่อยู่อาศัยเฉพาะทางภาคใต้ของประเทศไทยเท่านั้น

6. **นิวคลีโอไทด์ (Nucleotide)** หมายถึง หน่วยย่อยของดีเอ็นเอ หรืออาร์เอ็นเอ ประกอบด้วย เบสที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ [เพียวรีน (purine) ได้แก่ อดีนีน (adenine) และ กัวนีน (guanine) ไพริมิดีน (pyrimidine) ได้แก่ ไธมีน (thymine) และ ไซโตซีน (cytosine) สำหรับดีเอ็นเอ ส่วน ยูราซิล (uracil) และ ไซโตซีน (cytosine) สำหรับอาร์เอ็นเอ] โมเลกุลของฟอสเฟต และ โมเลกุลของน้ำตาล [ดีออกซีไรโบส (deoxyribose)ในดีเอ็นเอ และไรโบส (ribose)ในอาร์เอ็นเอ]

7. **Deoxyribonucleic acid** [DNA (ดีเอ็นเอ)] หมายถึง โมเลกุลที่เป็นรหัสข่าวสารทางพันธุกรรม ดีเอ็นเอ เป็นโมเลกุลที่มีสองเส้นเข้าคู่กันด้วยพันธะอย่างอ่อน ระหว่างเบสของนิวคลีโอไทด์ ในดีเอ็นเอมี นิวคลีโอไทด์ 4 ชนิด ประกอบด้วยเบสต่าง ๆ ดังนี้ อดีนีน (adenine; A), กัวนีน (guanine; G), ไซโตซีน (cytosine; C), และ ไธมีน (thymine; T) ในธรรมชาติคู่เบสจะสร้างพันธะอย่างอ่อน ระหว่าง A กับ T และ ระหว่าง G กับ C ดังนั้นลำดับของเบสต่าง ๆ ในแต่ละเส้นเดี่ยวนั้น สามารถทราบได้จากคู่ของมัน

8. **Base sequence** หมายถึง ลำดับของนิวคลีโอไทด์ ในโมเลกุลของดีเอ็นเอความยาวจะกำหนดเป็นคู่เบส

9. **ยีน (Gene)** หมายถึง ลำดับที่เป็นคำสั่งของนิวคลีโอไทด์ อยู่ในตำแหน่งที่เฉพาะบนโครโมโซมซึ่งเป็นรหัสสำหรับผลิตโปรตีน หรือ อาร์เอ็นเอโมเลกุล รวมทั้งบริเวณที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการแสดงออก และบริเวณที่เป็นรหัสสำหรับผลผลิตที่ทำหน้าที่เฉพาะ

10. **Polymorphism** หมายถึง ความแตกต่างของลำดับของ ดีเอ็นเอ ท่ามกลางสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด ความแตกต่างแปรผันทางพันธุกรรมที่เกิดขึ้นมากกว่า 1% ของระดับประชากรสามารถนำ polymorphism มาใช้ประโยชน์สำหรับ genetic linkage analysis

11. **เอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction enzyme)** หมายถึง โปรตีนที่ได้จากแบคทีเรีย (bacteria) ซึ่งมีคุณสมบัติพิเศษคือ จดจำอย่างจำเพาะต่อลำดับของนิวคลีโอไทด์ช่วงสั้นและตัดดีเอ็นเอที่ตำแหน่งนี้

12. **Restriction fragment length polymorphism (RFLP)** หมายถึง ความแตกต่างแปรผันทางพันธุกรรมของขนาดชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ ซึ่งเป็นผลจากลำดับของดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน ทำให้เอนไซม์ตัดจำเพาะ จดจำและตัดดีเอ็นเอได้ขนาดแตกต่างกัน

13. **Electrophoresis** หมายถึง วิธีการสำหรับการแยกสารชีวโมเลกุล เช่น ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ (DNA fragment), เป็ปไทด์ (peptide) หรือ โปรตีน (protein) ออกจากกันภายใต้สนามไฟฟ้า โมเลกุลจะเคลื่อนที่ผ่านตัวกลางในอัตราที่ต่างกัน ขึ้นอยู่กับประจุไฟฟ้าและขนาดของโมเลกุล ชิ้นส่วนที่มีขนาดเล็กจะเคลื่อนที่ได้ไกลกว่า ในตัวกลางอะกาโรสเจล (agarose gel) และอะคริลาไมด์เจล (acrylamide gel) เป็นตัวกลางที่ถูกนำมาใช้กันมากสำหรับอิเล็คโตรฟอรีซิสของโปรตีน และกรดนิวคลีอิค

14. **Restriction enzyme cutting site** หมายถึง ลำดับของนิวคลีโอไทด์ที่จำเพาะของดีเอ็นเอที่ซึ่งเอนไซม์ตัดจำเพาะ ตัดบริเวณนี้

15. **Recombination** หมายถึง กระบวนการที่ลูกหลานถูกทำให้เกิดขึ้นมาโดยการรวมตัวของ linked gene ที่ต่างกันของพ่อและแม่

16. **Deletion** หมายถึง การขาดหายไปของชิ้นส่วนโครโมโซม

17. **Insertion** หมายถึง การเพิ่มของชิ้นดีเอ็นเอเข้าไปในโครโมโซม

18. **Primer** หมายถึง สายสั้น ๆ ของโพลีนิวคลีโอไทด์ (polynucleotide) ที่มีรหัสเข้าคู่กับสายดีเอ็นเอที่ต้องการสร้าง และไปจับก่อน เพื่อให้นิวคลีโอไทด์ตัวใหม่สามารถถูกนำเข้ามาเพิ่มโดยเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอร์เรส (DNA polymerase)

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบว่านกขุนทองทั้ง 5 กลุ่ม มีความคล้ายคลึงกัน หรือแตกต่างกัน หรือห่างทางพันธุกรรมมากน้อยเพียงใด

2. ทราบความสัมพันธ์ระหว่างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ กับสัณฐานวิทยาของนกขุนทอง

บทที่ 2
วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

ชีววิทยาของนกขุนทอง

1. อนุกรมวิธานของนกขุนทอง

นักอนุกรมวิธานนกได้จัดจำแนกนกขุนทองตามหลักอนุกรมวิธานไว้ดังนี้

ชั้น Class Aves

อันดับ Order Passeriformes

วงศ์ Family Sturnidae

สกุล Genus *Gracula*

ชนิด Species 1. *religiosa* (Linnaeus 1758)

2. *ptilogenys* (Blyth 1946)

(ดัดแปลงจาก: Sibley and Momroe 1990, 785-848)

ที่มา: Sibley, Charle G., and Burt L. Monroe, Jr. 1990. **Distribution and taxonomy of birds of the world**. London: Yale University Press.

นกขุนทอง *Gracula religiosa* และ *G. ptilogenys* อยู่ในอันดับนกของโลก (world number) ที่ 1,725 และ 3,895 ตามลำดับ (Sibley and Monroe 1990, 785-848) สำหรับนกขุนทองที่มีแหล่งอาศัยในประเทศไทย มีชื่อสามัญเป็นภาษาไทย และอังกฤษ ว่า "นกขุนทอง" และ "Hill Mynah" ตามลำดับ และมีชื่อวิทยาศาสตร์เรียกว่า *Gracular religiosa* ซึ่งเป็นชนิดเดียวกันกับที่อยู่ในลำดับนกของโลกที่ 1,725 มีสองชนิดย่อย (subspecies) คือ *G. r. intermedia* และ *G. r. religiosa* เรียกชื่อเป็นภาษาไทย ว่า "นกขุนทองเหนือ" และ "นกขุนทองใต้" ตามลำดับ (มณี อัชวรานนท์ 2539, 3)

2. แหล่งอาศัยของนกขุนทอง

แหล่งอาศัยของนกขุนทองพบกระจายตามประเทศต่าง ๆ ในแถบเอเชียตั้งแต่อินเดีย ศรีลังกา พม่า จีนตอนใต้ ลาว กัมพูชา เวียดนาม ไทย มาเลเซีย อินโดนีเซีย และฟิลิปปินส์ โดยพบว่า นกขุนทองชนิด *G. ptilogenys* มีแหล่งอาศัยเฉพาะในศรีลังกา ส่วนนกขุนทองชนิด *G. religiosa* มีแหล่งอาศัยที่หลากหลาย และกระจายอยู่อย่างมากกว่า และใช้ชื่อของแหล่งอาศัยเพื่อประโยชน์ทางอนุกรมวิธานของนกขุนทองในระดับชนิดย่อย ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ชื่อชนิดย่อยของนกขุนทองที่สัมพันธ์กับแหล่งอาศัยต่าง ๆ

สกุล (Genus) ชนิด (Species) ชนิดย่อย (Subspecies)	แหล่งอาศัย
Gracula religiosa intermedia	จีน พม่า ไทยลาว เวียดนาม กัมพูชา
G. r. religiosa	ไทย มาเลเซีย
G. r. peninsularis	ทางทิศตะวันออกเฉียงเหนือของอินเดีย
G. r. indica	ทางทิศตะวันตกเฉียงใต้ของอินเดีย
G. r. andamanensis	หมู่เกาะอันดามันของอินเดีย
G. r. robusta	หมู่เกาะทางตะวันตกของอินโดนีเซีย
G. r. batuensis	หมู่เกาะทางตะวันตกของอินโดนีเซีย
G. r. venerata	หมู่เกาะทางตะวันออกของอินโดนีเซีย
G. r. mertensi	หมู่เกาะทางตะวันออกของอินโดนีเซีย
G. r. palawanensis	เกาะพาลาวันของฟิลิปปินส์
G. ptilogenys	ศรีลังกา

ที่มา: มณี อัชวรานนท์. 2539. นกขุนทองไทย.ใน **การเลี้ยงและขยายพันธุ์นกขุนทองไทย**, หน้า 3. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยรามคำแหง.

สำหรับนกขุนทองในประเทศไทยมีแหล่งอาศัยและทำรังในป่าทุกชนิด ได้แก่ ป่าดิบชื้น ป่าดิบแล้ง ป่าเบญจพรรณ รวมทั้งป่าที่ถูกทำลาย และป่าบนเกาะที่อยู่ห่างไกล (มณี อัชวรานนท์ 2539, 3-10)

3. ลักษณะรูปร่างภายนอกของนกขุนทอง

นกขุนทองในประเทศไทย มีขนสีดำเป็นมันเหลือบสีน้ำเงินอมม่วง มีจะงอยปากใหญ่แข็งแรงสีเหลืองส้ม มีแถบขนสีขาวที่ปีกทั้งสองด้าน ขนตรงบริเวณบนศรีษะมีลักษณะเหมือนหวีผมแสกกลาง ลักษณะรูปร่างภายนอกทั้งเพศผู้และเพศเมียคล้ายคลึงกัน (มณี อัชวรานนท์ 2539, 3-4)

มณี อัชวรานนท์ (2539, 4) ศึกษาความแตกต่างของนกขุนทองเหนือและนกขุนทองใต้ของประเทศไทย พบว่า มีลักษณะภายนอกที่เห็นเด่นชัดว่าแตกต่างกันคือ

1) แผ่นหนังสีเหลืองบริเวณด้านข้างของศรีษะแต่ละข้างซึ่งพาดตั้งแต่บริเวณใต้ตาไปจรดด้านหลังของนกขุนทองเหนือติดต่อเป็นแผ่นเดียวกัน ในขณะที่ของนกขุนทองใต้ขาดจากกันเป็นสองชิ้น

2) ขนาดของอวัยวะภายนอก ได้แก่ ขนาดลำตัวและศรีษะของนกขุนทองใต้มีขนาดใหญ่กว่า ปีก หาง ขา และจะงอยปาก ยาวและงุ้มกว่านกขุนทองเหนือ

ในการศึกษาความแตกต่างของสัณฐานวิทยานกขุนทองที่มีแหล่งอาศัยกระจายทั่วประเทศไทย (Manee Archawaranon and Pornchai Wongwasana 1998, 395) พบนกขุนทองกลุ่มใหม่ซึ่งมีลักษณะภายนอกแตกต่างจากนกขุนทองที่เคยมีรายงานว่ามีสองชนิดย่อย (subspecies) โดยจัดแบ่งนกขุนทองที่พบในประเทศไทยเพิ่มขึ้นอีกสามกลุ่มตามลักษณะของแผ่นหนังสีเหลือง (Manee Archawaranon and Pornchai Wongwasana 1998, 395; Manee Archawaranon and Bongkotrat Techatraisak 2002) ซึ่งจากเดิมมีเพียงสองชนิดย่อยเท่านั้น (มณี อัชวรานนท์ 2539, 2; Lekagul and Ruond 1991, 373-374; Robson 2000, 179, 413) ดังภาพที่ 2 และตารางที่ 4 คือ

กลุ่มที่ 1 นกขุนทองเหนือ (Northern group = N)

กลุ่มที่ 2 นกขุนทองเหนือกลาย (Modified Northern group = MN)

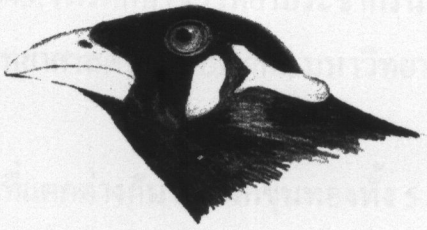
กลุ่มที่ 3 นกขุนทองกลุ่มผสม (Intermediate group = I)

กลุ่มที่ 4 นกขุนทองกลุ่มใต้กลาย (Modified Southern group = MS)

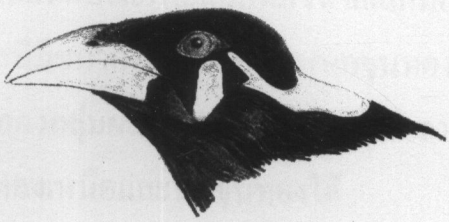
กลุ่มที่ 5 นกขุนทองใต้ (Southern group = S)

นกขุนทองเหนือ

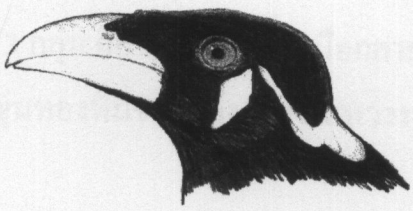
นกขุนทองเหนือกลาย



นกขุนทองกลุ่มผสม



นกขุนทองใต้กลาย



นกขุนทองใต้

ภาพที่ 2 ลักษณะแผ่นหนังสีเหลืองที่ใช้จำแนกนกขุนทองในประเทศไทยเป็น 5 กลุ่ม

ที่มา: พรชัย วงศ์วาสนา. 2543. การศึกษาชีววิทยาประชากรนกของขุนทองในประเทศไทย. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยรามคำแหง.

ตารางที่ 4 ลักษณะแผ่นหนังสีเหลืองที่ใช้จำแนกนกขุนทองในประเทศไทยเป็น 5 กลุ่ม

กลุ่มที่	ชื่อที่ใช้เรียก			เปอร์เซ็นต์เส้นเชื่อมแผ่นหนังสีเหลือ
	ภาษาไทย	ภาษาอังกฤษ	ตัวย่อ	ระหว่างแผ่นหน้าและแผ่นหลัง
1	นกขุนทองเหนือ	Northern group	N	100
2	นกขุนทองเหนือกลาย	Modified Northern group	MN	70-99
3	นกขุนทองกลุ่มผสม	Intermediate group	I	31-69
4	นกขุนทองใต้กลาย	Modified Southern group	MS	1-30
5	นกขุนทองใต้	Southern group	S	0

ที่มา: พรชัย วงศ์วาสนา. 2543. การศึกษาชีววิทยาประชากรนกของขุนทองในประเทศไทย. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยรามคำแหง.

ลักษณะภายนอกที่แตกต่างกันของนกขุนทองทั้ง 5 กลุ่ม ในประเทศไทยตามรายงานของ Manee Archawaranon and Pornchai Wongwasana (1998, 395) และ Manee Archawaranon and Bongkotrat Techatraisak (2002) สรุปได้ว่า นกกลุ่มที่ 1 นกขุนทองเหนือมีลักษณะภายนอกที่มีขนาดเล็กที่สุด และนกกลุ่มที่ 5 นกขุนทองใต้มีลักษณะภายนอกที่มีขนาดใหญ่ที่สุด ส่วนนกขุนทองกลุ่มใหม่ 3 กลุ่ม คือ นกขุนทองเหนือกลาย นกขุนทองกลุ่มผสม และนกขุนทองใต้กลาย เป็นนกขุนทองที่มีขนาดกึ่งกลางระหว่างนกขุนทองเหนือและนกขุนทองใต้

ค่าเฉลี่ยของ	นกขุนทองเหนือ	นกขุนทองกลุ่มใหม่	นกขุนทองใต้
ขนาดของศีรษะ (cm^2)	17.35	19.3	21.63
ปริมาตรของจะงอยปาก (cm^3)	0.67	0.84	1.15
ความโค้งของจะงอยปาก ($^\circ$)	5.68	6.85	8.19
น้ำหนักตัว (gm)	189.37	224.15	280.80
ความยาวลำตัว (cm)	18.52	20.13	22.68
รอบลำตัว (cm)	18.04	19.84	22.02
ความยาวปีก (cm)	16.49	17.53	18.18
ความยาวขา (cm)	3.28	4.37	4.62

ส่วนขนาดของแผ่นหนังสีเหลือง จากการศึกษารายงานไว้ว่า นกขุนทองกลุ่มใหม่ มีขนาดของแผ่นหนังสีเหลืองแผ่นหน้าใหญ่กว่าของนกขุนทองเหนือและนกขุนทองใต้ นกขุนทองเหนือมีหางที่ยาวกว่าของนกขุนทองใต้เมื่อเทียบอัตราส่วนขนาดของร่างกายที่เท่ากัน

ลักษณะภายนอกต่าง ๆ เหล่านี้ในระหว่างนกขุนทองทั้ง 5 กลุ่มมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.001$) ยกเว้นบางลักษณะของนกขุนทองเหนือ และนกขุนทองเหนือกลาย นกขุนทองใต้และนกขุนทองใต้กลาย ไม่ค่อยแตกต่างกัน เช่น ลักษณะของศีรษะ จะงอยปาก และลำตัว ของนกขุนทองเหนือและนกขุนทองเหนือกลาย ลักษณะของปีกและขาของนกขุนทองใต้และนกขุนทองใต้กลาย

พันธุศาสตร์ประชากร

1. ความหมายของพันธุศาสตร์ประชากร

พันธุศาสตร์ประชากร (Population genetics) เป็นแขนงวิชาที่ผสมผสานความรู้ด้านต่าง ๆ ทางพันธุศาสตร์ที่จะทำความเข้าใจเกี่ยวกับธรรมชาติของสิ่งมีชีวิตทั้งในด้านภาพรวมกว้าง ๆ และในด้านลึก เช่น กำเนิดของสิ่งมีชีวิตชนิดใหม่ ๆ การดำรงอยู่และการสูญพันธุ์ของเผ่าพันธุ์ต่าง ๆ ของสิ่งมีชีวิต แต่หลักสำคัญ คือ การศึกษาค้นคว้าหาความแตกต่างแปรผันทางพันธุกรรม (genetic variation)หรือความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) ของประชากรในแหล่งต่าง ๆ ของสปีชีส์ใดสปีชีส์หนึ่ง (วิสุทธิ์ ใบไม้ 2536, 426)

สำหรับการศึกษาด้านพันธุศาสตร์ประชากรอาจทำได้สองแนวทางคือ

1) ศึกษาค้นคว้าหาข้อมูลพันธุกรรมในประชากรโดยภาพรวม (Empirical population genetics) ซึ่งเกี่ยวกับความแตกต่างแปรผันทางพันธุกรรมในประชากรธรรมชาติ รวมทั้งการกระจายทางภูมิศาสตร์กายภาพและทางนิเวศวิทยา

2) ศึกษาทางทฤษฎีพันธุศาสตร์ประชากร (Theoretical population genetics) ซึ่งเกี่ยวกับการวิเคราะห์ทางคณิตศาสตร์เพื่อหาตัวแบบหรือโมเดล (model) ที่สามารถใช้อธิบายผลกระทบของกลไกจากปรากฏการณ์ธรรมชาติ เช่น การคัดเลือกตามธรรมชาติ

การเกิดยีนมิวเตชั่น การลดจำนวนประชากร เป็นต้น ที่มีผลต่อความแปรผันทางพันธุกรรม ซึ่งเป็นปัจจัยหลักที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต (วิสุทธิ์ ใบไม้ 2536, 433)

2. ความแตกต่างแปรผันเชิงพันธุกรรมในประชากร

2.1 คุณสมบัติของยีนหรือดีเอ็นเอ

2.1.1 ยีน หรือ ดีเอ็นเอ มีสมบัติเปลี่ยนแปลงได้ที่เรียกว่า mutation ซึ่งเกิดขึ้นในอัตราสม่ำเสมอ แต่ต่ำมากในสภาพแวดล้อมปกติ อัตราการเปลี่ยนแปลงของยีนจะสูงขึ้นโดยการชักนำด้วยปัจจัยต่าง ๆ

2.1.2 ยีน หรือ ดีเอ็นเอ ทำหน้าที่ควบคุมลักษณะกรรมพันธุ์ การควบคุมการแสดงออกของลักษณะกรรมพันธุ์ ซึ่งเป็นกระบวนการทางชีวเคมี มีการสื่อความหมายทางกรรมพันธุ์ในรูปแบบรหัสจากยีนไปสู่โปรตีน

2.1.3 เป็นหน่วยที่มีการสลับที่และรวมตัวกันใหม่ (recombination)

2.1.4 บางยีนมีความสามารถเคลื่อนที่ได้อย่างอิสระในจีโนม (genome) เรียกว่า transposable genetic elements (McDonal 1995, 123-125)

จากคุณสมบัติดังกล่าว ยีน หรือ ดีเอ็นเอ จึงเป็นเครื่องหมายที่ใช้ศึกษาคุณสมบัติทางชีววิทยาในแง่มุมต่าง ๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพมาก อย่างไรก็ตาม ยีนทุกยีนในจีโนมของสิ่งมีชีวิตมีคุณสมบัติไม่เหมือนกันทุกยีน บางยีนมีลักษณะคงที่และมีรูปแบบเดียว และถูกคัดเลือกให้ดำรงอยู่ในประชากรของสิ่งมีชีวิต เนื่องจาก เป็นยีนที่มีความสำคัญต่อการดำรงชีวิต ในขณะที่บางยีนมีลักษณะไม่คงที่และมีรูปแบบหลากหลาย และมีความเป็นกลาง (หรือไม่แน่นอน) ที่จะดำรงอยู่ในประชากรของสิ่งมีชีวิตเนื่องจากเป็นยีนที่ไม่มีความสำคัญต่อการดำรงชีวิต (วิสุทธิ์ ใบไม้ 2536, 487-496; 2538, 33-35)

รูปแบบที่หลากหลายของยีนส่วนใหญ่ ไม่แสดงออกในระดับลักษณะปรากฏ ซึ่งเป็นความแตกต่างแปรผันที่ซ่อนเร้นหรือแฝงอยู่ภายใน (hidden variation) (Hart and Clark 1989, 7) ทั้งนี้เนื่องจาก มีการเปลี่ยนแปลงเบสในบริเวณที่ไม่ได้เป็นรหัสในการสังเคราะห์กรดอะมิโน ที่เรียกว่า intron และมีการเปลี่ยนแปลงเบสในบริเวณ

ที่เป็นรหัสในการสังเคราะห์กรดอะมิโนที่เรียกว่า exon แต่เกิดในตำแหน่งที่สามของรหัสสามตัวที่เรียงต่อกันแต่ยังคงเป็นกรดอะมิโนตัวเดียวกันเมื่อผ่านกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนที่เรียกว่า translation แล้ว อย่างไรก็ตาม การสลับที่ และรวมตัวของยีนบางช่วง (gene recombination) แสดงออกที่ลักษณะปรากฏ และสามารถตรวจรูปแบบที่หลากหลายของยีนได้ แต่ไม่สามารถตรวจยีนที่เป็นต้นแบบที่ยังไม่การสลับที่และรวมตัวกันได้ (Crozier 1993, 166)

อย่างไรก็ตามรูปแบบที่หลากหลายของลักษณะปรากฏในประชากรธรรมชาติของสัตว์เป็นลักษณะที่เรียกว่า fitness traits (Zink 1997, 301) ซึ่งถูกควบคุมโดยยีนหลายชนิด และมีจำนวนมาก มีความซับซ้อนสูงจึงยากที่จะศึกษายีนที่ทำหน้าที่ควบคุมลักษณะดังกล่าวได้โดยตรง การศึกษาไมโตคอนเดรียลยีน หรือ ดีเอ็นเอ (mitochondrial gene หรือ DNA) จึงเป็นแนวทางเบื้องต้นเพื่อตรวจสอบรูปแบบที่หลากหลายได้

ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของสัตว์ มีคุณสมบัติพิเศษหลายประการที่มีแนวโน้มว่า จะตรวจพบรูปแบบที่หลากหลายได้ง่ายกว่า ดังนี้

1) โครงสร้างและการจัดระเบียบของยีนทั้งหมด (genome) ไม่ซับซ้อน เป็นเกลียวคู่อยู่ในสภาพวงกลมปิด (closed circular DNA) มีความยาวประมาณ 5 ไมโครเมตร มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 10-20 เมกะดาลตัน (Wallace 1982, 210) มีขนาดเล็กประมาณ 16 กิโลเบส (kb) ซึ่งเป็นผลจากการลดขนาดดีเอ็นเอ ในช่วงต้นของการวิวัฒนาการของสัตว์ เพื่อให้เหมาะสมกับหน้าที่ของดีเอ็นเอ (Brown et al. 1979, 1967)

2) อัตราการแทนที่ของเบสเร็วกว่าอัตราการแทนที่ของเบสที่เป็นยีนในนิวเครียส์ประมาณ 5-10 เท่า (Brown et al. 1979)

3) มีการเปลี่ยนแปลงแทนที่ของเบสเนื่องมาจาก substitution มากกว่า deletion หรือ insertion (Nei and Tajima 1981)

4) มีชุดของดีเอ็นเอหรือยีนจำนวนมากต่อหนึ่งเซลล์ หรือหนึ่งตัว (Strachan and Read 1996, 147; Quinn 1997, 5 quoted in Michaels et al. 1982; Robin and Wong 1988) ซึ่งทำให้ง่ายในการสกัดดีเอ็นเอ ออกมาศึกษา (Zhang and Hewitt

1996, 248)

5) มีการถ่ายทอด สารพันธุกรรมผ่านทางแม่ (maternal inheritance) เพราะไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ ของพ่อถูกลดหน้าที่ลงระหว่างการปฏิสนธิ (fertilization)หรือไม่มีการจำลองแบบตัวเอง (Mayer 1994, 226 quoted in Vaughn, DeBonte, and Brown 1980; Meland et al. 1991) หรือในสัตว์บางชนิดจะมีไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเออยู่ในส่วนกลางของตัวสเปิร์มซึ่งส่วนนี้ไม่ได้เข้าไปในไข่

6) มีสภาพเป็น 1n (effective haploidy) ซึ่งเป็นผลจากข้อ 4) และ 5) และพบว่า การถ่ายทอดไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอผ่านทางพ่อนั้นเกิดน้อยกว่า 1 ใน 25,000 โมเลกุลต่อชั่วอายุ (generation) (Lansman et al. 1983)

7) มักไม่พบ recombination (Smith and Brown 1988) ทำให้มีลักษณะเป็นหน่วยพันธุกรรมเดียว (single heritable unit) (Crozier 1993, 165-169)

8) เป็นตัวอย่างหนึ่งในการศึกษายีนหนึ่งตำแหน่ง (1 locus)ที่มีรูปแบบหลากหลายได้อย่างมีประสิทธิภาพ (White and Densmore, III 1992, 29)

9) เป็นโมเลกุลที่มีสองลักษณะร่วมกัน (Mosaic molecule) (Zhang and Hewitt 1996, 248) มีความหมายว่า บางบริเวณของลำดับดีเอ็นเอมีวิวัฒนาการเปลี่ยนแปลงเร็วกว่าซึ่งเป็นข้อได้เปรียบที่จะตรวจพบรูปแบบที่หลากหลายได้ ในขณะที่อีกบางบริเวณของลำดับดีเอ็นเอมีวิวัฒนาการเปลี่ยนแปลงช้ากว่า ซึ่งเป็นประโยชน์ที่นำมาตรวจสอบ ลำดับดีเอ็นเออนุรักษ์ (conserved sequence or consesus sequence)โดยการเทียบเคียง (alignment) ลำดับดีเอ็นเอจากแหล่งต่าง ๆ เพื่อออกแบบไพร์เมอร์ให้มีความจำเพาะต่อดีเอ็นเอที่ต้องการศึกษาในปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองที่เรียกว่า ปฏิกิริยาลูกโซ่ (Polymerase chain reaction - PCR)

2.2 การตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรม

Allele รูปแบบต่าง ๆ กันของแต่ละตำแหน่ง (locus) มีบทบาทลักษณะ ที่ปรากฏต่าง ๆ กัน ขึ้นอยู่กับสภาพของยีนที่อยู่ในประชากร ถ้าประชากรมีลักษณะปรากฏสองรูปแบบหรือมากกว่า จะสะท้อนให้เห็นว่า ประชากรนั้นมีรูปแบบของยีนที่ตำแหน่งหนึ่งมากกว่าสองรูปแบบด้วยเรียกประชากรที่มีสภาพเช่นนี้ว่าโพลีมอร์ฟิซึม (polymorphism) ในทางตรงกันข้ามของประชากรบางแห่งอาจมีรูปแบบของ allele ของ

ตำแหน่งนั้นเพียงอย่างเดียว เพราะมียีนอยู่ในสภาพโฮโมไซโกต (homozygote) สำหรับ allele นั้น ซึ่งเป็นผลทำให้มีลักษณะปรากฏเพียงรูปแบบเดียว เรียกประชากรที่มี สภาพเช่นนี้ว่า โมโนมอร์ฟีซึม (monomorphism) เมื่อได้ข้อมูลจากตำแหน่งที่ทดสอบได้มาคำนวณหาค่า โพลีมอร์ฟีซึม (polymorphism, P) และค่าเฮเทโรไซโกซิตี (heterozygosity, H) โดยที่ค่า P และค่า H ของประชากรของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดจะช่วยบอกให้ทราบความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรจากแหล่งต่าง ๆ (วิสุทธิ์ ใบไม้ 2536, 436-437)

หลักการตรวจสอบ คือ จะต้องหาให้ได้ว่าตำแหน่งของทุกยีน จะมี allele ที่ต่างกันอยู่มากน้อยเพียงไร และ allele ที่ต่างกันของแต่ละตำแหน่งนั้น มีสัดส่วนเป็นเท่าไรในประชากรนั้น

อย่างไรก็ตาม เทคนิคในทางปฏิบัติที่จะทำได้ คือ ตรวจสอบตำแหน่ง บางตำแหน่ง โดยถือว่า เป็นการสุ่มตัวอย่างจากยีนทั้งหมด (genome) แล้วนำมาหาค่า P และ H ซึ่งทั้งสองค่านี้จะทำให้ทราบว่าประชากรจากแหล่งต่าง ๆ มีความแตกต่างแปรผันทางพันธุกรรมมากน้อยเพียงใดในเชิงเปรียบเทียบเท่านั้นยังไม่ใช่ค่าที่แท้จริง

วิธีการอย่างหนึ่ง ที่ใช้ตรวจสอบความแตกต่างแปรผันทางพันธุกรรมของประชากรในระดับโมเลกุล คือ การใช้เทคนิคซับมารีนอะกาโรสเจลอิเล็คโตฟอรีซิส เพื่อวิเคราะห์ขนาดชิ้นส่วนของยีนหรือดีเอ็นเอในไมโตคอนเดรียจากการย่อยหรือตัด ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่าง ๆ

3. เอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction enzyme or restriction endonuclease)

พบว่าแบคทีเรียบางชนิด สามารถควบคุม (restrict) ไม่ให้มีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของ ไวรัส (bacteriophage) ที่บุกรุกเข้าไปในเซลล์ของแบคทีเรีย และพบว่าคุณสมบัติดังกล่าวเกิดจาก ฤทธิ์ หรือการทำงานของเอนไซม์กลุ่มหนึ่งในตัวแบคทีเรีย (โดยที่เอนไซม์เหล่านี้จะตัดดีเอ็นเอของไวรัสออกเป็นชิ้น ๆ ทำให้ดีเอ็นเอของไวรัสหมดสภาพที่จะเป็นแม่แบบเพื่อการแบ่งตัวต่อไป) จึงเรียกเอนไซม์เหล่านี้ว่า เอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme หรือ restriction endonuclease) (ทวีศักดิ์ ตีระวัฒนพงษ์ 2541, 41 อ้างถึงใน Bertani and Weigle 1953) อย่างไรก็ตาม พบว่าเอนไซม์เหล่านี้ใช้ตัด

ดีเอ็นเอได้ไม่ดี การทำงานของเอนไซม์ควบคุมไม่ได้ ตัดดีเอ็นเอนอกบริเวณที่เอนไซม์เข้าไปจับกับดีเอ็นเอ และตำแหน่งที่ตัดไม่แน่นอน

มีการค้นพบที่สำคัญของเอนไซม์ตัดจำเพาะ พบว่า เอนไซม์ตัดจำเพาะจากเชื้อ *Haemophilus influenza* สามารถตัดหรือย่อยดีเอ็นเอของไวรัสที่ตรงบริเวณเดิมทุกครั้ง และยังสามารถตัดดีเอ็นเอที่มากจากสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ ไม่ว่าเป็น จุลชีพ พืช สัตว์และคน ถ้ามีบริเวณจดจำอยู่บนดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตชนิดนั้น ๆ

การเรียกชื่อเอ็นไซม์ตัดจำเพาะเรียกตามชื่อของแบคทีเรียที่สร้างเอ็นไซม์ตัดจำเพาะชนิดนั้น ๆ โดยอักษรตัวแรกเป็นชื่อ สกุล (genus) ของแบคทีเรีย (ตัวเอน) อักษรสองตัวถัดมาเป็นอักษรสองตัวแรกของชนิด (species) อักษรถัดมาเป็นสายพันธุ์ (strain) ของแบคทีเรียนั้น ตัวสุดท้ายเป็นตัวเลขโรมันที่บอกถึงลำดับการค้นพบเอนไซม์นั้น ๆ ดังตารางที่ 5 ตัวอย่างเช่น เอนไซม์ *Eco* RI มาจาก *Escherichia (E) coli (co)* strain RY13 (R), first endonuclease (I)

ตารางที่ 5 ชื่อของเอนไซม์ตัดจำเพาะที่สัมพันธ์กับชื่อวิทยาศาสตร์ของจุลชีพที่สร้างเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดนั้น ๆ

Enzyme	Microbial source
Alu I	*Arthrobacter luteus*
Bam HI	*Bacillus amyloliquefacinces* H
Hae III	*Haemophilus aegyptius*
Hind III	*Haemophilus influenzae* b
Pst I	*Providencia stuartii*
Sal I	*Streptomyces albus*

ที่มา: ทวีศักดิ์ ตีระวัฒนพงษ์. 2541. Enzymatic manipulation of DNA and RNA. ใน **อณูชีววิทยาทางการแพทย์**, บรรณาธิการโดย นเรศร สุขเจริญ, อภิวัฒน์ มุทิรางกูร และ ยง ภู่วรวรรณ, หน้าที่ 43. กรุงเทพมหานคร: เท็กซ์ แอนด์ เจอร์นัล พับลิเคชั่น.

ในปัจจุบันเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ค้นพบและแยกสกัดจากแบคทีเรียต่าง ๆ มีมากชนิดขึ้นทุกขณะ อย่างไรก็ตามสามารถแบ่งเอนไซม์ตัดจำเพาะตามคุณสมบัติความต้องการ co-factor และวิธีการตัดดีเอ็นเอ ออกเป็น 3 ชนิด ดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 เอนไซม์ตัดจำเพาะทั้ง 3 ชนิด

	Type I	Type II	Type III
Example	*Eco*K	*Eco*RI	*Eco*P
Subunits	Three different	Two identical	Two different
Activity	Restriction, modification, topoisomerase, ATPase	Only restriction	Restriction, modification, ATPase
Cofactor requirements	Mg^{2+}, ATP, S-AdoMet	Mg^{2+}	Mg^{2+}, ATP, S-AdoMet
Recognition sequence	AACNNNNGTGC	GAATTC	AGACC
Position of cleavage	Variable and great distance from recognition site	Within the recognition site	25bp away from the recognition site

ที่มา: Pinggoud, Alfred, Jurgen Alves, and Robert Geiger. 1993. Restriction enzymes. In **Enzymes of molecular biology**, ed. Michael M. Burrell, 108. New Jersey: Humana Press.

ประเภทที่สอง (type II) เป็นเอนไซม์ตัดจำเพาะที่นำมาใช้ประโยชน์มากที่สุด แบ่งย่อยได้ตามจำนวนคู่เบสในบริเวณจดจำบนเส้นดีเอ็นเอ เช่น เรียกเอนไซม์ตัดจำเพาะที่สามารถตัดดีเอ็นเอในบริเวณจดจำที่มีเบสอยู่ 4 คู่ 6 คู่ และ 8 คู่ ว่า four cutter,

six base cutter, และ eight base cutter ตามลำดับ

ประโยชน์ของเอนไซม์ตัดจำเพาะ เนื่องจากดีเอ็นเอ จาก จุลชีพ พืช สัตว์ และคน จะมีส่วนประกอบพื้นฐานเหมือนกันหมด คือ เป็นกรดนิวคลีอิคที่มีส่วนประกอบเป็น 4 แบบ คือ กัวนีน (guanine), อะดีนีน (adenine), ไซโตซีน (cytosine), และไธมีน (thymine) ดังนั้น ดีเอ็นเอมีลักษณะเป็นแบบเดียวกัน และเอนไซม์ตัดจำเพาะไม่ว่าจะมาจากจุลชีพชนิดใดก็สามารถใช้ได้กับดีเอ็นเอที่มาจากต่างที่มาเสมอ

1) ทำให้เกิดศาสตร์ที่เรียกว่าพันธุวิศวกรรมขึ้น โดยใช้เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ และเอนไซม์ที่เกี่ยวกับการปรับแต่งดีเอ็นเอ ร่วมด้วย

2) นำไปใช้ศึกษาความแตกต่างแปรผันของขนาดความยาวของดีเอ็นเอ ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

4. เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่

เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่ (Polymerase chain reaction - PCR) เป็นเทคนิคการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของดีเอ็นเอเป้าหมายในหลอดทดลอง ซึ่งสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้เป็นล้าน ๆ เท่าภายในเวลาไม่กี่ชั่วโมงโดยอาศัยองค์ประกอบต่าง ๆ ดังนี้ คือ

4.1 ดีเอ็นเอแม่พิมพ์ (template DNA)

4.2 เอนไซม์เทอร์โมสเตเบิลดีเอ็นเอโพลิเมอร์เรส(Thermostable DNA polymerase)

4.3 ดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต ทั้ง 4 ชนิด (deoxyribonucleotide triphosphate - dNTPs)

4.4 ไพร์เมอร์ (primer) 1 คู่

4.5 บัฟเฟอร์ (buffer) ที่เหมาะสม

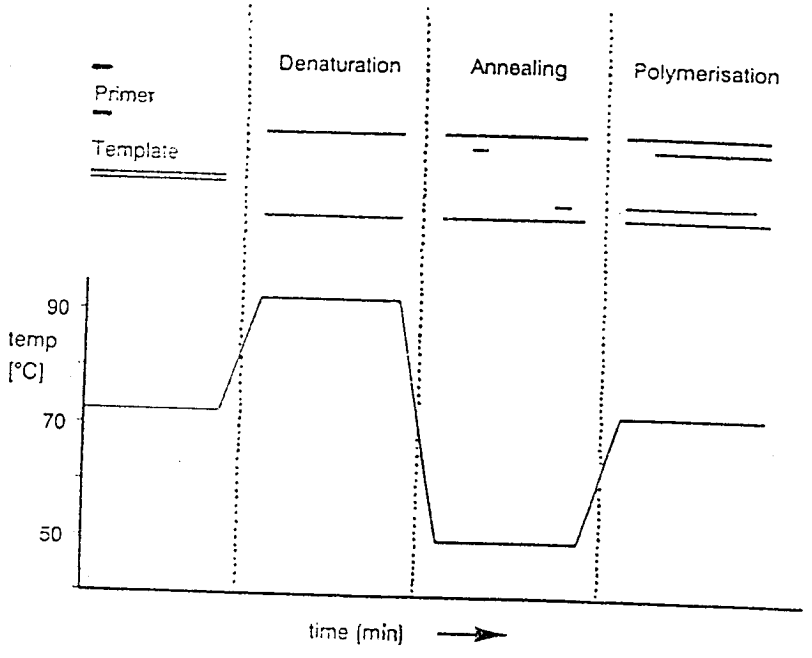
4.6 รอบของปฏิกิริยาการสังเคราะห์ดีเอ็นเอซึ่งจะเกิดต่อเนื่องซ้ำกันหลาย ๆ รอบ

ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ดีเอ็นเอหนึ่งรอบ ดังภาพที่ 3 มีสามขั้นตอน ได้แก่

(1) ขั้นตอนการเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้น เพื่อทำให้ ดีเอ็นเอสายคู่แยกเป็นสายเดียว เรียกขั้นตอนนี้ว่า denaturation

(2) ขั้นตอนการลดอุณหภูมิ เพื่อทำให้ไพร์เมอร์เกาะกับดีเอ็นเอสายเดี่ยว เรียกขั้นตอนนี้ว่า annealing

(3) ขั้นตอนการเพิ่มอุณหภูมิ เพื่อเร่งการทำงานของเอนไซม์ *tag* polymerase เรียกขั้นตอนนี้ว่า extension หรือ polymerization



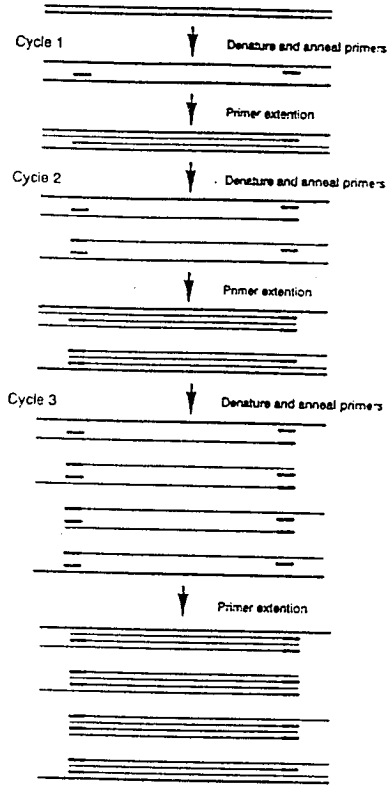
ภาพที่ 2 ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ 1 รอบ 3 ขั้นตอน

ที่มา: Landdgraf, Axel and Hriner Wolfes. 1993. Tag polymerase. In **Enzymes of molecular biology**, ed. Michael M. Burrel, 42. New Jersey: Humana Press.

การสังเคราะห์ดีเอ็นเอจะดำเนินตามลำดับ 3 ขั้นตอนซ้ำกันเป็นจำนวน 20-30 รอบ ทำให้เกิดเป็นดีเอ็นเอสายใหม่ซึ่งเรียกว่า ผลผลิตปฏิกิริยาลูกโซ่ (amplified or PCR product) จำนวนมากมาย ลักษณะการเพิ่มผลผลิตปฏิกิริยาลูกโซ่ จะเป็นแบบทวีคูณ (exponential) โดยหลังการทำ PCR จำนวน n รอบ ผลผลิตปฏิกิริยาลูกโซ่ ที่เกิดขึ้นตามทฤษฎีจะเท่ากับ 2^n

ดีเอ็นเอเส้นที่สร้างขึ้นใหม่ในรอบถัดไป ๆ จะทำหน้าที่เป็นแม่พิมพ์ (template)ให้ ไพเมอร์เข้ามาเกาะ และเป็น substrate ของ *tag* polymerase ซึ่งมีลักษณะคล้ายปฏิกิริยาลูกโซ่ (chain reaction) จึงเรียกปฏิกิริยาการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในหลอดทดลองว่า ปฏิกิริยาลูกโซ่ (polymerase chain reaction - PCR) ดังภาพที่ 3

จากเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้ไม่จำกัดจำนวนดังนั้น ดีเอ็นเอตั้งต้น หรือดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มจำนวน จึงเริ่มจากจำนวนน้อย ๆ ได้ และไม่จำเป็นต้องแยกดีเอ็นเอต้นแบบให้บริสุทธิ์ก่อน เพราะว่า ไพร์เมอร์ที่ใช้มีความจำเพาะกับดีเอ็นเอช่วงที่ต้องการจะเพิ่มจำนวน อย่างไรก็ตาม การเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอก็มีขอบเขตจำกัดคือ ถ้าทำปฏิกิริยาลูกโซ่ไปหลาย ๆ รอบ พบว่า ผลผลิตในรอบท้าย ๆ ไม่ได้เพิ่มแบบทวีคูณในระยะนี้เรียกว่า amplification plateau ซึ่งสาเหตุใหญ่ของการเกิด amplification plateau คือ dNTPs และไพร์เมอร์หมดไปจากปฏิกิริยาและ *tag* polymerase ถูก inactivate



ภาพที่ 3 หลักการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ แบบที่เรียกว่า ปฏิกิริยาลูกโซ่ (Polymerase chain reaction - PCR)

ที่มา: Landdgraf, Axel and Hriner Wolfes. 1993. Tag polymerase. In **Enzymes of molecular biology**, ed. Michael M. Burrel, 35. New Jersey: Humana Press.

5. เทคนิคซับมารีนอะกาโรสเจลอิเล็คโตรฟอรีซิส (submarine agarose gel electrophoresis)

เทคนิค ซับมารีนอะกาโรสเจลอิเล็คโตรฟอรีซิส เป็นเทคนิคการแยกสารด้วยกระแสไฟฟ้าใช้ตัวกลางค้ำจุน เป็นอะกาโรสเจล และอยู่ในสภาวะที่มีบัฟเฟอร์ ท่วมตัวกลางค้ำจุน โดยอาศัยหลักการที่ว่า สารที่มีประจุไฟฟ้า จะเคลื่อนที่ไปในสนามไฟฟ้า โดยเคลื่อนที่ไปยังขั้วไฟฟ้าที่มีประจุตรงกันข้ามกัน (สารที่มีประจุบวกจะเคลื่อนที่ไปหาขั้วลบ ส่วนสารที่มีประจุลบจะเคลื่อนที่ไปหาขั้วบวก) สารที่มีประจุไฟฟ้าต่างกันย่อมมีแรงเคลื่อนที่ไปในสมานไฟฟ้าต่างกัน ในกรณีที่สารมีประจุเท่ากัน สารที่มีขนาดโมเลกุลเล็กกว่ามักเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าสารที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ อัตราเร็วของการเคลื่อนที่ขึ้นอยู่กับ ปริมาณประจุสุทธิบนโมเลกุลของสารนั้น (อาภัสสรา ชมิดท์ 2537, 58-59) ดังนั้น การเคลื่อนที่ของสารผ่านอะกาโรสเจล จึงขึ้นอยู่กับปัจจัยสำคัญต่าง ๆ ดังนี้

1) ลักษณะของสารที่มีประจุไฟฟ้า

2) ความเข้มข้นของอะกาโรส

3) ส่วนประกอบของสารละลายที่ใช้ในระบบ (buffer)

4) กระแสไฟฟ้า

เนื่องจากโครงสร้างที่เป็นองค์ประกอบพื้นฐานทางเคมีของยีนหรือดีเอ็นเอ ในสิ่งมีชีวิตประกอบด้วย

(1) หมู่ฟอสเฟต (phosphate group)

(2) น้ำตาลที่มีธาตุคาร์บอน 5 อะตอมเป็นองค์ประกอบ ชนิดที่เรียก ว่า ดีออกซีไรโบส

(3) เบสที่มีธาตุไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ (nitrogeneous base) คือ เพียวรีน ได้แก่ อดีนีน และกัวนีน และไพริมิดีน ได้แก่ ไธมีน และไซโตซีน

ทั้ง 3 องค์ประกอบหลักเหล่านี้จะรวมตัวเป็นหน่วยพื้นฐานที่เรียกว่า ดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ (deoxyribonucleotide) ซึ่งมี 4 ชนิด แบ่งตามชนิดของเบสในข้อ (3) ที่เป็นองค์ประกอบของโครงสร้าง และแต่ละดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ ที่ทำหน้าที่เป็นสารพันธุกรรมในระบบของสิ่งมีชีวิตมีหมู่ฟอสเฟต (PO_4^{-}) มีประจุลบ ทำให้ดีเอ็นเอมีคุณสมบัติเป็นโมเลกุลที่มีประจุลบ จึงสามารถใช้เทคนิคชนิดนี้ เพื่อแยกหรือ

วิเคราะห์ส่วนของดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกันได้ โดยปรับความเข้มข้นของอะกาโรสเจล เพื่อให้เหมาะสมกับช่วงของขนาดดีเอ็นเอที่ต้องการวิเคราะห์ ทั้งนี้เนื่องจาก เจลที่มีความเข้มข้นสูงจะมีช่องว่างระหว่างโมเลกุลน้อย ทำให้ดีเอ็นเอเคลื่อนผ่านได้ช้ากว่าเจลที่มีความเข้มข้นต่ำ ดังนั้นเจลที่มีความเข้มข้นสูงจึงเหมาะที่จะใช้แยกดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็ก ในขณะที่เจลที่มีความเข้มข้นต่ำเหมาะกับการแยกดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่ ดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ความเข้มข้นของอะกาโรสเจลที่เหมาะสำหรับการแยกดีเอ็นเอขนาดต่าง ๆ

Amount of agarose in gel (%W/V)	Effective range of resolution of linear DNA fragments (kb)
0.5	1-30
0.7	0.8-12
1.0	0.5-10
1.2	0.4-7
1.5	0.2-3

ที่มา: วาสนา ศิริรังษี. 2539. Gel electrophoresis. ใน **วิทยาการทันสมัยในการตรวจวินิจฉัยโครโมโซมและยีน**, บรรณาธิการ โดย วสันต์ จันทราทิตย์, ปราณี ลี้ชนะชัย และวาสนา ศิริรังษี, หน้า 8-2. เชียงใหม่: พงษ์สวัสดิ์ การพิมพ์.

บัฟเฟอร์ในเทคนิคอิเล็คโตรฟอรีซิสประกอบไปด้วย EDTA กับ TRIS-acetate หรือ TRIS-borateที่มี pH ประมาณ 7.5-8.0

กระแสไฟฟ้าในการทำอิเล็คโตรฟอรีซิส มักจะทำในสภาวะแรงดันไฟฟ้าคงที่ โดยทั่วไปเมื่อใช้ค่า volt ที่พอเหมาะ ความเร็วในการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอที่เป็นเส้นตรง (linear DNA) จะแปรผันโดยตรงกับปริมาณ voltage

6. การใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะตรวจสอบลายพิมพ์ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอจีโนม (mt DNA genome)

การใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ ตรวจสอบลายพิมพ์ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอจีโนม เพื่อศึกษารูปแบบ (mt DNA haplotype)ที่หลากหลาย หรือความหลากหลายเชิงพันธุกรรมในประชากรของนก ได้มีผู้ทำการทดลองไว้ดังนี้

Avise and Zink (1988)ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 19 ชนิด ตรวจสอบลายพิมพ์ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอจีโนม เพื่อประเมินความห่างทางพันธุกรรม (genetic divergent) ของนกสี่คู่ที่มีอนุกรมวิธานที่ซับซ้อน ได้แก่ นก King Rail กับนก Clapper Rail (*Rallus elegan* กับ *R.longirostris*),นก Long-billed Dowitcher กับนก Short-billed Dowitcher (*Limnpdromus scolopaceus* กับ *L.griseus*), นก Boat-tailed Grackle กับนก Greatt-tailed Grackle (*Quiscalus major* กับ *Q.mexicanus*) และนก Tufted Titmice กับ นก Black-crested Titmice *(Parus bicolor bicolor* กับ *P. b. atricristatus*) พบรูปแบบ (mt DNA haplotype) แตกต่างกัน 77 รูปแบบจากประชากรทั้งหมด 53 ตัว พบว่า มีความห่างทางพันธุกรรม ในคู่ของ นก Rail เท่ากับ 0.06 ในคู่ของ นก Dowitcher เท่ากับ 0.082 ในคู่ของ นก Grackle เท่ากับ 0.016 และในคู่ของ นก Titmice เท่ากับ 0.004 นกทั้งสี่คู่แปดชนิด มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ใกล้ชิดกันมาก และมีค่ามากที่สุดที่คาบเกี่ยวกันกับที่เคยมีการศึกษาในนกชนิดอื่น ๆ ในระดับอนุกรมวิธานเดียวกัน

Avise and Nelson (1989) ตรวจสอบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของนก Dusky Seaside Sparrow (*Ammodramus maritimus*) 7 ชนิดย่อยในประชากรของประเทศสหรัฐอเมริกาจากพื้นที่ตลอดแนวชายฝั่งด้านที่ติดกับมหาสมุทรแอตแลนติค ซึ่งประกอบด้วยชนิดย่อย *A. m. maritima, A. m. macgillivraii, A. m pelonota*, และ *A. m. nigrescens* และ จากพื้นที่ตลอดแนวชายฝั่งที่ติดกับอ่าวเม็กซิโกซึ่งประกอบด้วยชนิดย่อย *A. m. fisheri, A. m. junicola*, และ *A. m. peninsulae* ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 18 ชนิด ตรวจสอบลายพิมพ์ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอจีโนม พบรูปแบบที่แตกต่างกัน 11 รูปแบบจากประชากรทั้งหมด 40 ตัว มีค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมสุทธิระหว่างกลุ่มเท่ากับ 0.0098 สามารถแบ่งประชากรออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ซึ่งสอดคล้องกับพื้นที่อาศัยตลอดแนวชายฝั่งทั้งสอง และพบว่า นกชนิดย่อย *A. m. nigrescens* ซึ่งเป็นชนิดย่อย

ที่สูญพันธุ์ไปแล้วเมื่อ ปี 1987 มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมอย่างใกล้ชิด กับนกอีกสามชนิดย่อยที่อาศัยอยู่ในพื้นที่ตลอดแนวชายฝั่งด้านที่ติดกับมหาสมุทรแอตแลนติค แต่มีความห่างทางพันธุกรรมอย่างมากกับนกอีกสามชนิดย่อยที่อาศัยอยู่ในพื้นที่ตลอดแนวชายฝั่งที่ติดกับอ่าวเม็กซิโก

Ball et al. (1988) สำรวจความแตกต่างแปรผันของบริเวณจดจำบนไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอจีโนม ของนก Red-winged Blackbird (*Agelaius phoeniceus*) ที่เก็บตัวอย่างจาก 14 มลรัฐในประเทศสหรัฐอเมริกา โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 18 ชนิด ตรวจสอบลายพิมพ์ เพื่อประเมินโครงสร้างประชากรเชิงภูมิศาสตร์ของสายพันธุ์ พบรูปแบบที่แตกต่างกัน 34 รูปแบบ จากตัวอย่างจำนวน 127 ตัว พบว่า ประชากรมีค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมเล็กน้อย มีรูปแบบที่จำเพาะกระจายอย่างกว้าง ๆ และมีความสัมพันธ์กัน คือ มีความแตกต่างทางด้านสัณฐานวิทยาระหว่างประชากรต่าง ๆ เพิ่มมากขึ้น แต่การแบ่งแยกเชิงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมมีเล็กน้อย และได้ศึกษาเปรียบเทียบข้อมูลไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ ระหว่างนก Red-winged Blackbird กับ Deermice (*Peromyscus maniculatus*) พบว่าโครงสร้างภายในประชากรของทั้งสองชนิดแตกต่างกันอย่างชัดเจน นก Red-winged Blackbird มีความแตกต่างทางพันธุกรรมที่ต่ำกว่า

Ball and Avise (1992) ศึกษาความแตกต่างสายพันธุ์เชิงภูมิศาสตร์ในประชากรของนก 6 ชนิดที่กระจายบนภาคพื้นทวีปอเมริกาเหนือ โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 16 ชนิด ตรวจสอบลายพิมพ์ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอจีโนม พบว่า 1) นก Downy Woodpecker (*Picoides pubescens*) มีรูปแบบแตกต่างกัน 5 รูปแบบ จากประชากร 51 ตัว และนก Mourning Dove (*Zenaida macroura*) มีรูปแบบแตกต่างกัน 4 รูปแบบจากประชากร 11 ตัว นกทั้งสองชนิดนี้มีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำ 2) นก Brown-headed Cowbird (*Molothrus ater*) มีรูปแบบแตกต่างกัน 6 รูปแบบจากประชากร 26 ตัว นก Song Sparrow (*Melospiza melodia*) มีรูปแบบแตกต่างกัน 5 รูปแบบจากประชากร 11 ตัว ซึ่งนกทั้งสองชนิดนี้มีความหลากหลายทางพันธุกรรมที่สูง แต่ไม่มีหลักฐานการแยกกันของประชากร 3)นก Rufous-sided Towhee (*Pipilo erythrophthalmus*) มีรูปแบบแตกต่างกัน 5 รูปแบบ จากประกร 19 ตัว และนก Common

Yellow Throat (*Geothlypis trichas*) มีรูปแบบแตกต่างกัน 10 รูปแบบจากประชากร 21 ตัว ซึ่งนกทั้งสองชนิดมีค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมที่สูงเช่นกัน และ มีการแบ่งแยก ที่ยาวนานระหว่างประชากรในมลรัฐวอชิงตัน คือ ประชากรตอนตะวันออกและตะวันตกของมลรัฐ พบว่า นก Rufous-sidedTtowhee มีรูปแบบที่สอดคล้องกับความแตกต่างทางพฤติกรรมและสัณฐานวิทยา ซึ่งแตกต่างกับ นก Spotted Towhee ที่อยู่ทางทิศตะวันตกซึ่งในอดีตเคยจัดเป็นชนิดที่ต่างกัน ทั้ง 6 ชนิดมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ใกล้ชิดกันมาก และไม่มีความแตกต่างของรูปแบบอย่างชัดเจน

Bermingham et al. (1992) ศึกษาความแตกต่างแปรผันทางพันธุกรรม ของนก Wood Warbler ในอเมริกาเหนือ 8 ชนิด (ได้แก่ *Dendroica townsensi, D. occidentalis , D. pensylvanuca, D. magnoli, D. nigrescens, D. viren, D. coronata* และ *D. auduboni*) เพื่อทดสอบตัวแบบของเมนเจล (Mengel's model) ซึ่งเชื่อว่า การเกิดธารน้ำแข็งที่เป็นวัฏจักร และการเคลื่อนตัวของภาคพื้นทวีปในสมัยเพลสโตซีน (Pleistocene) ของยุคควาเตอร์นารี (Quarternary) ทำให้แหล่งอาศัยของสิ่งมีชีวิตถูกแบ่งแยกและเปลี่ยนแปลงไป เป็นผลให้กลุ่มสิ่งมีชีวิตที่มีความสัมพันธ์เชิงอนุกรมวิธานที่ใกล้ชิดกันถูกแบ่งแยกตามแหล่งอาศัยที่ถูกแบ่งแยกออกจากกัน (vicariance) ซึ่งเป็นขั้นตอนหนึ่งที่จะนำไปสู่การกำเนิดสิ่งมีชีวิตชนิดใหม่ (speciation) และได้อธิบายว่าประชากรของนกสกุล (Genus) *Dendroica* ถูกแบ่งแยกเป็นกลุ่มตะวันออกและกลุ่มตะวันตกโดยที่กลุ่มตะวันตก ที่แยกตัวออกไปจะกำเนิดเป็นกลุ่มนกชนิดใหม่ต่าง ๆ ในอเมริกาเหนือ ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 18 ชนิด ตรวจสอบลายพิมพ์ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอจีโนม ของนก Wood Warbler ทั้ง 8 ชนิด พบรูปแบบแตกต่างกัน 18 รูปแบบจากประชากรทั้งหมด 35 ตัว พบว่า นกแต่ละชนิดมีความหลากหลายทางพันธุกรรม ยกเว้น นก *D. auduboni, D. magnoli* และ *D. pensylvanica* และพบว่าประชากรกลุ่มตะวันตกส่วนใหญ่ที่เป็นนกประจำถิ่นไม่เป็นไปตามตัวแบบของเมนเจล คือ เป็นประชากรผสมซึ่งไม่ได้มีต้นตอมาจากกลุ่มประชากรตะวันออก อย่างไรก็ตาม มีบางส่วนที่มีต้นตอจากกลุ่มประชากรตะวันออกด้วยซึ่งเป็นไปตามตัวแบบของเมนเจล

Gill et al. (1993) สำรวจความแตกต่างแปรผันทางพันธุกรรมภายใน และระหว่างประชากรของ นก Chickadee ในพื้นที่อเมริกาเหนือจำนวน 6 ชนิด ได้แก่

นก*Parus atricapillus* 6 ชนิดย่อย, นก *P. carolinensis* 5 ชนิดย่อย, นก *P. sclateri* 2 ชนิดย่อย,นก *P. gambeli* 2 ชนิดย่อย, นก *P. hudsonicus* 4 ชนิดย่อย, และนก *P. rufescens* 2 ชนิดย่อย ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 11-15 ชนิด ตรวจสอบลายพิมพ์ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอจีโนม ของนกทั้งหมด พบว่าในนกชนิด *P. atricapillus* มีรูปแบบแตกต่างกัน 9 รูปแบบจากประชากรจำนวน 83 ตัว มีเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของนิวคลิโอไทด์เท่ากับ 0.53±0.32 ในนกชนิด *P. carolinensis* มีรูปแบบแตกต่างกัน 14 รูปแบบจากประชากร 87 ตัวสามารถแบ่งประชากรเป็นสองกลุ่มใหญ่ ได้แก่ กลุ่มตะวันออก และกลุ่มตะวันตก โดยมีเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของนิวคลิโอไทด์เท่ากับ 0.45±0.21 และ0.40±0.13 ตามลำดับ ในนกชนิด *P. sclateri* มี 1 รูปแบบจากประชากร 8 ตัว ในนกชนิด *P. gambeli* มีรูปแบบแตกต่างกัน 2 รูปแบบ ในชนิดย่อย *P. g. baileyi* จากประชากร 5 ตัว และมี 1 รูปแบบในชนิดย่อย *P. g. gambeli*. ในนกชนิด *P. hudsonicus* มีรูปแบบแตกต่างกัน 8 รูปแบบจากประชากร 37 ตัว มีเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์เท่ากับ 0.46±0.19.ในนกชนิด *P. rufescens* มี 1 รูปแบบจากประชากร 10 ตัว และพบว่า ความหลากหลายของรูปแบบภายในชนิดอยู่ในช่วง 0.46-0.71 และมีค่าความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์ภายในอยู่ในช่วง 3±10-4 ถึง 27±10-4 ซึ่งเป็นค่าปกติที่ต่ำเช่นเดียวกับสัตว์มีกระดูกมีสันหลังอื่น ๆ มีค่าเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างชนิดอยู่ในช่วง 3-7

Klen and Brown (1994) ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 13 ชนิด ตรวจสอบลายพิมพ์ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอจีโนมของ นก Yellow Warbler (*Dendroica petechia*) เพื่อตรวจสอบประวัติวิวัฒนาการของประชากรที่เก็บตั้งอย่างจากทวีปอเมริกาเหนือ 4 แหล่ง, ทวีปอเมริกาใต้ 4 แหล่ง, ทวีปอเมริกากลาง 3 แหล่ง และหมู่เกาะอินดิสตะวันตก 12 แหล่งพบรูปแบบแตกต่างกัน 37 รูปแบบ จากประชากรทั้งหมด 149 ตัว มีเพียง 1 รูปแบบ ที่พบมากกว่าหนึ่งแหล่งที่เก็บตัวอย่างมาศึกษา เปอร์เซ็นต์ความแตกต่างทางพันธุกรรมอยู่ระหว่าง 0.14-3.17 และพบว่าไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ จากประชากรที่เป็นนกอพยพของทวีปอเมริกาเหนือมีความแตกต่างจากประชากรที่ไม่อพยพในเขตร้อนอย่างชัดเจน

Rising and Avise (1993) พบว่า มีความสอดคล้องร่วมกันระหว่างความสัมพันธ์เชิงสัณฐานวิทยา และความสัมพันธ์เชิงพันธุกรรมในประชากร 12 แหล่งของ

นก Sharp-tailed Sparrow (*Ammodramus caudacutus*) จากการวิเคราะห์ลักษณะสัณฐานวิทยา 25 ลักษณะ และ รูปแบบแตกต่างกัน 20 รูปแบบ (จากการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 17 ชนิด ตรวจสอบลายพิมพ์ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอจีโนม) สามารถแบ่งประชากรเป็น 2 กลุ่มใหญ่ที่แตกต่างกัน ได้แก่ กลุ่มเหนือและกลุ่มใต้ และ พบว่ามี 1 แหล่งที่มีประชากรของทั้งสองอยู่รวมกัน และมีจำนวนประชากรประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์ ที่อาจมีบรรพบุรุษเป็นลูกผสม (hybrid ancestry)

Robert and Dittman (1993) ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 7 ชนิด ตรวจสอบลายพิมพ์ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอจีโนม ของนก Song Sparrown (*Melospiza melodia*) ที่แพร่กระจายอยู่ตามแนวขวางของประเทศสหรัฐอเมริกา 19 ชนิดย่อย พบรูปแบบแตกต่างกัน 56 รูปแบบจากประชากร 29 พื้นที่ จำนวน 170 ตัว มีความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากรเท่ากับ 0.97 และมีเปอร์เซ็นต์ ความห่างทางพันธุกรรมโดยเฉลี่ยเท่ากับ0.53±0.22 ความแตกต่างแปรผันของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอไม่มีลักษณะเป็นโครงสร้างทางภูมิศาสตร์ และไม่สามารถใช้การวิเคราะห์ ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอเพื่อบ่งชี้ชนิดย่อยต่าง ๆ ได้ อย่างไรก็ตาม พบรูปแบบความแตกต่างแปรผันเชิงภูมิศาสตร์ของขนาดและสีขนของนก

Seutin et al. (1994) ศึกษาชีวภูมิศาสตร์เชิงประวัติศาสตร์ของ นก Bananaquit (*Coereba flaveola*) จากประชากรของหมู่เกาะคาร์ริบเบียน 12 เกาะ ที่ประกอบด้วย เกาะจาไมก้า (Jamaica), เปอร์โตริโก (Pueroto Rico), เซนต์ โทมาส (St. Thomas), มาร์ทินิค(Martimique), เซนต์ ลูเซีย (St. Lucia), เซนต์ วินเซนต์ (St. Vincent), และเกรเนดา (Grenada) และจาก 6 แหล่งบนภาคพื้นทวีปอเมริกากลาง และทางทิศเหนือของทวีปอเมริกาใต้ ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 16 ชนิด ตรวจสอบลายพิมพ์ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอจีโนม พบรูปแบบแตกต่างกัน 58 รูปแบบ พบว่า นก Bananaquit จากเกาะจาไมก้า มีความแตกต่างจากประชากรในพื้นที่อื่น ๆ มากที่สุดโดยมีค่าเฉลี่ยของรูปแบบระหว่างกลุ่มเท่ากับ 0.027 ทั้งสามกลุ่มประชากรจากอเมริกากลาง,ทางทิศเหนือของอเมริกาใต้ และทางทิศตะวันออกของหมู่เกาะแอนทิวส์ (เกาะเปอร์โตริโก ถึง เกาะเกรเนดา) มีค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่มเกือบเท่ากัน มีค่าเฉี่ยลเท่ากับ 0.014 ทางทิศตะวันออกของหมู่เกาะแอนทิวส์พบรูปแบบแตกต่างกัน 3 รูปแบบ

ในเกาะเปอร์โตริโก , เขตกลาง-เหนือของหมู่เกาะแอนทิวส์น้อย และเกาะเกรเนดา ถึงเกาะเซนต์ วินเซนต์ มีความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการที่ไม่ชัดเจน ประชากรจากหมู่เกาะเวอร์จิเนียของประเทศสหรัฐอเมริกาจนถึงเกาะเซนต์ ลูเซีย มีจุดกำเนิดทางพันธุกรรมที่เหมือนกัน และ รูปแบบที่พบกระจายตลอดพื้นที่เป็น ชนิดที่พบเฉพาะใน เขตกลาง-เหนือของหมู่เกาะแอนทิวส์น้อย ความแตกต่างแปรผันของรูปแบบตลอดภูมิภาคนี้สัมพันธ์กับการกระจายตัวของประชากรซึ่งแบ่งเป็นสองเส้นทาง เส้นทางแรก จากหมู่เกาะทางใต้สุดของเซนต์ ลูเซีย ผ่าน มาร์ทินิค จนถึง ดอมินิกา (Dominica) และเส้นทางที่สอง จากเกาะกวาเดอร์ลูพ (Guadeloupe) จนจรดทิศเหนือ ทำให้ประจักษ์ว่าประชากรมีการเปลี่ยนแปลงเป็นช่วงเวลาในขณะที่เข้าครอบครองพื้นที่ทางภูมิศาสตร์ แต่พื้นที่ทางภูมิศาสตร์ไม่มีการเปลี่ยนแปลง การกระจายของประชากรมีลักษณะต่อเนื่องกัน พบว่า ความสอดคล้องของความแตกต่างแปรผันระหว่างไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอกับลักษณะเชิงภูมิศาสตร์มีน้อย แต่มีความแตกต่างแปรผันของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ สอดคล้องกับการแบ่งแยกชนิดย่อยหลายชนิด และทำให้ประจักษ์ว่าแต่ละชื่อของชนิดย่อยไม่ได้กำหนดว่าต้องมีการเปลี่ยนแปลงทางวิวัฒนาการอย่างเท่ากัน

Seutin et al. (1993) วิเคราะห์ความแตกต่างแปรผันของบริเวณจดจำบนไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอจีโนมของนก Streaked Saltator (*Saltator albicolis*) ในประเทศปานามาซึ่งประกอบด้วย 2 ชนิดย่อย *S. a.isthmicus* และ *S. a. speratus*, ในประเทศเปรู มี 1 ชนิดย่อยคือ *S. a. immaculatus* และในหมู่เกาะ แอนทิวส์ซึ่งประกอบด้วย 2 ชนิดย่อย *S. a. guadelupensis* และ *S. a. albicollis* ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 13 ชนิด ตรวจสอบลายพิมพ์ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอจีโนม ของนกทั้ง 5 ชนิดย่อย พบ รูปแบบแตกต่างกัน 14 รูปแบบจากจำนวนประชากร 81 ตัว สามารถแบ่งประชากรเป็นสามกลุ่มใหญ่ได้โดยมีความสอดคล้องกับสภาพภูมิศาสตร์ มีค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรของปานามากับเปรู เท่ากับ 0.035 และระหว่างประชากรของหมู่เกาะแอนทิวส์น้อยกับปานามาและเปรูเท่ากับ 0.063 และพบว่าความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรชนิดย่อยบนแผ่นดินกับหมู่เกาะในประเทศปานามา (*S. a. isthmicus* กับ *S. a. speratus*) หรือระหว่างสองชนิดย่อยในหมู่เกาะแอนทิวส์น้อย (*S. a. albicollis*

กับ *S. a. guadelupensis*)ไม่มีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตามมีความแตกต่างทางพันธุกรรมที่สัมพันธ์กับความแตกต่างในระดับชนิดย่อยเพียงเล็กน้อย

Zink (1991) ศึกษาความแตกต่างแปรผันเชิงภูมิศาสตร์ของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ ในประชากรของ นก Fox Sparrow (*Passerella iliaca*) และ นก Song Sparrow (*Melospiza melodia*) ซึ่งทั้งสองชนิด เป็นนกที่อยู่ในแหล่งอาศัยเดียวกัน ในพื้นที่ด้านตะวันตกของประเทศสหรัฐอเมริกา ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 11 ชนิด ตรวจสอบลายพิมพ์ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอจีโนม ของนกทั้งสองชนิด พบรูปแบบแตกต่างกัน 5 รูปแบบ ในนก Fox Sparrow จากการเก็บตัวอย่าง 9 แหล่งจำนวน 46 ตัว สามารถแบ่งประชากรออกเป็นสองกลุ่มที่แตกต่างกัน คือ กลุ่มตะวันออกและกลุ่มตะวันตก และ พบว่าสองกลุ่มจะอยู่รวมกันในบริเวณ Great Basin กับ Seirra Nevada มีเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์ระหว่างกลุ่มเท่ากับ 0.086 และภายในกลุ่มเท่ากับ 0.08 และศึกษาเพิ่มเติมจากตัวอย่างอีก 43 ตัว ก็ได้ผลที่แบ่งประชากรเป็นกลุ่มตะวันออกและกลุ่มตะวันตกเช่นเดิม พบรูปแบบแตกต่างกัน 15 รูปแบบ ในประชากรนก Song Sparrow จากการเก็บตัวอย่าง 7 แหล่ง (ที่เหมือนกับนก Fox Sparrow) จำนวน 27 ตัว มีเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์โดยเฉลี่ยเท่ากับ 0.27 และไม่พบรูปแบบที่แปรผันเชิงภูมิศาสตร์และไม่มีหลักฐานที่จะแบ่งประชากรเป็นกลุ่มตะวันออกและกลุ่มตะวันตกเหมือนนก Fox Sparrow จากการวิเคราะห์ ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอทำให้ทราบว่า ประชากรของนกสองชนิดที่ครอบครองแหล่งอาศัยเดียวกันมีประวัติเชิงวิวัฒนาการที่แตกต่างกัน

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

ตัวอย่างนกขุนทอง

1.ใช้กลุ่มประชากรของนกขุนทองทั้ง 5 กลุ่ม ที่สถานีวิจัยสัตววิทยา (สวนนกรามคำแหง) มหาวิทยาลัยรามคำแหง วิทยาเขตบางนา

2.ใช้ประชากรของนกขุนทองในแต่ละกลุ่มโดยสุ่มตัวอย่างประมาณกลุ่มละ 3-5 ตัวภายในกรงเลี้ยงที่สถานีวิจัยสัตววิทยา (สวนนกรามคำแหง) มหาวิทยาลัยรามคำแหง วิทยาเขตบางนา

เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการวิจัย

1. เคมีภัณฑ์สำหรับการสกัดดีเอ็นเอแบบรวมทั้งหมด ได้แก่ สารเคมีที่ใช้เป็นส่วนประกอบของ STE buffer, tween 20, protease, sodium chloride, phenol, chloroform, isoamyl alcohol, absolute ethanol, sodium hydroxide, sodium acetate, 2-mercapto-ethanol, hydrochloric acid, และ glacial acetic acid.

2. เคมีภัณฑ์สำหรับปฏิกิริยาลูกโซ่ ได้แก่ 25 mM $MgCl_2$, 100 mM dNTPทั้ง 4 ชนิด, *tag* polymerase (5 unit/ul), forward primer 1 สาย, reverse primer 1 สาย, 10 x buffer, และ mineral oil.

3. เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในกระบวนการแยกสกัดดีเอ็นเอจากชุดแยกสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป (QAIquick gel extraction kit) ได้แก่ buffer QG (solubilization buffer), isopropanol, buffer PE (wash buffer), และbuffer EB (elution buffer).

4. เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่จะศึกษาได้แก่

4.1 เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Pst* I, *Bst* YI, *Bsa* JI, *Eae* I, *Eco* RI, *Hin* dIII,

Nla IV, *Sty* I, *Bam* HI, *Hae* III, *Avr* II, และ *Dra* I และบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมสำหรับเอนไซม์ตัดจำเพาะแต่ละชนิด.

4.2 เคมีภัณฑ์สำหรับการวิเคราะห์ขนาดของแถบดีเอ็นเอ ได้แก่ สารเคมี ที่ใช้เป็นส่วนประกอบของ TBE buffer, สารเคมีที่เป็นส่วนประกอบของ loading dye, ผงอะกาโรส, และethidium bromide และ ดีเอ็นเอมาตรฐาน ที่ใช้เปรียบเทียบกับขนาดดีเอ็นเอที่สกัดได้ และ ที่ใช้เปรียบเทียบกับขนาดดีเอ็นเอหลังการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแต่ละชนิดได้แก่ แลมบ์ดา ดีเอ็นเอ (λ-phage DNA) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ*Hin* dIII และ ดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างช่วงละ100 คู่เบส (100 bp DNA ladder)

เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

1. Thermal cycler
2. ตู้เย็น อุณหภูมิ - 80 องศาเซลเซียส และ - 20 องศาเซลเซียส
3. ตู้อบแห้ง
4. ตู้อบฆ่าเชื้อ (autoclave)
5. ตู้อบควบคุมอุณหภูมิ (incubator)
6. Submarine electrophoretic chamber
7. Power supply
8. UV-transilluminator
9. UV-spectrophotometer
10. Personal computer
11. Microwave
12. Vortex mixer
13. เครื่องวัดความเป็นกรดเบส
14. Centrifuge

15. กล้องถ่ายรูปพร้อมอุปกรณ์เสริมต่าง ๆ เพื่อบันทึกผลการทดลองที่ปรากฏเป็นแถบดีเอ็นเอบนแผ่นเจล

วิธีเก็บรวบรวมข้อมูลและสถิติที่ใช้ในการวิจัย

1. การเตรียมเนื้อเยื่อที่จะศึกษาหาแหล่งที่เหมาะสมในการสกัดดีเอ็นเอ

1.1 เลือด (blood)

1) ใช้เข็มที่สะอาดเจาะที่เส้นเลือกดำใต้ปีก และเก็บเลือดโดยใช้ heparinized micro-hematocrit capillary tube

2) ถ่ายเทเลือดลงในหลอดพลาสติกที่สะอาดขนาด 1.5 มิลลิลิตร และผสมกับ 0.1 M EDTA (20 ไมโครลิตรต่อเลือด 1 มิลลิลิตร)

3) เก็บรักษาเลือดจากข้อ 2) โดยผสมกับ 95% ethanol ในอัตราส่วน 1:3 (Martinez et al. 1998, 238) ที่ อุณหภูมิ - 80 องศาเซลเซียส

1.2 ขน (feather)

1) ถอนขนจากตัวนก นำมาล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้ว

2) นำไปแช่ใน absolute ethanol (Vigilant et al. 1989)

1.3 กล้ามเนื้อ (muscle)

1) นำนกทั้งตัวที่เก็บไว้ที่ตู้เย็น อุณหภูมิ - 80 องศาเซลเซียส ออกมาที่อุณหภูมิห้อง รอให้อุณหภูมิสูงขึ้น

2) วางนกลงบนภาชนะรองรับที่มีน้ำแข็งรองรับอยู่ด้านล่าง

3) ถอนขนบริเวณหน้าอกออก ล้างด้วย STE buffer (0.1 M NaCl, 0.001 M EDTA, 0.05 Tris- HCl, pH 7.5)ที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้วใช้ใบมีดและคีมคีบ (ที่สะอาดซึ่งผ่านการอบฆ่าเชื้อ) ตัดและดึงผิวหนัง ออก1 ข้าง ล้างด้วย STE buffer ที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อ

4) ตัดกล้ามเนื้อหน้าอกที่ต้องการออกมา 1 ข้าง ล้างด้วย STE buffer ที่ผ่านการ อบฆ่าเชื้อแล้ว และเก็บในภาชนะที่สะอาดที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อ

5) นำไปเก็บที่ตู้เย็น อุณหภูมิ - 80 องศาเซลเซียส (Kaufman et al.1995, 2)

2. การสกัดดีเอ็นเอ

2.1 หลักการ วิธีการ และขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอโดยทั่วไป

ศึกษาลักษณะที่เป็นธรรมชาติพื้นฐานทางชีวเคมีของเนื้อเยื่อที่จะนำมาสกัดดีเอ็นเอ ซึ่งจะเป็นสิ่งที่สำคัญในการกำหนดวิธีการและขั้นตอนแรก ๆ ที่เป็นรายละเอียดปลีกย่อยของกระบวนการสกัดดีเอ็นเอ ทั้งนี้เนื่องจากตำแหน่งที่บรรจุสารพันธุกรรมหรือดีเอ็นเอ อยู่ภายในเซลล์ตรงบริเวณที่เรียกว่า นิวเคลียส (nucleus) รวมทั้งอยู่ภายในโครงสร้างที่เรียกว่า ออร์แกนเนลล์ (organnelle) เช่น ไมโตคอนเดรีย (mitochondria) และยังเป็นแนวทางเบื้องต้นเพื่อหาเนื้อเยื่อที่เหมาะสมในการสกัดดีเอ็นเอ ที่สอดคล้องกับวัตถุประสงค์ของการวิจัยอีกด้วย

1) ทำให้เนื้อเยื่อเป็นชิ้นเล็ก ๆ หรือเป็นเซลล์เดี่ยว ๆ โดยวิธีทางกายภาพ และ หรือวิธีทางเคมี

2) ทำให้เซลล์แตกพร้อมกับการย่อยโปรตีนโดยใช้ detergent และ enzyme

3) กำจัดโปรตีนและส่วนที่ไม่ต้องการออกไป

4) ทำให้ดีเอ็นเอมีการละลายต่ำที่สุด

5) ตกตะกอนดีเอ็นเอ

6) เก็บตะกอนดีเอ็นเอ

7) ล้างตะกอนดีเอ็นเอ

8) ทำให้แห้ง

อย่างไรก็ตาม วิธีการและขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอของการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ เป็นวิธีการและขั้นตอน ที่ใช้สำหรับการสกัดดีเอ็นเอแบบรวมทั้งหมด (total genomic DNA หรือ total cellular DNA) โดยมีสมมุติฐานว่า จะมีดีเอ็นเอจากไมโตคอนเดรียถูกสกัดออกมาด้วย (ลินดา บุหงาเรือง 2539; ดวงพร สีหนันทวงศ์ 2540; อรอุมา ซองรัมย์ 2540; สุรเทพ ภู่ทอง 2541) จึงได้ทำการทดลองสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อ 3 ชนิด ได้แก่ ขน (feather), เลือด (blood), และกล้ามเนื้อ (muscle)

2.2 วิธีการและขั้นตอนการสกัด ดีเอ็นเอ จากขน (feather)

ขนนกขุนทองที่นำมาสกัดดีเอ็นเอ เป็นขนประเภท contour featherในตำแหน่งปีกและหาง ซึ่งมีคุณลักษณะทั้งทางกายภาพและชีวเคมีที่ต้องแยก การสกัดดีเอ็นเอออกเป็น การแยกสกัดดีเอ็นเอจากโคนขน และปลายขน ทั้งนี้เนื่องจาก ส่วนของโคนขนภายในมีเนื้อเยื่อเจริญบุอยู่ด้านใน (Gill 1989, 69) จึงเป็นแหล่งที่สามารถนำดีเอ็นเอออกมาศึกษาได้ง่าย ส่วนปลายขนเป็นเนื้อเยื่อที่มีความแข็งและเหนียวมาก เนื่องจากมีสารที่เรียกว่า ϕ keratin (Gill 1989, 81) เป็นองค์ประกอบอยู่ จึงเป็นแหล่งที่ยากที่จะนำดีเอ็นเอออกมาศึกษาได้

2.2.1 ขั้นตอนและวิธีการสกัดดีเอ็นเอ จากโคนขนโดยใช้เทคนิค salting-out เพื่อกำจัดสิ่งที่ไม่ต้องการ (โปรตีน)

1) นำโคนขน 2 อันจากที่เก็บไว้ใน absolute ethanol มาล้างด้วยน้ำที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อ แล้วล้างด้วย STE buffer

2) นำโคนขนวางบนจานแก้วที่สะอาด ใช้ใบมีดกรีดตามแนวยาวของโคนขน ดูด STE buffer ลงบนโคนขนให้ชุ่ม

3) ใช้ใบมีดขูดเนื้อเยื่อด้านในออกมา แล้วตักลงในหลอดพลาสติกขนาด 1.5 มิลลิลิตร

4) เติม STE buffer ประมาณ 300 ไมโครลิตร แล้วเติม สารละลาย protease ที่มีความเข้มข้น 50 mg/ml 20 ไมโครลิตร และเติม สารละลาย tween 20 ที่มีความเข้มข้น 20% v/v (pH 7.0) 50 ไมโครลิตร แล้วปรับปริมาตรให้ถึง 500 ไมโครลิตร ด้วย STE buffer เขย่าอย่างเบา ๆ เพื่อให้ผสมกันอย่างทั่วถึง (gently mix well)

5) นำไปบ่มที่ตู้อบอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน เขย่าอย่างเบา ๆ เพื่อให้ผสมกันอย่างทั่วถึง (gently mix well) เป็นบางครั้ง

6) เติม 6 M NaCl ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายประมาณ 2.6 M (Aljanabi and Martiinez 1997) หรือให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1.5 M (Martinez et al. 1998) เขย่าอย่างเบา ๆ เพื่อให้ผสมกันอย่างทั่วถึง (gently mix well) เป็นเวลา 15 นาทีแล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 1,3000 rpm เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

7) ดูดสารละลายที่อยู่ชั้นบน ลงในหลอดพลาสติกขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มี absolute ethanol ที่เย็นจัดบรรจุอยู่ โดยมีปริมาตรเป็น 2 เท่าของสารละลายในข้อ 6) อย่างเบา ๆ และช้า ๆ ปิดฝาให้สนิท ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 15-30 นาที หลังจากนั้น จึงเขย่าโดยการกลับหลอดไปมาหลาย ๆ ครั้ง แล้วจึงนำไปแช่ไว้ที่ตู้เย็น อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 24 ชั่วโมง (Kaufman et al. 1995, 3)

8) นำไปปั่นที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เทสารละลายทิ้งไป ก่อนเทสารละลายทิ้ง ให้สังเกตตำแหน่งตะกอนของดีเอ็นเอ หรือบริเวณที่น่าจะมีตะกอนดีเอ็นเอติดอยู่ (ประพนธ์ วิไลรัตน์ 2528, 92) โดยใช้เทคนิคของ Volkemanadt et al. (1993, 84) ดำเนินการโดยอย่าสัมผัสตะกอนดีเอ็นเอหรือบริเวณที่น่าจะมี ตะกอนดีเอ็นเอติดอยู่

9) ล้างด้วยสารละลาย 70% ethanol ที่เย็น 2 ครั้ง

10) ทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

11) เก็บไว้ในสภาพที่แห้ง ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.2.2 ขั้นตอนและวิธีการสกัด ดีเอ็นเอจากปลายขน โดยใช้เทคนิค salting-out เพื่อกำจัดสิ่งที่ไม่ต้องการ (โปรตีน)

1) นำปลายขน 2 อันจากที่เก็บไว้ใน absolute ethanol มาล้างด้วยน้ำที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อ แล้วล้างด้วย STE buffer

2) นำปลายขนวางบนจานกระจกที่สะอาด แล้วชุ่มด้วย STE buffer ใช้ใบมีดตัดปลายขนให้มีขนาดเล็กที่สุดเท่าที่จะทำได้ ตักลงในหลอดพลาสติกขนาด 1.5 มิลลิลิตร

3) เติม STE buffer ประมาณ 300 ไมโครลิตร แล้วเติมสารละลาย protease ที่มีความเข้มข้น 50 mg/ml 40 ไมโครลิตร และเติมสารละลาย tween 20 ที่มีความเข้มข้น 20% v/v (pH 7.0) 100ไมโครลิตร แล้วปรับปริมาตรให้ถึง 500 ไมโครลิตร ด้วย STE buffer เขย่าอย่างเบา ๆ เพื่อให้ผสมกันอย่างทั่วถึง (gently mix well)

4) นำไปบ่มที่ตู้อบอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 3-7 วัน นำออกมาบดด้วยแท่งแก้วเป็นบางครั้ง เขย่าอย่างเบา ๆ เพื่อให้ผสมกันอย่างทั่วถึง (gently mix well) เป็น บางครั้ง ในช่วงระหว่างเวลาที่อบอยู่ จะเติมสารละลาย Protease และสารละลาย

tween 20 ลงอีก (โดยมีปริมาตรเช่นเดียวกับข้อ 3))

5) ขั้นตอนต่อจากนี้ไปจะเหมือนกันกับขั้นตอนและวิธีการสกัดดีเอ็นเอ ข้อ 2.2.1 (ตั้งแต่ข้อ 6) ถึง ข้อ 11))

2.3 วิธีการและขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ จากเลือด (blood)

เนื่องจากเลือดเป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันธุ์ชนิดพิเศษโดยมี matrix เป็นของเหลวที่เรียกว่า plasma (วราภรณ์ กิจวิริยะ 2529, 39) และเซลล์เม็ดเลือดแดงของนกมีนิวเคลียส (nucleated erythrocyte) (Stevens 1996, 5) จึงถือว่าเป็นแหล่งที่จะสกัดดีเอ็นเอได้ง่าย

2.3.1 วิธีการและขั้นตอนการแยกสกัดดีเอ็นเอ จากเลือด (blood) โดยใช้เทคนิค salting-out เพื่อกำจัดสิ่งที่ไม่ต้องการ (โปรตีน)

1) ดูดเลือดที่ถนอมรักษาไว้ ลงหลอดพลาสติกขนาด 1.5 มิลลิลิตร 40 ไมโครลิตร เติม STE buffer ให้มีปริมาตรถึง 1000 ไมโครลิตร เขย่า และนำไปปั่นที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

2) เทสารละลายทิ้งไป และเติม STE buffer ประมาณ 300 ไมโครลิตร เติมสารละลาย protease ที่มีความเข้มข้น 50 ml/ml 20 ไมโครลิตร เติมสารละลาย tween 20 ที่มีความเข้มข้น 20% v/v (pH 7.0) 50 ไมโครลิตร และปรับให้มีปริมาตรถึง 500 ไมโครลิตรด้วย STE buffer แล้วเขย่าอย่างเบา ๆ เพื่อให้ผสมกันอย่างทั่วถึง (gently mix well)

3) นำไปบ่มที่ตู้อบ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน เขย่าอย่างเบา ๆ เพื่อให้ผสมกันอย่างทั่วถึง (gently mix well)เป็นบางครั้ง

4) นำไปปั่นที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้องแล้วเทชั้นบนทิ้งไป

5) ทำเหมือนข้อ 2) และนำไปบ่มที่ตู้อบ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่งโมง เขย่าอย่างเบา ๆ เพื่อให้ผสมกันอย่างทั่วถึง (gently mix well)

6) ขั้นตอนต่อไปจะเหมือนกันกับขั้นตอนและวิธีการสกัดดีเอ็นเอ ข้อ 2.2.1 (ตั้งแต่ข้อ 6) ถึง ข้อ 11))

2.4 วิธีการและขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ จากกล้ามเนื้อ (muscle)

เนื่องจากกล้ามเนื้อที่นำมาสกัดดีเอ็นเอ เป็นกล้ามเนื้อที่ใช้ในการบิน (muscle for flight) เนื้อเยื่อประกอบด้วย muscle fiber ชนิดต่าง ๆ โดยเฉพาะมี red fiber ที่มีศักยภาพสูงในกระบวนการ aerobic metabolism มี myoglobin, mitochondria, lipid และ เอนไซม์ต่าง ๆ ในวัฏจักรเครบส์อย่างมากมาย (Gill 1989, 88) จึงเป็นแหล่งที่จะนำดีเอ็นเอออกมาศึกษาได้ง่ายเช่นกัน

2.4.1 วิธีการและขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ จากกล้ามเนื้อ (muscle)โดยใช้วิธี salting-out เพื่อกำจัดสิ่งที่ไม่ต้องการ (โปรตีน)

1) ใช้มีดผ่าตัด ตัดกล้ามเนื้อให้เป็นชิ้นเล็กที่สุดเท่าที่จะทำได้ และชุ่มด้วย STE bufferที่เย็น

2) ชั่งให้ได้น้ำหนักประมาณ 0.05-0.06 กรัม

3) เติม STE buffer ประมาณ 500 ไมโครลิตร เติมสารละลาย protease ที่มีความเข้มข้น 50 mg/ml 40 ไมโครลิตร เติมสารละลาย tween 20 ที่มีความเข้มข้น 20% v/v (pH 7.0) 100 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรให้ถึง 1,000 ไมโครลิตรด้วย STE buffer และเขย่าอย่างเบา ๆ เพื่อให้ผสมกันอย่างทั่วถึง (gently mix well)

4) นำไปบ่มที่ตู้อบอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 65-70 ชั่วโมง เขย่าอย่างเบา ๆ เพื่อให้ผสมกันอย่างทั่วถึง (gently mix well) เป็นบางครั้ง

5) แบ่งสารละลายโดยให้มีปริมาตรลดลงครึ่งหนึ่ง ลงในอีก 1 หลอด

6) ขั้นตอนต่อไปจะเหมือนกันกับขั้นตอนและวิธีการสกัดดีเอ็นเอ ข้อ 2.2.1 (ตั้งแต่ข้อ 6) ถึง ข้อ 11))

2.4.2 วิธีการและขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ จากกล้ามเนื้อ (muscle)โดยใช้สารละลายฟีนอลเพื่อกำจัดสิ่งที่ไม่ต้องการ (โปรตีน)

1) ใช้มีดผ่าตัด ตัดกล้ามเนื้อที่ชุ่มด้วย STE buffer ให้เป็นชิ้นเล็กที่สุดเท่าที่ จะทำได้

2) ชั่งให้ได้น้ำหนักประมาณ 0.05-0.06 กรัม

3) เติม STE buffer ประมาณ 500 ไมโครลิตร เติมสารละลาย protease ที่มีความเข้มข้น 50 mg/ml 40 ไมโครลิตร เติมสารละลาย tween 20 ที่มีความ

เข้มข้น 20% v/v (pH 7.0) 100 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรให้ถึง 1,000 ไมโครลิตร ด้วย STE buffer และเขย่าอย่างเบา ๆ เพื่อให้ผสมกันอย่างทั่วถึง (gently mix well)

4) นำไปบ่มที่ตู้อบ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 65-70 ชั่วโมง เขย่าอย่างเบา ๆ เพื่อให้ผสมกันอย่างทั่วถึง (gently mix well)เป็นบางครั้ง

5) แบ่งสารละลายโดยให้มีปริมาตรลดลงครึ่งหนึ่ง ลงในอีก 1 หลอด

6) เติมสารละลาย ที่มีส่วนผสมของ phenol chloroform และ isoamyl alcohol (มีอัตราส่วนเป็น 25:24:1 โดยมีเทคนิคการใช้ ตามวิธีของ Hillis et al. (1990, 370))ให้มีปริมาตรเท่ากับปริมาตรของสารละลายในข้อ 5) (ประมาณ500 ไมโครลิตร) เขย่าอย่างเบา ๆ เพื่อให้ผสมกันอย่างทั่วถึง (gently mix well) เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นนำไปปั่นที่ ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

7) ดูดสารละลายชั้นบนที่มีสีใส (supernatant) ลงในหลอดพลาสติกขนาด 1.5 มิลลิลิตรที่สะอาด (ระวังการรบกวนชั้นที่เป็นสีขาวขุ่น ที่อยู่ระหว่างชั้นบนที่มีสีใสกับชั้นล่าง) โดยใช้เทคนิคของ Hillis et al. (1990, 339) แต่ได้กำจัดสิ่งที่ไม่ต้องการออกเพียงครั้งเดียว (ในข้อ 6))จะได้ปริมาตรของสารละลายสีใสประมาณ 350ไมโครลิตร

8) ใช้เทคนิคการสกัดกลับ “back-extracted” ซึ่งดัดแปลงจากวิธีการของ Maniatis (1982, 459)โดยการเติม TE buffer (0.001 M EDTA,0.01 M Tris-HCl,pH 7.8) ประมาณ 150 ไมโครลิตร เขย่าอย่างเบา ๆ เพื่อให้ผสมกันอย่างทั่วถึง (gently mix well) 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

9) ดูดสารละลายสีใสที่อยู่ด้านบน ของ ข้อ 8) รวมลงในหลอดที่เก็บสารละลายสีใสที่ได้จากข้อ 7)

10) เติมสารละลาย 3 M sodium acetate (pH 7.0) โดยให้มีปริมาตรเป็น 1/10 เท่าของของสารละลายใสในข้อ 9) เขย่าโดยการกลับหลอดไปมาอย่างเบา ๆ

11) ตกตะกอนด้วย absolute ethanol ที่เย็นจัด โดยใช้เทคนิคของ Kaufman et al. (1995, 3) ดำเนินการโดยดูดสารละลายที่ได้ในข้อ 10) ลงใน หลอดพลาสติกขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มี absolute ethanol ที่เย็นจัดบรรจุอยู่โดยมีปริมาตรเป็น 2

เท่าของสารละลายในข้อ 10) อย่างเบา ๆ และช้า ๆ แล้ว ปิดฝาให้สนิท ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 15-30 นาที หลังจากนั้นจึงเขย่าโดยการกลับหลอดไปมาหลาย ๆ ครั้ง แล้วจึงนำไปแช่ไว้ที่ตู้เย็น อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 24 ชั่วโมง

12) นำไปปั่นที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เทสารละลายทิ้งไป ก่อนเทสารละลายทิ้งให้สังเกตตำแหน่งตะกอนของดีเอ็นเอหรือบริเวณที่น่าจะมีตะกอนดีเอ็นเอติดอยู่ (ประพนธ์ วิไลรัตน์ 2528, 92) โดยใช้เทคนิคของ Volkemanadt et al. (1993, 84) ดำเนินการโดยอย่าสัมผัสตะกอนดีเอ็นเอ หรือบริเวณที่น่าจะมีตะกอนดีเอ็นเอติดอยู่

13) ล้างด้วยสารละลาย 70% ethanol ที่เย็น 2 ครั้ง

14) ทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

15) เก็บไว้ในสภาพที่แห้ง ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อรอการใช้งานต่อไป

3. การหาความเข้มข้น การตรวจสอบความบริสุทธิ์ และการตรวจสอบคุณลักษณะทางกายภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้

3.1 วิธีการหาความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอโดยวิธี UV-absorption

ใช้ UV- spectrophotometer โดยละลายดีเอ็นเอที่เก็บแห้งไว้ ด้วย TE buffer (0.001 M EDTA, 0.01 M Tris-HCl, pH 8.0) 40 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ข้ามคืน แล้วนำสารละลายดีเอ็นเอที่ต้องการทราบค่าความเข้มข้นมาเจือจาง โดยสุ่มเลือกค่าการเจือจางและวัดค่าการดูดกลืนของสารละลายดีเอ็นเอที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร นำค่าที่เครื่องอ่านได้มาคำนวณความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอ

จากสูตรที่ได้จากการอ่านสารละลายดีเอ็นเอเกลียวคู่ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใน cuvette กว้าง 1 เซนติเมตร ด้วย UV-spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตรได้ค่าเท่ากับ 1.00 (Karcher 1995, 109-110) จึงได้

DNA (ug/ml) = A_{260} reading number $\times$ (50ug/ml $\div$1 absorbant unit) $\times$ dilution factor

3.2 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ

จะทราบได้จาก ค่าอัตราส่วนของ A_{260}/A_{280} ถ้าเป็นดีเอ็นเอบริสุทธิ์ควรจะมีค่าอัตราส่วนของ A_{260}/A_{280} อยู่ในช่วง 1.85-2.00 (Kaufman et al. 1995, 4) หรือ เท่ากับ 1.80 (Hengen 1994) ถ้าเป็นดีเอ็นเอที่มีการปะปนของสารต่าง ๆ เช่น โปรตีน เอทีพี (ATP) ฟีนอล และ สารอะโรแมติกต่าง ๆ (aromatic molecules) จะมีค่าอัตราส่วนของ A_{260}/A_{280} น้อยว่า 1.8 (Harris 1987, 64)

3.3 การตรวจสอบคุณลักษณะทางกายภาพของดีเอ็นเอ

นำสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปตรวจสอบด้วยเทคนิค ซับมารีนอะกาโรสเจลอิเล็คโตรฟอรีซิส โดยเตรียมเจลอะกาโรส 0.8 % โดยชั่งผงอะกาโรส 0.8 กรัม ใส่ลงใน 0.5 x TBE buffer (45 mM Tris-borate, 1 mM EDTA เตรียมจาก 5 x TBE buffer) 100 มิลลิลิตร ละลายผงอะกาโรสให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟ ปล่อยให้สารละลายอะกาโรสมีอุณหภูมิลดลงประมาณ 60 องศาเซลเซียส เทลงในพิมพ์ให้มีความหนาประมาณ 0.5 เซนติเมตร ความยาว 10 เซนติเมตรแล้วจึงเสียบหวีลงไป รอให้เจลแข็งตัวประมาณ 30-45 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ดึงหวีออก แล้วนำแผ่นเจลวางลงในเครื่องอิเล็คโตรฟอรีซิส (electrophoretic chamber) ที่มี 0.5 x TBE buffer อยู่พอให้ท่วมเหนือเจลประมาณ 1 เซนติเมตร ผสมตัวอย่างดีเอ็นเอ กับ blue/orange 6 x loading dye (สารละลายดีเอ็นเอตัวอย่าง 5 ส่วนต่อ 1 ส่วนของ blue/orange 6 x loading dye) แล้วหยอดตัวอย่างดีเอ็นเอ ลงในช่องตรงร่องหวีของแผ่นเจล และต้องมีช่องไว้สำหรับหยอดดีเอ็นเอมาตรฐาน คือ แลมบ์ดาดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind* III (λ DNA/*Hind* III) (หยอดดีเอ็นเอของตัวอย่างให้เสร็จก่อนแล้วจึงหยอดดีเอ็นเอมาตรฐาน) เมื่อหยอดครบแล้วจึงปิดฝา แล้วเปิดให้กระแสไฟฟ้าไหลผ่านจากขั้วลบไปยังขั้วบวก โดยให้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์และปิดกระแสไฟฟ้าเมื่อสีของ bromophenol blue เคลื่อนที่ไปได้จนเหลือระยะทางอีกประมาณ 1 เซนติเมตรก่อนถึงปลายแผ่นเจล จึงนำไปย้อมในสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ที่มีความเข้มข้น ประมาณ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของ 0.5 x TBE buffer ประมาณ 10-15 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่นประมาณ 10-15 นาที นำแผ่นเจลไปตรวจสอบดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต และบันทึกผลเป็นรูปถ่ายเก็บไว้ จะทำให้ทราบว่า คุณลักษณะทางกายภาพเปลี่ยนแปลงหรือไม่ เช่น มีการ

ฉีกขาดของดีเอ็นเอที่สกัดได้หรือไม่ และยังทราบว่ามีสารอาร์เอ็นเอ (RNA) ปะปนมาด้วยหรือไม่ อีกทั้งยังสามารถคำนวณหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอได้ด้วย (Tammen, Cavanagh, and Jones 2000, 35) โดยการเปรียบเทียบความเข้มของสีเอธิเดียมโบรไมด์ที่ปรากฏเป็นแถบของคู่เบสดีเอ็นเอที่สกัดได้ กับแถบของคู่เบสดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน

4. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่ (Polymerase Chain Reaction - PCR)

4.1 ข้อได้เปรียบของการเลือกยีนไซโตโครมออกซิเดสบี ในไมโตคอนเดรียมาศึกษา

1) เป็นยีนที่เป็นรหัสสำหรับการสังเคราะห์โปรตีน มักไม่เกิดปรากฏการณ์การมีรูปแบบของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ มากกว่า 1 รูปแบบใน 1 เซลล์หรือ 1 ตัว (heteroplasmy) (Moritz, Dowling, and Brown 1987, 276)

2) ป้องกันความผิดพลาดที่ได้จากผลผลิตปฏิกิริยาลูกโซ่ ที่มีสาเหตุมาจากการจัดเรียงลำดับของยีนใหม่ (re- arrangement) ของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอจีโนม (Mindell et al. 1998) สำหรับการศึกษาผลผลิตปฏิกิริยาลูกโซ่ ที่เป็นดีเอ็นเอ ระหว่างยีนหรือหลายยีนต่อเนื่องกัน

3) มักไม่เกิด inter-molecular recombination (Moritz, Dowling, and Brown 1987, 278)

4) มีโอกาสพบลำดับดีเอ็นเออนุรักษ์ (conserved sequence หรือ consesus sequence) เนื่องจากเป็นยีนที่ทำหน้าที่สำคัญในกระบวนการหายใจระดับเซลล์ (วิสุทธิ์ ใบไม้ 2538, 33)

5) การแทนที่ของเบสเกิดขึ้นทั้งแบบ synnonymous และ non-synnonymous และมีอัตราการแทนที่ของเบสแบบ synnonymous เท่า ๆ กับยีนที่เป็นรหัสของการสังเคราะห์โปรตีนอีก 12 ชนิดใน ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอจีโนม ซึ่งถือว่าเป็นคุณลักษณะที่บ่งชี้สภาวะความเหมือนร่วมกัน (homogeneous pool) อย่างกว้าง ๆ ได้ (Moore and DeFilippis 1997, 107-109)

6) ในกลุ่มสัตว์มีกระดูกสันหลังประเภทนก มีการศึกษายีนชนิดนี้ มากกว่ายีนอื่น ๆ ทั้งในไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอจีโนม และนิวเคลียร์ดีเอ็นเอจีโนม โดยสังเกตได้จากการตีพิมพ์ในวารสารต่าง ๆ และมีข้อมูล (ที่เป็นลำดับการเรียงตัวของเบส) อยู่ในฐานข้อมูลของ GEN Bank จึงทำให้มีความชัดเจนและสะดวกที่จะนำมาศึกษา

4.2 ออกแบบไพร์เมอร์ที่จำเพาะกับยีนไซโตโครมออกซิเดส บี (cytochrome oxidase b gene (cyt.b))ในไมโตคอนเดรีย

หาลำดับเบสอนุรักษ์ของยีนไซโตโครมออกซิเดสบี จากสิ่งมีชีวิตใน Class Aves โดยการเทียบเคียงโดยใช้ผลการเทียบเคียงลำดับการเรียงตัวของเบส (sequence alignment) ตามการศึกษาของ Cicero and Johnson (1995, 550-551) และ Desjardins and Morais (1990, 601-616) ได้ ไพร์เมอร์1 คู่ คือ

1) forward primer (P_1)5′-cgg,atc,cct,tct,cgg,cat,c-3′

2) reverse primer (P_2)3′-ggg,tgt,gac,aag,ggg,att,tgc-5′

เพื่อคาดหมายผลผลิตจากปฏิกิริยาลูกโซ่ ขนาดประมาณ 700 คู่เบส

4.3 เพิ่มจำนวนยีนไซโตโครมออกซิเดสบี ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่และตรวจสอบด้วยเทคนิคซับมารีนอะกาโรสเจลอิเล็คโตรฟอรีซิส

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่ได้ใช้ความเข้มข้นของส่วนประกอบปฏิกิริยาลูกโซ่ และจัดสภาวะอุณหภูมิของปฏิกิริยา ดังนี้ (ดัดแปลงจาก Cicero and Johnson (1995, 549))

ส่วนประกอบของหนึ่งปฏิกิริยาลูกโซ่จะมีปริมาตรรวมสุดท้ายเท่ากับ 50 ไมโครลิตรประกอบด้วย ดีเอ็นเอแม่พิมพ์ประมาณ 50-100 นาโนกรัม dNTP ทั้ง 4ชนิด ชนิดละ 200 ไมโครโมล $MgCl_2$ 2 มิลลิโมล ไพร์เมอร์ข้างละ 1 ไมโครโมล *tag* polymerase 1 ยูนิต และ 1 x PCR buffer

สำหรับการจัดสภาวะอุณหภูมิของปฏิกิริยาลูกโซ่ ใช้เครื่องควบคุมอุณหภูมิตามเวลาที่กำหนดที่มีการทำงานเป็นวัฏจักร (thermal cycler) มี 3 ขั้นตอนดังนี้

1) มีอุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เวลา 5 นาที

2) มี 3 ขั้นตอนย่อยได้แก่

(1) มีอุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที

(2) มีอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที

(3) มีอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เวลา 1.5 นาที

ขั้นตอน (1), (2) และ (3) นี้จะดำเนินการเป็นวัฏจักร 30 รอบ

3) มีอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เวลา 10 นาที

เมื่อกระบวนการนี้สมบูรณ์แล้วนำไปเก็บไว้ที่ตู้เย็น อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส เพื่อรอการใช้งานต่อไป

การตรวจสอบผลผลิตจากปฏิกิริยาลูกโซ่ด้วยเทคนิคซับมารีนอะกาโรสเจลอิเล็คโตรฟอรีซิส มีเทคนิคซึ่งมีวิธีการเช่นเดียวกับการตรวจสอบคุณลักษณะทางกายภาพของดีเอ็นเอ (ข้อ 3.3) แต่เปลี่ยนความเข้มข้นของผงอะกาโรสเจลเป็น 2 เปอร์เซ็นต์ และเปลี่ยนสารละลายดีเอ็นเอมาตรฐานเป็นดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างช่วงละ100 คู่เบส (100 bp DNA ladder)

5. การสกัดผลผลิตปฏิกิริยาลูกโซ่จากอะกาโรสเจลโดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป ด้วยเทคนิคการแยกปั่น (QIAquick Gel Extraction Kit) ซึ่งมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

5.1 ตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (ขนาด 650 คู่เบส) จากเจล ด้วยมีดผ่าตัดที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้ว ใช้คีมคีบที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้วจับลงในหลอดพลาสติกขนาด 1.5 มิลลิลิตรที่ทราบน้ำหนักแล้ว

5.2 ชั่งหลอดที่บรรจุเจลในข้อ 5.1 เมื่อทราบน้ำหนักเจลแล้ว ให้เติม Buffer QG ให้มีปริมาตรเป็น 3 เท่าของของน้ำหนักเจล เช่น ชั่งเจลได้ 100 มิลลิกรัมต้องเติม Buffer QG 300 ไมโครลิตร (100 มิลลิกรัมมีค่าใกล้เคียงกับ 100 ไมโครลิตร)

5.3 นำไปบ่มที่ตู้อบ อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หรือบ่มจนกระทั่งเจลละลายจนหมด ระหว่างที่บ่มนำมาเขย่าด้วยเครื่อง vortex ทุก ๆ 2-5 นาที

5.4 เติมสารละลาย isopropanol ให้มีปริมาตรเท่ากับน้ำหนักเจล เช่น ถ้าน้ำหนักเจลเท่ากับ 100 มิลลิกรัมก็เติมสารลาย isopropanol 100 ไมโครลิตรแล้วเขย่าโดยกลับหลอดไปมา

5.5 เตรียมชุดดักจับดีเอ็นเอ (QIAquick spin column และหลอดรองรับขนาด 2 มิลลิลิตรที่สวมอยู่ด้านล่าง)

5.6 ดูดสารละลายในข้อ 5.4 ประมาณ 750-800 ไมโครลิตรลงใน QIAquick column ที่เตรียมไว้ในข้อ 5.5

5.7 นำไปปั่นที่ความเร็ว 13,000 rpm ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที

5.8 เทสารที่อยู่ในหลอดรองรับทิ้งไปแล้วใส่หลอดรองรับไว้ที่เดิม

5.9 ทำซ้ำจากข้อ 5.6-5.8 จนสารละลายในข้อ 5.4 หมด

5.10 เติม Buffer PE 750 ไมโครลิตรลงใน QIAquick spin column ปล่อยทิ้งไว้ประมาณ 2-5 นาที แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 13,000 rpm ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที

5.11 เทสารลายที่อยู่ในหลอดรองรับทิ้งไป แล้วใส่หลอดรองรับกลับที่เดิม นำไปปั่นที่ความเร็ว 13,000 rpm ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที

5.12 ย้าย QIAquick spin column ลงในหลอดพลาสติกขนาด 1.5 มิลลิลิตรที่สะอาด

5.13 เติม Buffer EB (10 mM Tris-Cl, pH 8.5) 20 ไมโครลิตรลงบริเวณ กลางแผ่นดักจับดีเอ็นเอที่อยู่ใน QIAquick spin column

5.14 ปล่อยทิ้งไว้ 1 นาทีแล้วจึงนำไปปั่นที่ความเร็ว 13,000 rpm ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที

5.15 นำ QIAquick spin column ออก เก็บส่วนที่เป็นสารละลายดีเอ็นเอไว้ที่ตู้เย็น อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส เพื่อรอการใช้งานต่อไป

6. การทำ Nested PCR เพื่อพิสูจน์ว่า ผลผลิตจากปฏิกิริยาลูกโซ่เป็นยีนไซโตโครมออกซิเดสบี

ใช้ ผลผลิตจากปฏิกิริยาลูกโซ่ ที่มีขนาดเท่ากับหรือใกล้เคียงกับที่ได้คาดหมายไว้ (จากข้อ 5) มาเป็นดีเอ็นเอแม่พิมพ์ และดำเนินการเหมือนกับข้อ 4. ยกเว้นลำดับการเรียงตัวของ reverse primer จะเปลี่ยนไปเป็น 5′-gg,gtt,gtc,tac,gga,gaa-3′ (Cicero and Johnson 1995, 550-551) ซึ่งเป็นลำดับการเรียงตัวของเบสภายในสายของยีนไซโตโครมออกซิเดสบี เพื่อเป็นการทดสอบว่าจะได้ผลผลิตจากปฏิกิริยาลูกโซ่ตามที่ได้คาดหมายไว้ (ประมาณ 450 คู่เบส) หรือไม่

7. การใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ เพื่อตรวจสอบลายพิมพ์ ยีนไซโตโครมออกซิเดสบี

ใช้ดีเอ็นเอ (ที่สกัดได้จากชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป) ประมาณ 50-70 นาโนกรัม เพื่อย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 5-10 ยูนิตหรืออาจมากกว่านี้ ในปฏิกิริยาการย่อยนี้จะมีบัฟเฟอร์ที่ใช้สำหรับเอนไซม์แต่ละชนิดผสมอยู่ เติมน้ำกลั่นเพื่อปรับปริมาตรสุดท้ายของปฏิกิริยา ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มที่ตู้อบอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 12-16 ชั่วโมงหรืออาจมากกว่านั้น (เพิ่มเป็น 24 ชั่วโมง) ซึ่งการจัดสภาพที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ตัดจำเพาะแต่ละชนิดดัดแปลงจากคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิตเอนไซม์ตัดจำเพาะ (New England Biolabs 1990)

นำดีเอ็นเอจากนกขุนทองแต่ละกลุ่มทดลองตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะได้แก่ *Pst* I, *Bst* YI, *Bsa* JI, *Eae* I, *Eco* RI, *Hin* dIII, *Nla* IV, *Sty* I, *Bam* HI, *Hae* III, *Avr* II, และ *Dra* I

(http: //genome-www2.stanford.edu/cgi- in/AtDB/PATMATCH/RestritionMapper)

ตรวจสอบผลโดยเทคนิคซับมารีนอะกาโรสเจลอิเล็คโตรฟอรีซิส มีเทคนิควิธีการเช่นเดียวกับการตรวจสอบคุณลักษณะทางกายภาพของดีเอ็นเอ (ข้อ3.3)แต่เปลี่ยนความเข้มข้นของผงอะกาโรสเป็น 2 เปอร์เซ็นต์และเปลี่ยนสารละลายดีเอ็นเอมาตรฐานเป็นดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างช่วงละ100 คู่เบส (100 bp DNA ladder)

8. รวบรวมและคัดเลือกรูปแบบแถบดีเอ็นเอที่ให้ polymorphism มากที่สุดและตรวจสอบผลที่เป็นขนาดของแถบดีเอ็นเอ

ใช้วิธีการของ Adams et al. (1992, 600) โดยการวัดระยะทางของแถบดีเอ็นเอตัวอย่างและระยะทางของแถบ ดีเอ็นเอ มาตรฐาน (100 bp DNA ladder) ที่เคลื่อนไปในบนแผ่นเจล (จากภาพอัดขยาย) สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างระยะทางและขนาดโมเลกุลของ 100 เบสแพร์ดีเอ็นเอแลดเดอร์ในกระดาษกึ่งลอกแล้วเปรียบเทียบขนาดตามระยะทางของแถบดีเอ็นเอตัวอย่าง

จำแนกรูปแบบของยีนไซโตโครมออกซิเดสบี ของนกขุนทองแต่ละตัวโดยอาศัยแถบดีเอ็นเอต่าง ๆ ที่ได้ภายหลังการตรวจสอบลายพิมพ์ ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

9. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของรูปแบบแถบดีเอ็นเอ จากนกขุนทองตัวอย่าง

จากข้อมูลที่เป็นประเภทรูปแบบที่แตกต่างกันของขนาดชิ้นส่วนที่ปรากฏเป็นแถบดีเอ็นเอ มีสูตรที่ใช้คำนวณความแตกต่างแปรผันที่เกิดขึ้น โดยอาศัยพื้นฐานจากข้อสมมุติที่ว่า

1) นิวคลีโอไทด์มีการกระจายอย่างสุ่มในจีโนม

2) ความแตกต่างแปรผันที่เกิดขึ้น เกิดจากการแทนที่ของเบสครั้งละ1ตัว

3) อัตราการแทนที่ของเบสเหมือนกันในนิวคลีโอไทด์ทุกชนิด

4) แถบหรือชิ้นส่วนดีเอ็นเอต่าง ๆ ที่สามารถตรวจสอบได้นั้น ถ้าเป็นแถบที่เหมือนกัน (similar band)จะไม่ถูกนับหรือถูกให้คะแนน เพราะมีความเหมือนเป็นอันหนึ่งอันเดียวกัน ไม่แตกต่างกัน (identical) (Zoelzel and Bancroft 1992, 297)

คำนวณหาค่าความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยโปรแกรมสำเร็จรูป REAP version 4.0 (The Restriction Enzyme Analysis Package version 4.0)

บทที่ 4

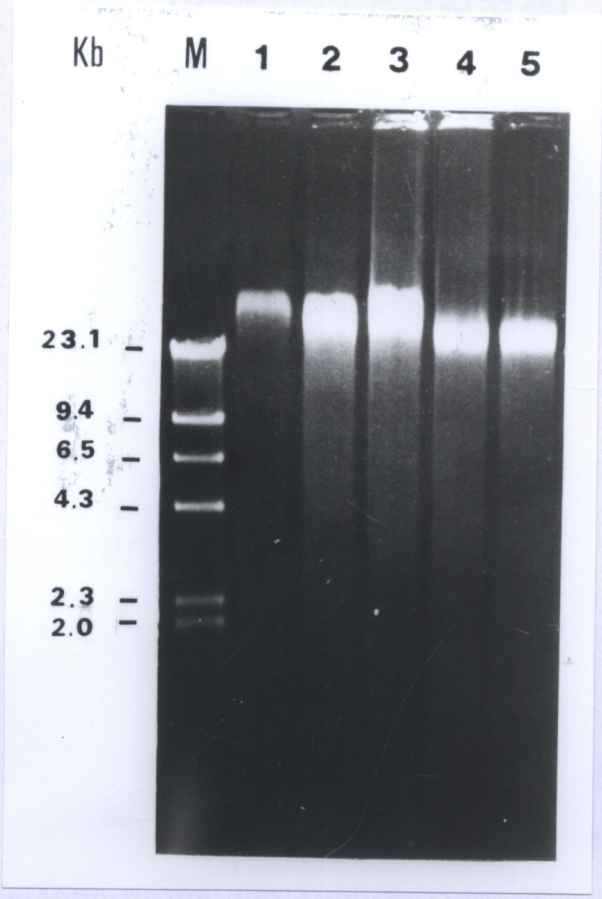
ผลการทดลอง

ผลการสกัดดีเอ็นเอแบบรวมทั้งหมด

ผลการสกัดดีเอ็นเอแบบรวมทั้งหมดจากการใช้เทคนิค salting out เพื่อกำจัดโปรตีน เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิคซับมารีนอะกาโรสเจลอิเล็คโตรฟอรีซิสพบว่า ดีเอ็นเอจากแหล่งที่เป็น กล้ามเนื้อ เลือด และโคนขน มีขนาดประมาณ 2.3 กิโลเบส มีปริมาณดีเอ็นเอมาก คุณภาพดีและมีคุณลักษณะทางกายภาพดี ดังภาพที่ 4, 5, และ 6 ตามลำดับ ส่วนแหล่งที่เป็นปลายขนไม่มีดีเอ็นเอ หรือมี แต่อาจน้อยมากซึ่งวิธีการดังกล่าวไม่สามารถที่จะตรวจสอบได้ หรืออาจมีดีเอ็นเอมาก แต่ไม่สามารถ สกัดดีเอ็นเอ ออกมาได้ ดังภาพที่ 7

อย่างไรก็ตาม มีผลลัพธ์ที่ต้องทำให้ใช้วิธีการอื่นเพื่อกำจัดโปรตีนคือ ตะกอนดีเอ็นเอจากแหล่งกล้ามเนื้อที่ได้จากการสกัดดีเอ็นเอแบบรวมทั้งหมดจากการใช้เทคนิค salting out มีลักษณะเป็นสองชั้นเมื่อละลายด้วย TE buffer หรือน้ำกลั่นแล้วจะยังมีตะกอนอีกชั้นหนึ่งที่เหลืออยู่ซึ่งไม่ละลาย และเมื่อพยายามทำให้ละลายจะแตกตัวเป็นตะกอนสีขาวขุ่นขนาดเล็ก ๆ ดังนั้น จึงเปลี่ยนเป็นการใช้สารละลายฟีนอล แทน ประกอบกับแหล่งที่เป็นเลือดและโคนขนนั้น ต้องรบกวนนกและทำให้นกอยู่ในสภาวะเครียด จึงใช้กล้ามเนื้อหน้าอกของนกขุนทองที่เสียชีวิตแล้วมาศึกษาซึ่งมีจำนวนนกอยู่พอควร และสามารถนำมาศึกษาได้ ผลการสกัดดีเอ็นเอจากกล้ามเนื้อหน้าอกซึ่งเป็นกล้ามเนื้อที่ใช้ในการบินให้ผลลัพธ์ที่เห็นว่า มีดีเอ็นเอมาก มีคุณภาพใช้ได้จากการตรวจสอบด้วยเทคนิคซับมารีนอะกาโรสเจลอิเล็คโตรฟอรีซิส ดังภาพที่ 8 และเมื่อนำไปตรวจสอบด้วย UV-spectrophotometer ซึ่งให้ผลส่วนใหญ่มีปริมาณดีเอ็นเอแตกต่างกันไปบ้างแต่ก็มีคุณภาพส่วนมากดีใกล้เคียงกัน ดังภาพที่ 9 และตารางที่ 8 และตะกอนดีเอ็นเอที่ได้มีลักษณะค่อนข้างใส เมื่อละลายด้วย TE buffer หรือน้ำกลั่นแล้วละลายหมด

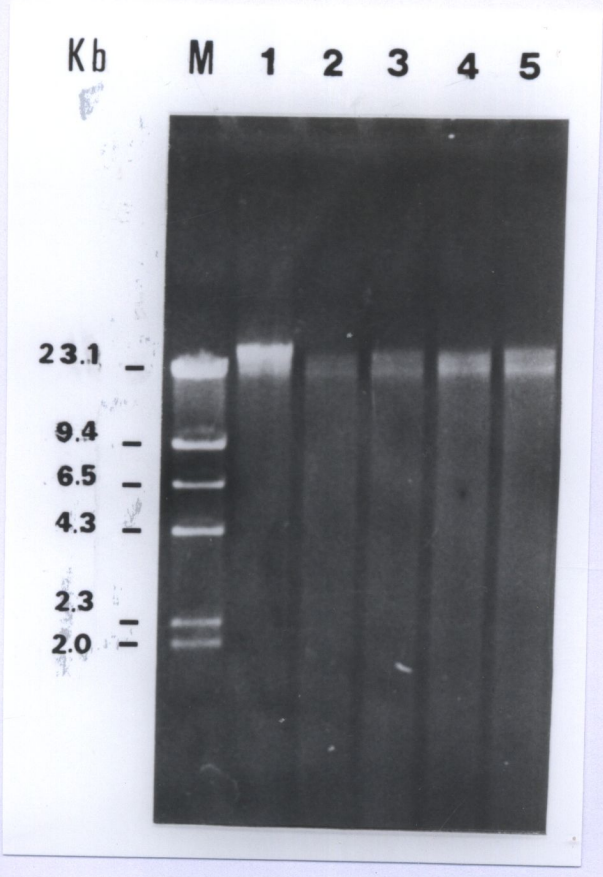
ดังนั้น แหล่งที่เป็นกล้ามเนื้อและวิธีการสกัดดีเอ็นเอโดยใช้สารละลายฟีนอลเพื่อกำจัดโปรตีนจึงมีความเหมาะสม



แถวที่ M หมายถึง ดีเอ็นเอมาตรฐาน (Lambda DNA/*Hin*d III Markers)

แถวที่ 1-5 หมายถึง ดีเอ็นเอแบบรวมทั้งหมด จากตัวอย่าง นกขุนทองเหนือ นกขุนทองเหนือกลาย นกขุนทองกลุ่มผสม นกขุนทองใต้กลาย และนกขุนทองใต้ ตามลำดับ

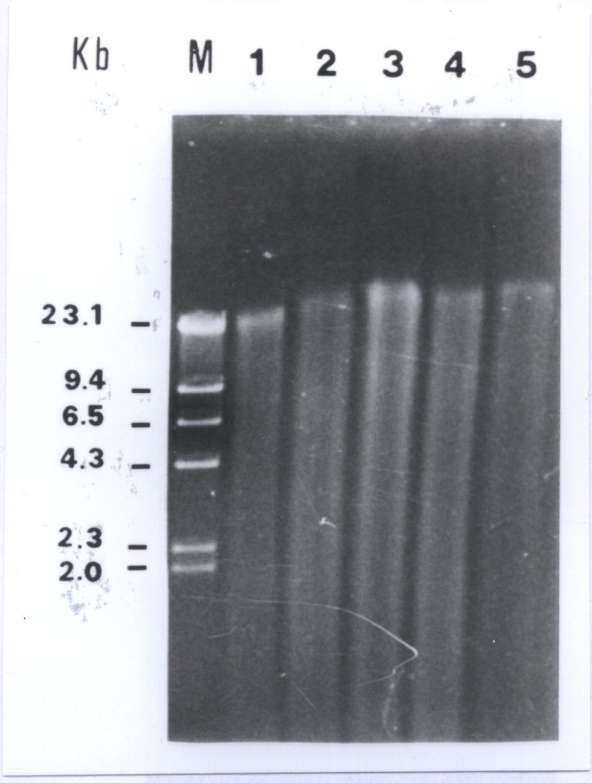
ภาพที่ 4 ผลการสกัดดีเอ็นเอแบบรวมทั้งหมด (total genomic DNA หรือ total cellular DNA) จากกล้ามเนื้อโดยใช้เทคนิค salting-out เพื่อกำจัดโปรตีน



แถวที่ M หมายถึง ดีเอ็นเอมาตรฐาน (Lambda DNA/*Hin*d III Markers)

แถวที่ 1-5 หมายถึง ดีเอ็นเอแบบรวมทั้งหมด จากตัวอย่าง นกขุนทองเหนือ นกขุนทองเหนือกลาย นกขุนทองกลุ่มผสม นกขุนทองใต้กลาย และนกขุนทองใต้ ตามลำดับ

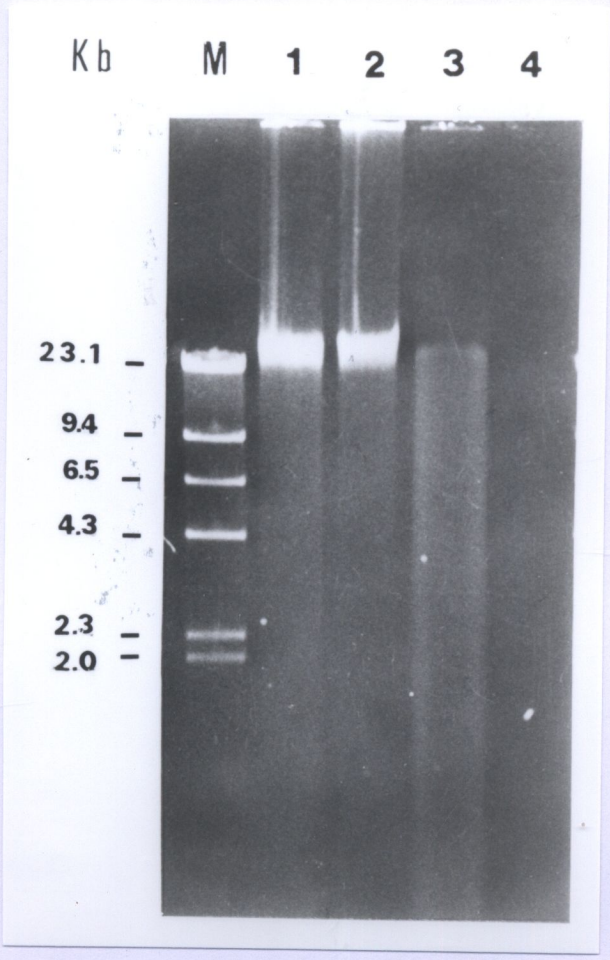
ภาพที่ 5 ผลการสกัดดีเอ็นเอแบบรวมทั้งหมด (total genomic DNA หรือ total cellular DNA) จากเลือดโดยใช้เทคนิค salting-out เพื่อกำจัดโปรตีน



แถวที่ M หมายถึง ดีเอ็นเอมาตรฐาน (Lambda DNA/*Hin*d III Markers)

แถวที่ 1-5 หมายถึง ดีเอ็นเอแบบรวมทั้งหมด จากตัวอย่าง นกขุนทองเหนือ นกขุนทองเหนือกลาย นกขุนทองกลุ่มผสม นกขุนทองใต้กลาย และนกขุนทองใต้ ตามลำดับ

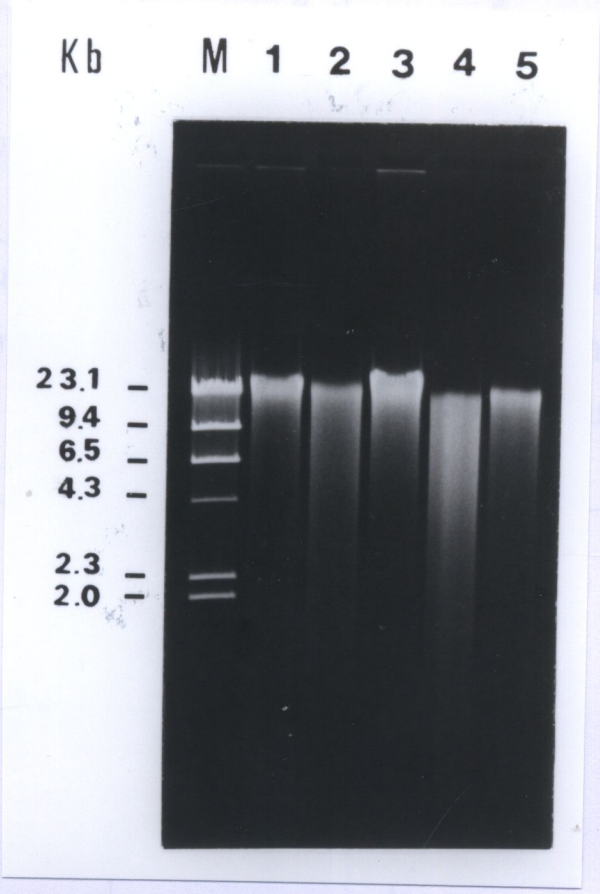
ภาพที่ 6 ผลการสกัดดีเอ็นเอแบบรวมทั้งหมด (total genomic DNA หรือ total cellular DNA) จากโคนขนโดยใช้เทคนิค salting-out เพื่อกำจัดโปรตีน



แถวที่ M หมายถึง ดีเอ็นเอมาตรฐาน (Lambda DNA/*Hind* III Markers)

แถวที่ 1-4 หมายถึง ดีเอ็นเอแบบรวมทั้งหมด จากตัวอย่างนกขุนทองที่เป็น กล้ามเนื้อ เลือด โคนขนและปลายขน ตามลำดับ

ภาพที่ 7 ผลการสกัดดีเอ็นเอแบบรวมทั้งหมด (total genomic DNA หรือ total cellular DNA) จากกล้ามเนื้อ เลือด โคนขนและปลายขน โดยใช้เทคนิค salting-out เพื่อกำจัดโปรตีน



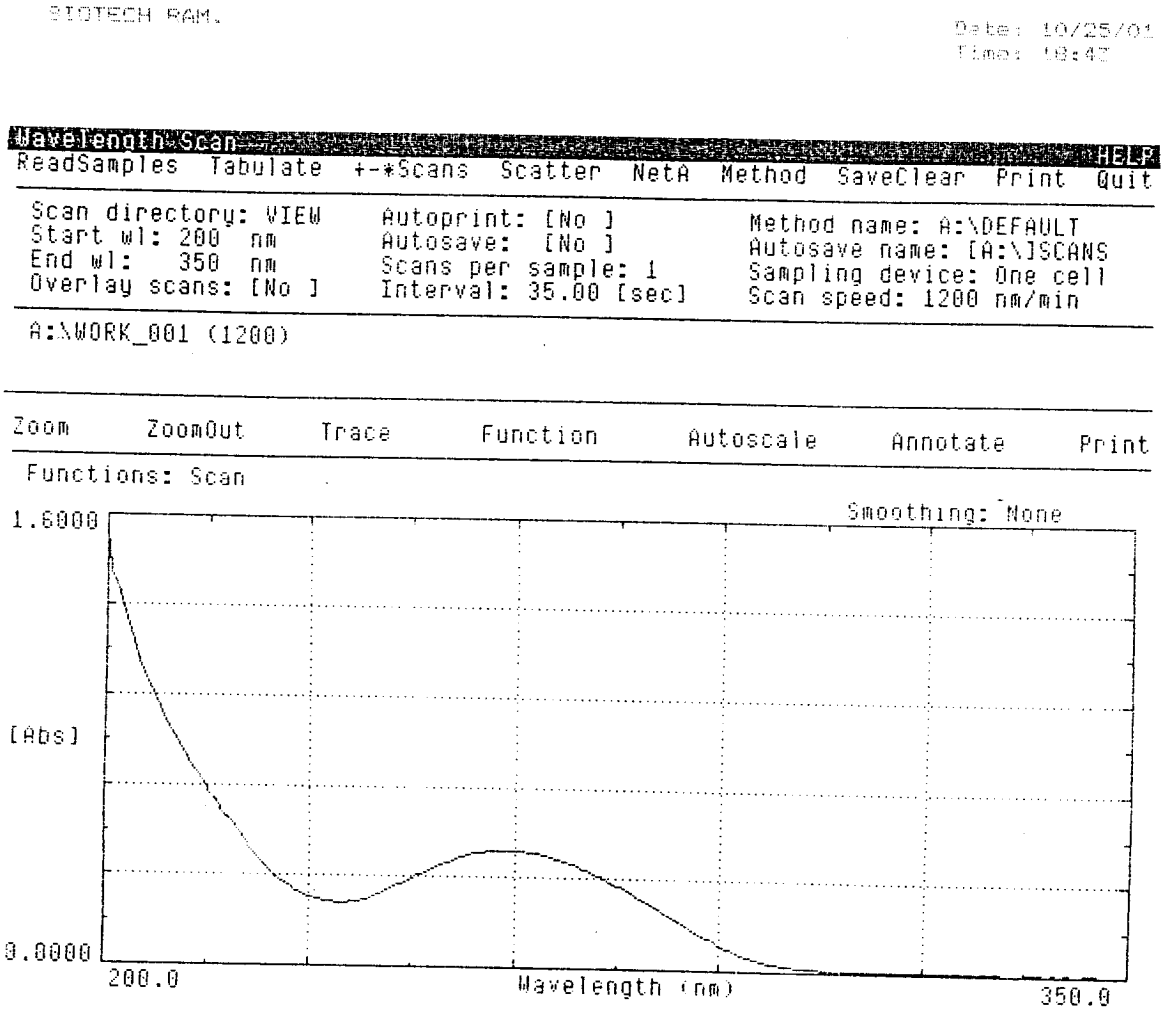
แถวที่ M หมายถึง ดีเอ็นเอมาตรฐาน (Lambda DNA/*Hind* III Markers)

แถวที่ 1-5 หมายถึง ดีเอ็นเอแบบรวมทั้งหมดจาก ตัวอย่าง นกขุนทองเหนือ นกขุนทองเหนือกลาย นกขุนทองกลุ่มผสม นกขุนทองใต้กลาย และนกขุนทองใต้ ตามลำดับ

ภาพที่ 8 ผลการสกัดดีเอ็นเอแบบรวมทั้งหมด (total genomic DNA หรือ total cellular DNA) จากกล้ามเนื้อ โดยใช้สารละลายฟีนอล เพื่อกำจัดโปรตีน

ตารางที่ 8 ค่าอัตราส่วนระหว่าง การดูดกลืนที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร ของสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้จากกล้ามเนื้อโดยใช้สารละลายฟีนอลกำจัดโปรตีน

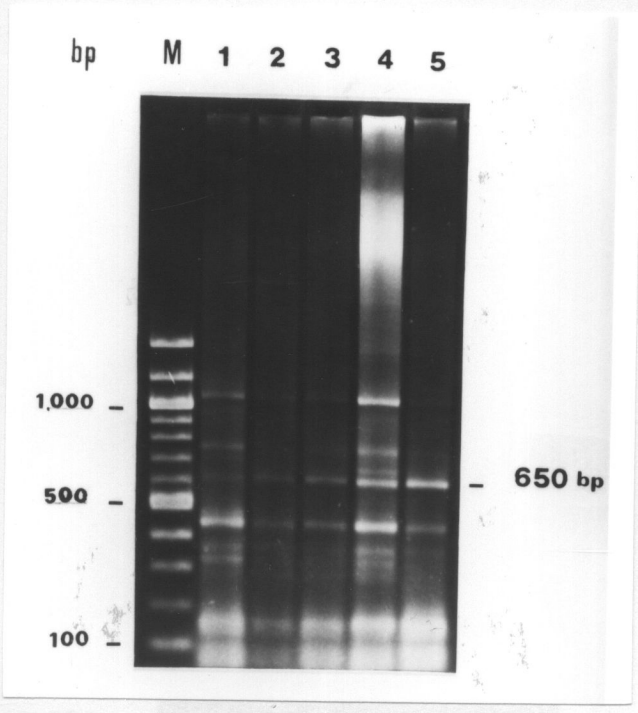
สารละลายดีเอ็นเอของนกขุนทองแต่ละกลุ่ม	ค่าการดูดกลืนที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร (A_{260})	ค่าการดูดกลืนที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร (A_{280})	อัตราส่วน A_{260} / A_{280}
N	0.167	0.107	1.56
N_1	0.356	0.210	1.69
N_4	0.414	0.221	1.87
N_6	0.443	0.237	1.87
N_7	0.438	0.236	1.85
MN	0.388	0.227	1.71
MN_1	0.219	0.131	2.22
MN_2	0.228	0.140	1.63
I_1	0.204	0.096	2.21
I_2	0.185	0.083	2.23
I_3	0.202	0.091	2.22
MS	0.976	0.518	1.88
MS_1	0.126	0.056	2.25
MS_2	0.193	0.090	2.14
S	0.240	0.142	1.69
S_1	0.146	0.089	1.64
S_2	0.164	0.102	1.61



ภาพที่ 9 ค่าการดูดกลืนที่ ความยาวคลื่น ตั้งแต่ 200 จนถึง 350 นาโนเมตร (wavelength scan) ของสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้จากกล้ามเนื้อ โดยใช้สารละลายฟีนอลเพื่อกำจัดโปรตีน

ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่

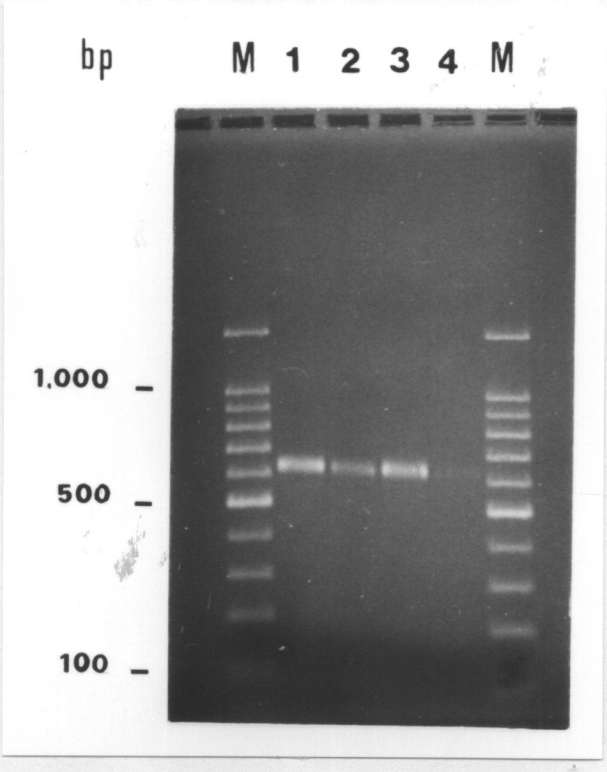
ได้ผลผลิตจากปฏิกิริยาลูกโซ่ไม่ตรงกับขนาดที่คาดหมายไว้ (ประมาณ 700 คู่เบส) แต่มีแถบดีเอ็นเอที่ใกล้เคียงกันคือ ผลผลิตที่มีขนาดประมาณ 650 คู่เบส ดังภาพที่ 10 จึงได้นำชิ้นส่วนที่มีขนาด 650 คู่เบส มาทดสอบโดยเทคนิค Nested PCR เพื่อพิสูจน์ว่าแถบดีเอ็นเอที่ขนาด 650 คู่เบสนี้เป็นยีนไซโตโครมออกซิเดสบี จริงหรือไม่ โดยผ่านขั้นตอนการสกัดแถบดีเอ็นเอขนาดดังกล่าวที่อยู่ในแผ่นเจล ด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูปก่อน และตรวจสอบด้วยเทคนิคซับมารีนอะกาโรสเจลอิเล็คโตรฟอรีซิส ได้ผลลัพธ์ ดังภาพที่ 11 แล้วนำดีเอ็นเอที่ได้ไปใช้ในการสังเคราะห์ในเทคนิค Nested PCR ได้ผลลัพธ์ที่แสดงว่า เป็นยีนไซโตโครมออกซิเดสบีจริง เนื่องจากได้ผลผลิตจากปฏิกิริยาเป็นไปตามที่ได้คาดหมายไว้ คือ ประมาณ 450 คู่เบส ดังภาพที่ 12



แถวที่ M หมายถึง ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA Ladder)

แถวที่ 1-5 หมายถึง ผลผลิตจากปฏิกิริยาลูกโซ่ จากตัวอย่างนกขุนทองเหนือ นกขุนทองเหนือกลาย นกขุนทองกลุ่มผสม นกขุนทองใต้กลาย และนกขุนทองใต้ ตามลำดับ

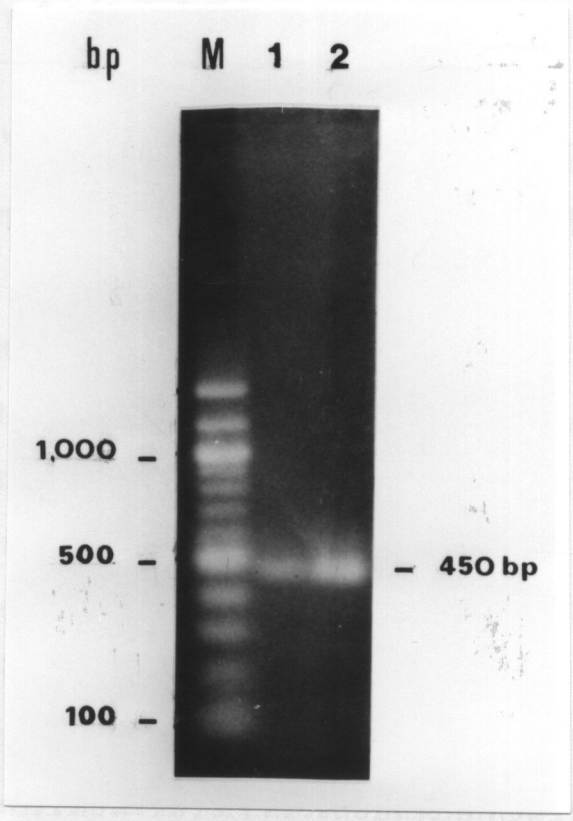
ภาพที่ 10 ผลผลิตจากปฏิกิริยาลูกโซ่ขนาดประมาณ 650 คู่เบส ที่คาดว่าเป็นส่วนหนึ่งของยีนไซโตโครมออกซิเดสบี



แถวที่ M หมายถึง ดีเอ็นเอมาตรฐาน (Lambda DNA/*Hin*d III Markers)

แถวที่ 1-4 หมายถึง ผลผลิตปฏิกิริยาลูกโซ่ ที่ผ่านขั้นตอนการสกัดด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป

ภาพที่ 11 ผลผลิตจากปฏิกิริยาลูกโซ่ (ยีนไซโตโครมออกซิเดสบี) ที่ผ่านขั้นตอนการสกัดด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป (QIAquick Gel Extraction Kit)



แถวที่ M หมายถึง ดีเอ็นเอมาตรฐาน (Lambda DNA/*Hin*d III Markers)

แถวที่ 1-2 หมายถึง ผลผลิตปฏิกิริยาลูกโซ่ (Nested PCR product) ขนาด 450 คู่เบส

ภาพที่ 12 การใช้เทคนิค Nested PCR เพื่อยืนยันว่า ยีนที่มีขนาด 650 คู่เบสเป็นส่วนหนึ่งของยีนไซโตโครมออกซิเดสบี

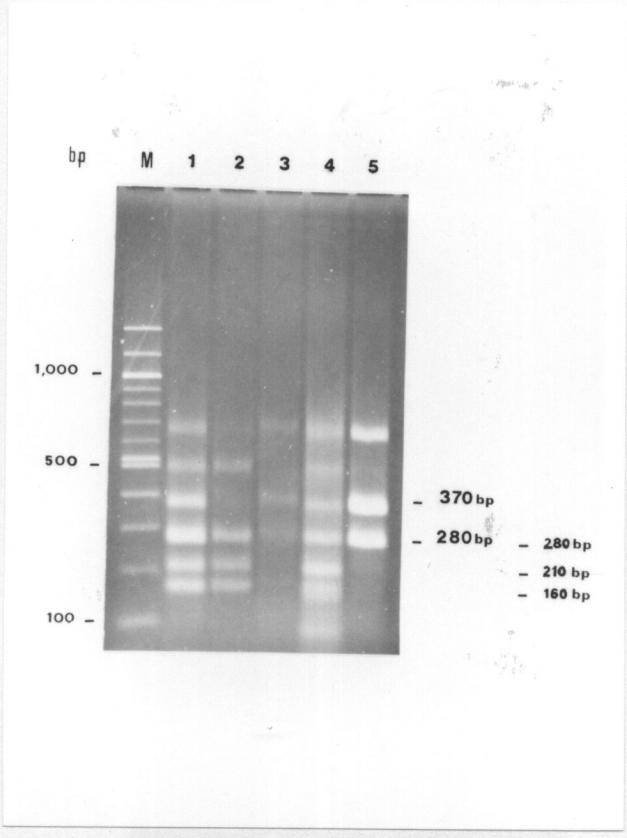
ผลการตรวจสอบลายพิมพ์ยีนไซโตโครมออกซิเดสบีด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

พบว่ามีเอนไซม์ตัดจำเพาะ 3 ชนิดจาก 12 ชนิดที่ทดลองตัด ให้รูปแบบเป็นแถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอหลากหลายขนาด และเห็นรูปแบบได้ชัดเจนมากที่สุดได้แก่ *Bsa* JI, *Bst* YI, และ *Pst* I

ผลลัพธ์จากการใช้เอนไซม์ *Bsa JI* ตรวจสอบลายพิมพ์ยีนไซโตโครมออกซิเดสบี พบ 2 รูปแบบ (haplotype) ได้แก่ รูปแบบ A (ที่มีชิ้นส่วนเป็นแถบดีเอ็นเอ ขนาด 280 คู่เบส 210 คู่เบส และ160 คู่เบส) และรูปแบบ B (ที่มีชิ้นส่วนเป็นแถบดีเอ็นเอ ขนาด 370 คู่เบส และ 280 คู่เบส) ดังภาพที่ 13, 14, 15, และ 16

ผลลัพธ์จากการใช้เอนไซม์ *Bst* YIตรวจสอบลายพิมพ์ยีนไซโตโครมออกซิเดสบี พบเพียง 1 รูปแบบ คือ รูปแบบ A (ที่มีชิ้นส่วนเป็นแถบดีเอ็นเอ ขนาด 325 คู่เบส 250 คู่เบส และ 75 คู่เบส) ดังภาพที่ 14, 15, 17, และ 18

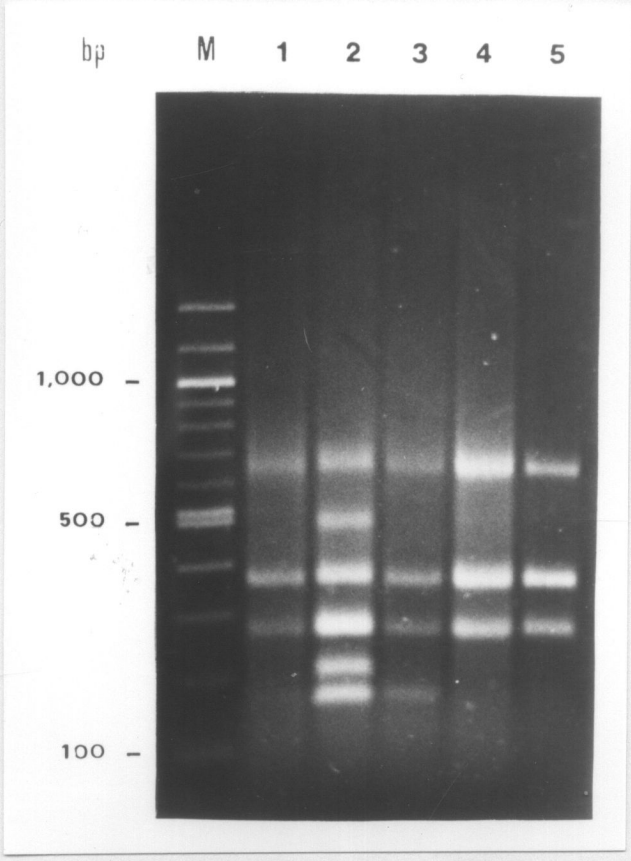
ผลลัพธ์จากการใช้เอนไซม์ *Pst* I ตรวจสอบลายพิมพ์ยีนไซโตโครมออกซิเดสบี พบเพียง 1 รูปแบบ คือ รูปแบบ A (ที่มีชิ้นส่วนเป็นแถบดีเอ็นเอ ขนาด 310 คู่เบส 210 คู่เบส และ140 คู่เบส) ดังภาพที่ 14, 15, 19, และ 20



แถวที่ M หมายถึง ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA Ladder)

แถวที่ 1-5 หมายถึง ลายพิมพ์ของยีนไซโตโครมออกซิเดสบี จากตัวอย่างนกขุนทองเหนือ (N) นกขุนทองเหนือกลาย (MN) นกขุนทองกลุ่มผสม (I_1) นกขุนทองใต้กลาย (MS) และนกขุนทองใต้ (S) ตามลำดับ

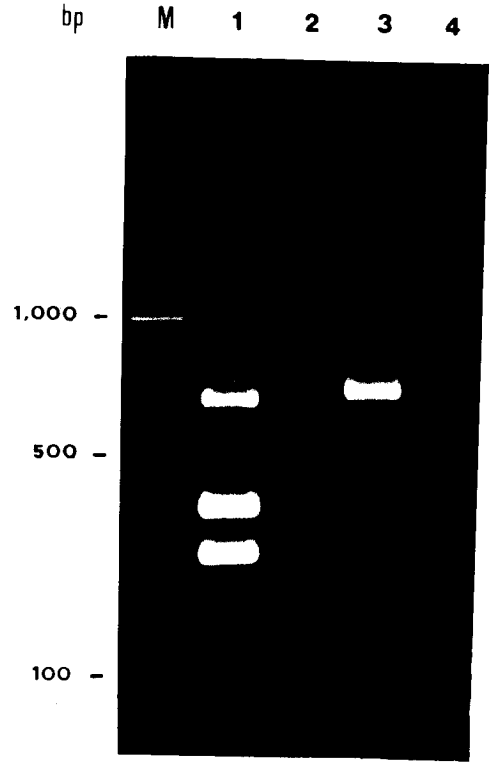
ภาพที่ 13 รูปแบบที่ปรากฏเป็นแถบ ของยีนไซโตโครมออกซิเดสบี ของนกขุนทองแต่ละกลุ่ม ภายหลังการตรวจสอบลายพิมพ์ ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bsa* JI ในอะกาโรสเจล ที่มีความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์



แถวที่ M หมายถึง ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA Ladder)

แถวที่ 1-5 หมายถึง ลายพิมพ์ของยีนไซโตโครมออกซิเดสบี จากตัวอย่างนกขุนทองเหนือ (N_6) นกขุนทองเหนือกลาย (MN_1) นกขุนทองกลุ่มผสม (I_3) นกขุนทองใต้กลาย (MS_1) และนกขุนทองใต้ (S_1) ตามลำดับ

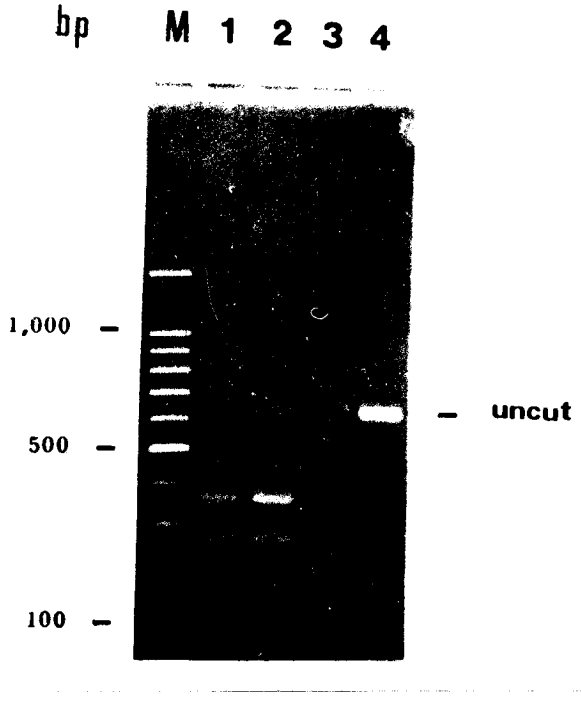
ภาพที่ 13 (ต่อ)



แถวที่ M หมายถึง ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA Ladder)

แถวที่ 1-4 หมายถึง ลายพิมพ์ของยีนไซโตโครมออกซิเดสบี จากตัวอย่างนกขุนทองเหนือ (N_7) นกขุนทองเหนือกลาย (MN_2) นกขุนทองกลุ่มผสม (I_2)และ นกขุนทองใต้กลาย (MS_2) ตามลำดับ

ภาพที่ 13 (ต่อ)

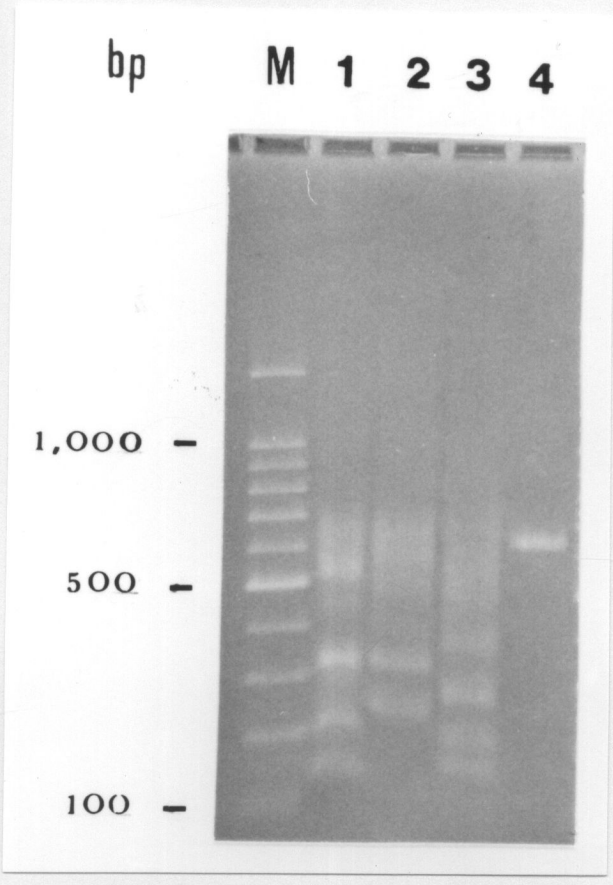


แถวที่ M หมายถึง ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA Ladder)

แถวที่ 1-3 หมายถึง ลายพิมพ์ของยีนไซโตโครมออกซิเดสบี จากตัวอย่างนกขุนทองใต้ S, S_1, และ S_2 ตามลำดับ

แถวที่ 4 หมายถึง แถบดีเอ็นเอตั้งต้นที่ไม่ได้ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

ภาพที่ 13 (ต่อ)

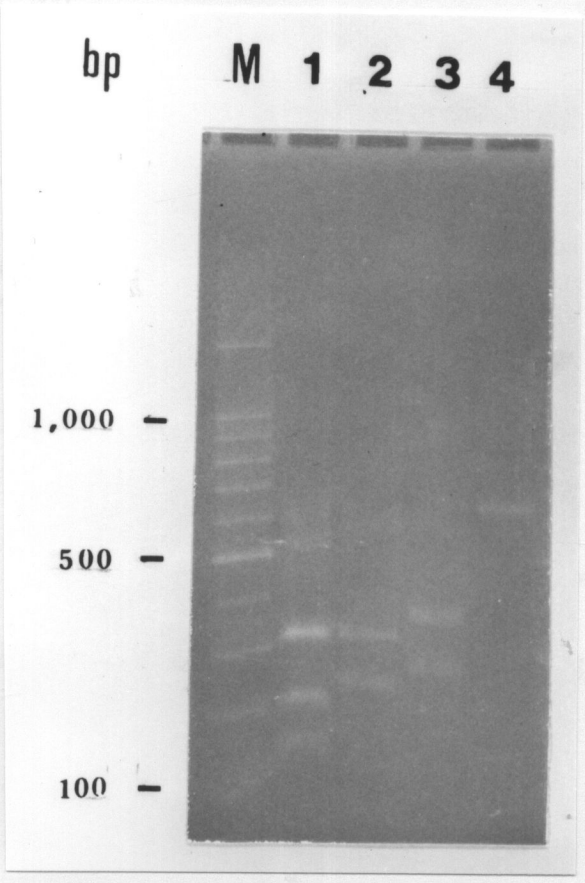


แถวที่ M หมายถึง ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA Ladder)

แถวที่ 1-3 หมายถึง ลายพิมพ์ของยีนไซโตโครมออกซิเดสบี ภายหลังการตรวจสอบด้วยเอนไซม์ *Pst* I, *Bst* YI, และ *Bsa* JI ตามลำดับ

แถวที่ 4 หมายถึง แถบดีเอ็นเอตั้งต้นที่ไม่ได้ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

ภาพที่ 14 รูปแบบที่ปรากฏเป็นแถบของยีนไซโตโครมออกซิเดสบี ของนกขุนทองเหนือ (N_1) ภายหลังการตรวจสอบลายพิมพ์ ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Pst* I, *Bst* YI, และ *Bsa* JI ในอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์



แถวที่ M หมายถึง ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA Ladder)

แถวที่ 1-3 หมายถึง ลายพิมพ์ของยีนไซโตโครม ออกซิเดสบี ภายหลังการตรวจด้วยเอนไซม์ *Pst* I, *Bst* YI, และ *Bsa* JI ตามลำดับ

แถวที่ 4 หมายถึง แถบดีเอ็นเอตั้งต้นที่ไม่ได้ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

ภาพที่ 15 รูปแบบที่ปรากฏเป็นแถบของยีนไซโตโครมออกซิเดสบี ของนกขุนทองเหนือ (N_4) ภายหลังการตรวจสอบลายพิมพ์ ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Pst* I, *Bst* YI, และ *Bsa* JI ในอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์

รูปแบบ A: ตัดได้ 3 ชิ้น

650 คู่เบส

280 คู่เบส

210 คู่เบส

160 คู่เบส

พบในนกขุนทองตัวอย่าง: N, N_1, MN, MN_1, MN_2, MS, และ MS_2

รูปแบบ B: ตัดได้ 2 ชิ้น

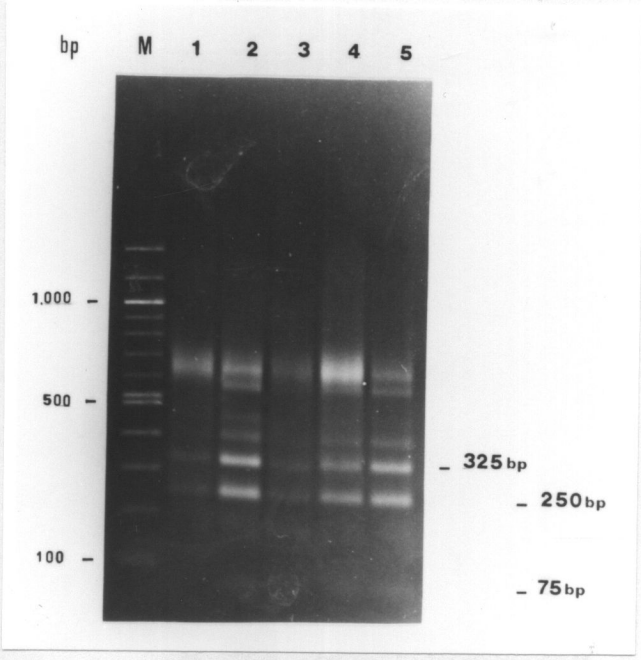
650 คู่เบส

370 คู่เบส

280 คู่เบส

พบในนกขุนทองตัวอย่าง: N_4, N_6, N_7, I_1, I_2, I_3, MS_1, S, S_1,และ S_2

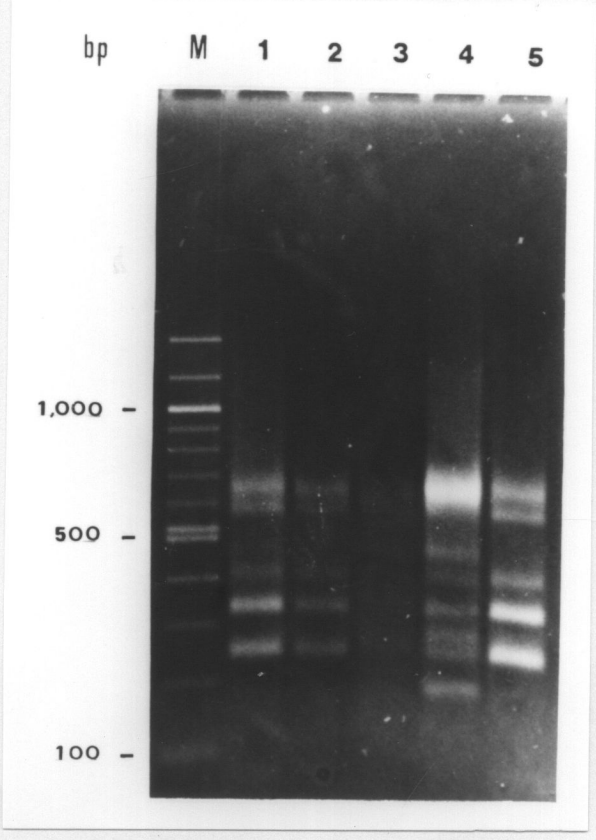
ภาพที่ 16 รูปแบบที่ปรากฏเป็นแถบของยีนไซโตโครมออกซิเดสบี ของนกขุนทองแต่ละกลุ่ม จากการตรวจสอบลายพิมพ์ ด้วยเอนไซม์ *Bsa* JI ซึ่งได้จากภาพที่ 13, 14, และ 15



แถวที่ M หมายถึง ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA Ladder)

แถวที่ 1-5 หมายถึง ลายพิมพ์ของยีนไซโตโครมออกซิเดสบี จากตัวอย่างนกขุนทองเหนือ (N_6) นกขุนทองเหนือกลาย (MN_1) นกขุนทองกลุ่มผสม (I_3) นกขุนทองใต้กลาย (MS_1) และนกขุนทองใต้ (S_1) ตามลำดับ

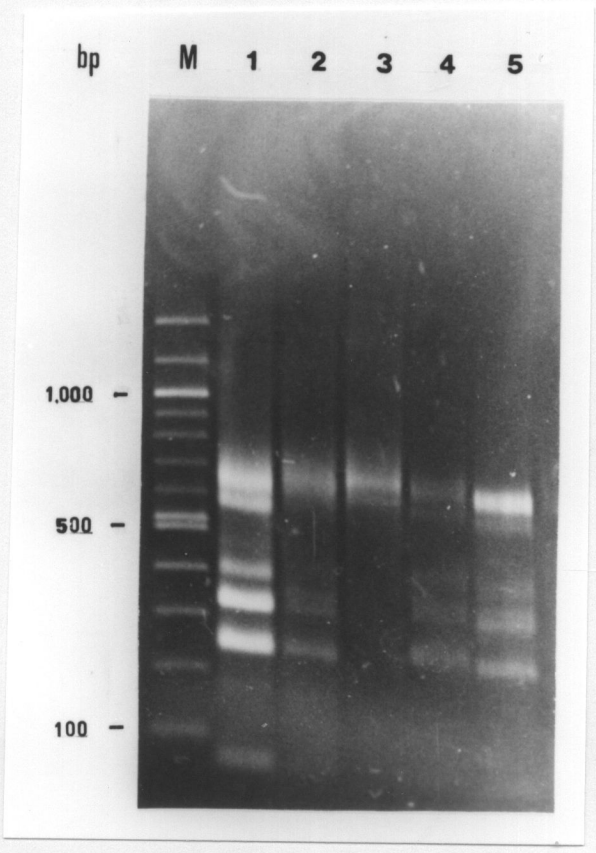
ภาพที่ 17 รูปแบบที่ปรากฏเป็นแถบของยีนไซโตโครมออกซิเดสบี ของนกขุนทองแต่ละกลุ่ม ภายหลังการตรวจสอบลายพิมพ์ ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bst* YI ในอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์



แถวที่ M หมายถึง ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA Ladder)

แถวที่ 1-5 หมายถึง ลายพิมพ์ของยีนไซโตโครมออกซิเดสบี จากตัวอย่างนกขุนทองเหนือ (N) นกขุนทองเหนือกลาย (MN) นกขุนทองกลุ่มผสม (I_1) นกขุนทองใต้กลาย (MS) และนกขุนทองใต้ (S) ตามลำดับ

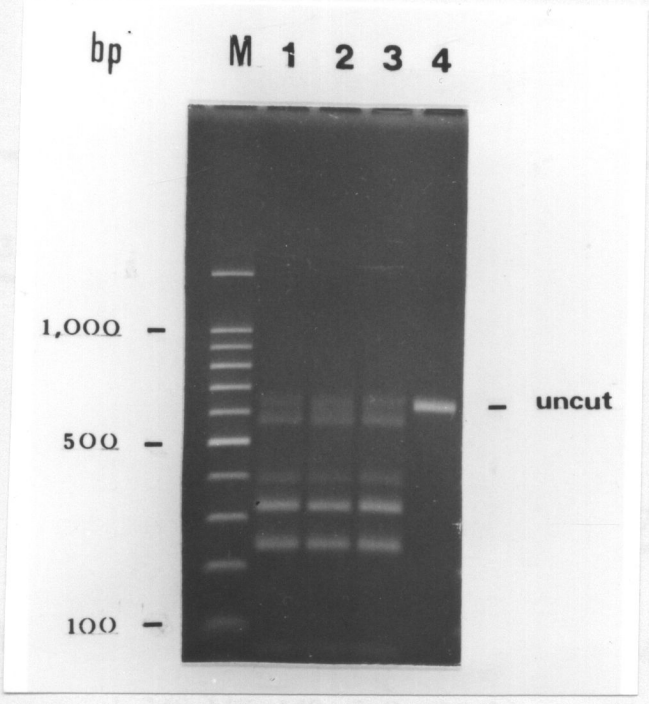
ภาพที่ 17 (ต่อ)



แถวที่ M หมายถึง ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA Ladder)

แถวที่ 1-5 หมายถึง ลายพิมพ์ของยีนไซโตโครมออกซิเดสบี จากตัวอย่างนกขุนทองเหนือ (N_7) นกขุนทองเหนือกลาย (MN_2) นกขุนทองกลุ่มผสม (I_2) นกขุนทองใต้กลาย (MS_2) และนกขุนทองใต้ (S_2) ตามลำดับ

ภาพที่ 17 (ต่อ)



แถวที่ M หมายถึง ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA Ladder)

แถวที่ 1-3 หมายถึง ลายพิมพ์ของยีนไซโตโครมออกซิเดสบี ตัวอย่างนกขุนทองใต้ S, S_1, และ S_2 ตามลำดับ

แถวที่ 4 หมายถึง แถบดีเอ็นเอตั้งต้นที่ไม่ได้ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

ภาพที่ 17 (ต่อ)

รูปแบบ A: ตัดได้ 3 ชิ้น

650 คู่เบส

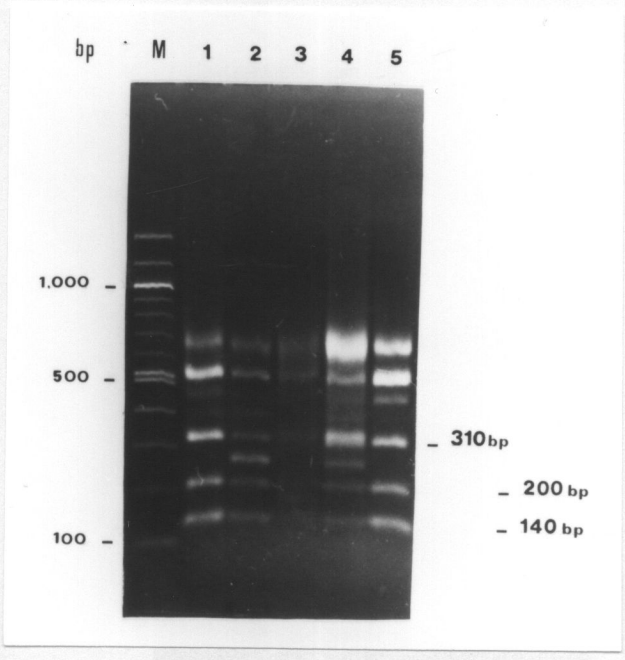
325 คู่เบส

250 คู่เบส

75 คู่เบส

พบในนกขุนทองตัวอย่าง: ทุกตัวอย่างได้แก่ N, N_1, N_4, N_6, N_7, MN, MN_1, MN_2, I_1, I_2, I_3, MS, MS_1, MS_2, S, S_1,และ S_2

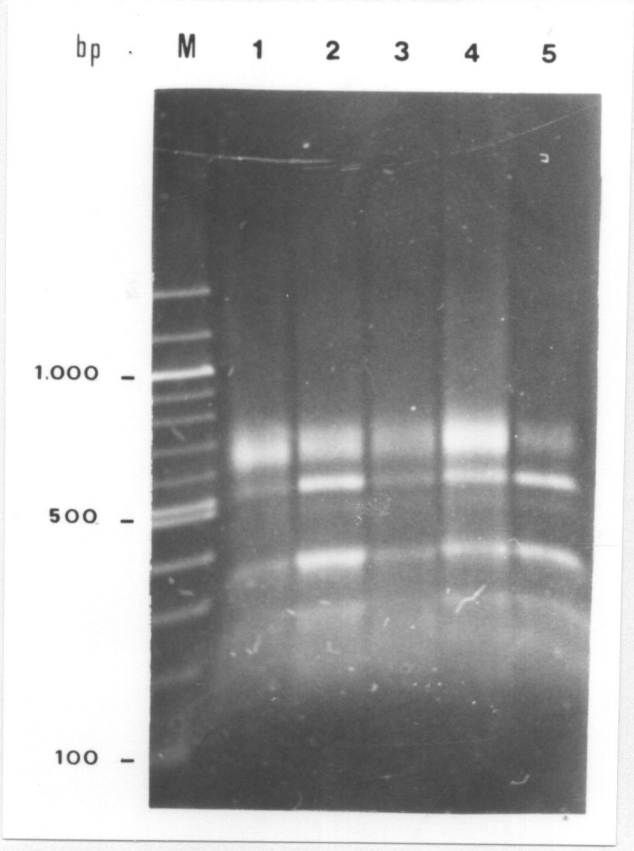
ภาพที่ 18 รูปแบบที่ปรากฏเป็นแถบของยีนไซโตโครมออกซิเดสบี ของนกขุนทองแต่ละกลุ่ม จากการตรวจสอบลายพิมพ์ ด้วยเอนไซม์ *Bst* YI ซึ่งได้จากภาพที่ 14, 15, และ 17



แถวที่ M หมายถึง ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA Ladder)

แถวที่ 1-5 หมายถึง ลายพิมพ์ของยีนไซโตโครมออกซิเดสบี จากตัวอย่างนกขุนทองเหนือ (N) นกขุนทองเหนือกลาย (MN) นกขุนทองกลุ่มผสม (I_1) นกขุนทองใต้กลาย (MS) และนกขุนทองใต้ (S) ตามลำดับ

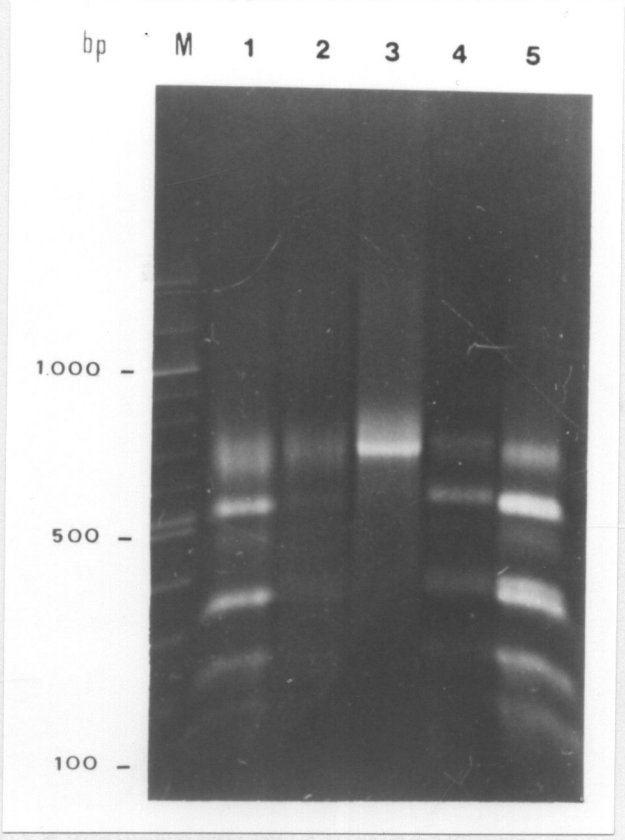
ภาพที่ 19 รูปแบบที่ปรากฏเป็นแถบของยีนไซโตโครมออกซิเดสบี ของนกขุนทองแต่ละกลุ่ม ภายหลังการตรวจสอบลายพิมพ์ ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Pst* I ในอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์



แถวที่ M หมายถึง ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA Ladder)

แถวที่ 1-5 หมายถึง ลายพิมพ์ของยีนไซโตโครมออกซิเดสบี จากตัวอย่างนกขุนทองเหนือ (N_6) นกขุนทองเหนือกลาย (MN_1) นกขุนทองกลุ่มผสม (I_3) นกขุนทองใต้กลาย (MS_1) และนกขุนทองใต้ (S_1) ตามลำดับ

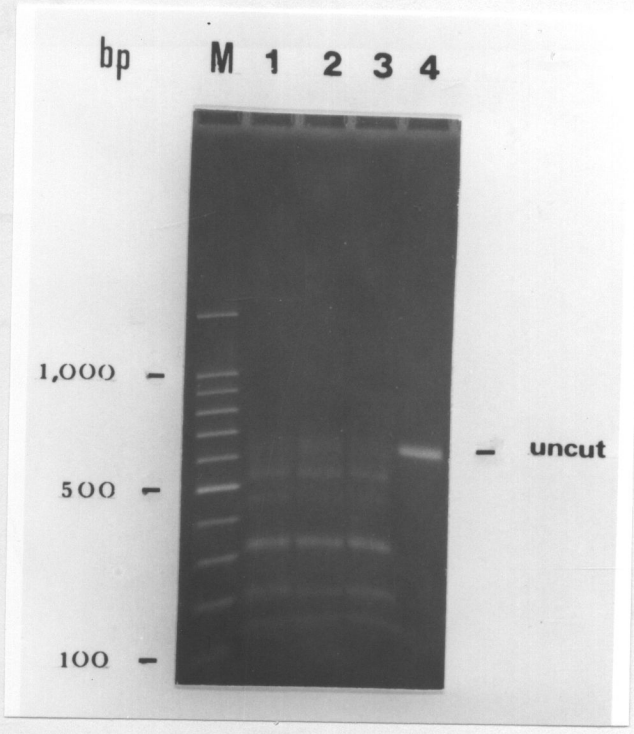
ภาพที่ 19 (ต่อ)



แถวที่ M หมายถึง ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA Ladder)

แถวที่ 1-5 หมายถึง ลายพิมพ์ของยีนไซโตโครมออกซิเดสบี จากตัวอย่างนกขุนทองเหนือ (N_7) นกขุนทองเหนือกลาย (MN_2) นกขุนทองกลุ่มผสม (I_2) นกขุนทองใต้กลาย (MS_2) และนกขุนทองใต้ (S_2) ตามลำดับ

ภาพที่ 19 (ต่อ)



แถวที่ M หมายถึง ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA Ladder)

แถวที่ 1-3 หมายถึง ลายพิมพ์ของยีนไซโตโครมออกซิเดสบี ตัวอย่างนกขุนทองใต้ S, S_1, และ S_2 ตามลำดับ

แถวที่ 4 หมายถึง แถบดีเอ็นเอตั้งต้นที่ไม่ได้ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

ภาพที่ 19 (ต่อ)

รูปแบบ A: ตัดได้ 3 ชิ้น

650 คู่เบส

310 คู่เบส

200 คู่เบส

140 คู่เบส

พบในนกขุนทองตัวอย่าง: ทุกตัวอย่างได้แก่ N, N_1, N_4, N_6, N_7, MN, MN_1, MN_2, I_1, I_2, I_3, MS, MS_1, MS_2, S, S_1, และ S_2

ภาพที่ 20 รูปแบบที่ปรากฏเป็นแถบของยีนไซโตโครมออกซิเดสบี ของนกขุนทองแต่ละกลุ่ม จากการตรวจสอบลายพิมพ์ ด้วยเอนไซม์ *Pst* Iซึ่งได้จากภาพที่ 14, 15, และ 19

การจัดจำแนกนกขุนทองตัวอย่างจากลายพิมพ์
ยีนไซโตโครมออกซิเดสบี ที่ได้จากเอนไซม์ตัดจำเพาะ
***Bsa* JI, *Bst* YI, และ *Pst* I**

จากผลลัพธ์ในข้อ 3 ไม่สามารถจัดรูปแบบที่เป็นแถบดีเอ็นเอที่พบในตัวอย่างนกขุนทอง เป็น 5 กลุ่มได้ เหมือนการค้นพบความแตกต่างแปรผันเชิงสัณฐานวิทยา เพราะรูปแบบที่ได้จากเอนไซม์ทั้งสามไม่แตกต่างกันอย่างชัดเจน มีเอนไซม์ *Bsa* JI เท่านั้นที่พบรูปแบบเป็นแถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่แตกต่างออกไปบาง คือ รูปแบบ B

อย่างไรก็ตาม รูปแบบที่เกิดจากการเอนไซม์ *Bsa* JI สามารถแบ่งนกขุนทองตัวอย่างออกเป็น 2 กลุ่มได้โดยจะต้องไม่ยึดแบบแผนการอนุกรมวิธานนกขุนทองเป็น 5 กลุ่มตามสันฐานวิทยา ได้แก่ รูปแบบ A และ B

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของรูปแบบแถบลายพิมพ์
ยีนไซโตโครมออกซิเดสบี ของนกขุนทองตัวอย่าง

จากผลลัพธ์ในข้อ 4 นำรูปแบบแถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bsa* JI, *Bst* YI และ *Pst* I มาแปลงเป็นข้อมูลเชิงตัวเลข เพื่อคำนวณความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยโปรแกรมสำเร็จรูป (REAP version 4.0)

1. รูปแบบแถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จาก เอนไซม์ทั้ง 3 เมื่อแปลงเป็นข้อมูลเชิงตัวเลข

Bsa JI	370 คู่เบส	280 คู่เบส	210 คู่เบส	160 คู่เบส
A	0	1	1	1
B	1	1	0	0

Bst YI	325 คู่เบส	250 คู่เบส	75 คู่เบส
A	1	1	1

Pst I	310 คู่เบส	200 คู่เบส	140 คู่เบส
A	1	1	1

กลุ่มตัวอย่าง	Composite haplotype	Character
N	AAA	0111 111 111
N_1	AAA	0111 111 111
N_4	BAA	1100 111 111
N_6	BAA	1100 111 111
N_7	BAA	1100 111 111
MN	AAA	0111 111 111
MN_1	AAA	0111 111 111
MN_2	AAA	0111 111 111
I	BAA	1100 111 111
I_1	BAA	1100 111 111
I_3	BAA	1100 111 111
MS	AAA	0111 111 111
MS_1	BAA	1100 111 111
MS_2	AAA	0111 111 111
S	BAA	1100 111 111
S_1	BAA	1100 111 111
S_2	BAA	1100 111 111

2. ค่าความห่างระหว่างรูปแบบ (genotype or haplotype) ทั้ง 2 รูปแบบ

	AAA	BAA
AAA	—	
BAA	0. 010956	—

3. ค่าความหลากหลายของรูปแบบและนิวคลีโอไทด์ภายในประชากร

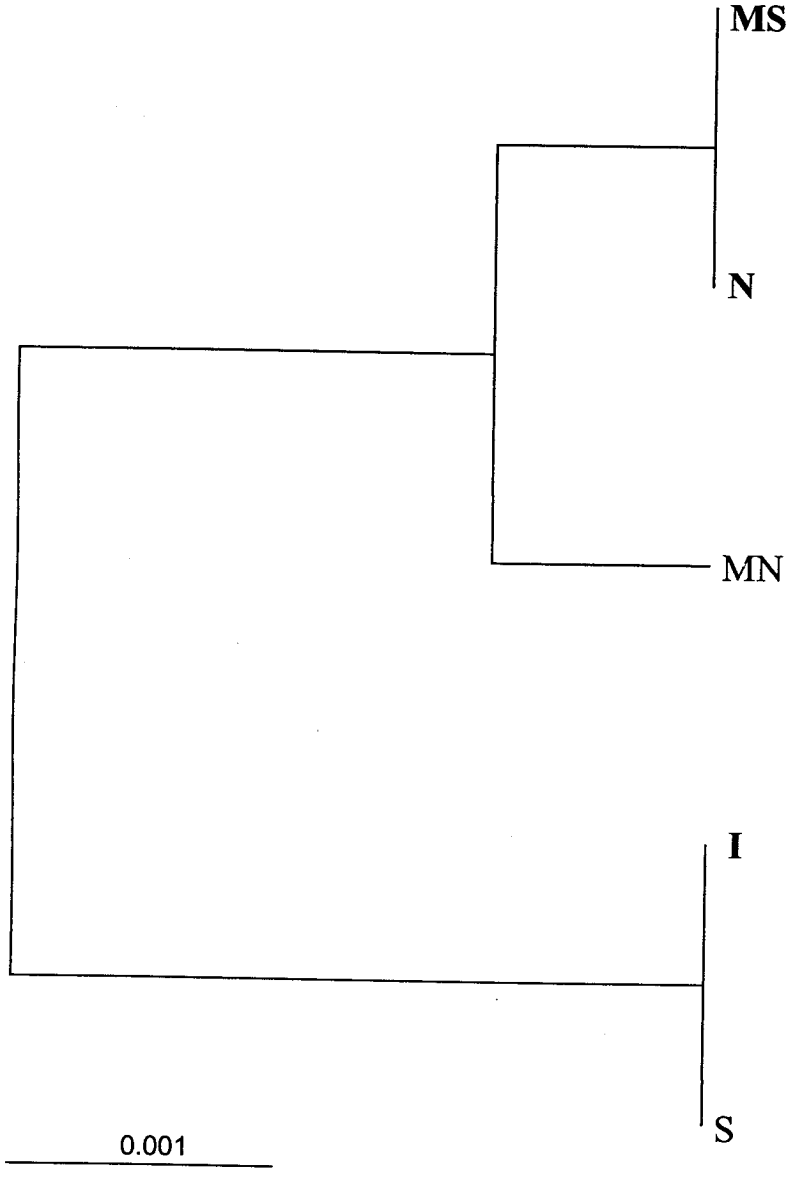
กลุ่มตัวอย่าง	ความหลากหลายของรูปแบบ	ความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์
N	0.5333	0.0065
MN	0.0000	0.0000
MS	0.5333	0.0073
I	0.0000	0.0000
S	0.0000	0.0000
ค่าเฉลี่ย	0.2133	0.0028

4. ค่าความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์และ ความห่างของนิวคลีโอไทด์ระหว่างประชากร (มุมบน และ มุมล่างตามลำดับ)

	N	MN	MS	I	S
N	---	0.006574	0.005843	0.004383	0.004383
MN	0.003287	---	0.003652	0.010956	0.010956
MS	0.000000	0.000000	---	0.007304	0.007304
I	0.001096	0.010956	0.003652	---	0.000000
S	0.001096	0.010956	0.003652	0.000000	---

	ค่าความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์ระหว่างประชากร	ค่าความห่างของนิวคลีโอไทด์ระหว่างประชากร
ค่าเฉลี่ย	0.0061	0.0034
ค่าต่ำสุด	0.0000	0.0000
ค่าสูงสุด	0.0110	0.0110

5. แนวโน้มแผนภาพความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของนกขุนทอง ทั้ง 5 กลุ่ม



บทที่ 5
สรุป อภิปรายผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

สรุปผลการทดลอง

จากการวิเคราะห์รูปแบบที่ปรากฏเป็นแถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากนกขุนทองตัวอย่าง (จำแนกกลุ่มตามสัณฐานวิทยา) โดยใช้ยีนไซโตโครมออกซิเดสบี ขนาด 650 คู่เบสที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่ และตรวจสอบด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 12 ชนิด มีเอนไซม์ตัดจำเพาะเพียง 3 ชนิดที่พบว่า ปรากฏเป็นแถบรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ชัดเจนที่สุดได้แก่ *Bsa* JI, *Bst* YI, และ *Pst* I พบ รูปแบบที่เป็นแถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จาก *Bsa* JI 2 รูปแบบ และ *Bst* YI กับ *Pst* I อย่างละ 1 รูปแบบ และไม่สามารถสรุปได้ว่า รูปแบบที่เป็นแถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอมีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน และมีความสัมพันธ์กับความแตกต่างแปรผันเชิงสัณฐานวิทยาที่จำแนกนกขุนทองเป็น 5 กลุ่ม เนื่องจาก จำนวนตัวอย่างที่ใช้ศึกษาน้อย (N= 17) ซึ่งไม่เพียงพอที่จะทอสอบนัยสำคัญทางสถิติได้

อย่างไรก็ตาม มีเพียงรูปแบบแถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเอนไซม์ *Bsa* JI เท่านั้น ที่แสดงความแตกต่าง 2 รูปแบบ และสามารถจำแนกนกขุนทองตัวอย่างเป็น 2 กลุ่มได้ มีค่าความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์ภายในประชากรและระหว่างประชากรโดยเฉลี่ย เท่ากับ 0.0028 และ 0.0061 ตามลำดับ ส่วนความห่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรโดยเฉลี่ยมีค่าเท่ากับ 0.0034 และสามารถสร้างแนวโน้มของความสัมพันธ์เชิงพันธุกรรมได้

อภิปรายผลการทดลอง

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาความหลากหลายเชิงพันธุกรรมของนกขุนทองใน

ประเทศไทย โดยใช้ ยีนไซโตโครมออกซิเดสบี ในไมโตคอนเดรียลจีโนม มาศึกษาการเปลี่ยนแปลงหรือการถูกแทนที่ของเบสบนยีนดังกล่าว โดยใช้เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่เพื่อเพิ่มปริมาณยีน และตรวจสอบลายพิมพ์ ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ แล้วนำรูปแบบที่เป็นแถบลายพิมพ์ มาศึกษาตามสมมติฐานการวิจัยที่ว่า มีความแตกต่างแปรผันเชิงพันธุกรรมเข้ามาเกี่ยวข้องด้วยหรือไม่

การเตรียมตัวอย่างดีเอ็นเอ ก่อนที่จะนำมาเพิ่มปริมาณโดยใช้เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่ แหล่งที่เป็นเลือด และขนไม่มีความเหมาะสม เนื่องจากเป็นการรบกวนนก และทำให้นกเครียด ส่วนแหล่งที่เป็นกล้ามเนื้อเป็นแหล่งที่มีความเหมาะสมพอควรเนื่องจากมีนกที่ตายแล้วครบทุกกลุ่ม และกล้ามเนื้อเป็นเนื้อเยื่อที่ประกอบด้วยเซลล์ที่ต้องการใช้พลังงานสูงจึงเป็นแหล่งที่มีไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอมาก อย่างไรก็ตาม การที่ตัวอย่างนกขุนทองตายแล้ว และการเก็บรักษาที่นาน อาจมีผลต่อปริมาณ คุณภาพ และลักษณะทางกายภาพของดีเอ็นเอ (Dessauer et al. 1990,38)

ผลการสกัดดีเอ็นเอ สามารถสกัดดีเอ็นเอจาก กล้ามเนื้อ เลือด และโคนขน ยกเว้นส่วนปลายขน ซึ่งเซลล์และเนื้อเยื่อมีความแข็งและเหนียวมาก เนื่องจากมีสารที่เรียกว่า ϕ keratin เป็นองค์ประกอบอยู่ (Gill 1989, 81) ซึ่งมีคุณสมบัติต่อต้านการย่อยทำลายจากเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีนได้ และจัดเป็นสารชีวภาพที่คงทนอย่างมาก (extremely long-lasting biological material) (Gill 1989, 57) อีกทั้งยังไม่ทราบแน่ชัดว่าการจัดระเบียบที่เรียกว่า macromolecular organization เป็นอย่างไร จึงเป็นแหล่งที่ยากที่จะนำดีเอ็นเอออกมาศึกษาได้ภายใต้ข้อจำกัดของอุปกรณ์ที่มีอยู่ (เนื่องจากมีผลต่อการทำให้เซลล์แตก)

การสกัดดีเอ็นเอที่จะนำไปใช้เป็นดีเอ็นเอแม่พิมพ์ ในเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่ได้ใช้ดีเอ็นเอจากกล้ามเนื้อซึ่งเป็นการสกัดดีเอ็นเอแบบรวมทั้งหมด และเป็นแบบที่ใช้สารละลายฟีนอลเพื่อกำจัดโปรตีน ทั้งปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้ไม่คงที่นัก ทั้งนี้เนื่องจาก มีการปนเปื้อนของโปรตีน และฟีนอล ซึ่งจะมีผลต่อค่าอัตราส่วนของการดูดกลืนที่ความยาวคลื่น 260 กับ 280 นาโนเมตร (Harris 1987, 64) และ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการปนเปื้อนของฟีนอล สามารถทำให้คุณลักษณะทางกายภาพของดีเอ็นเอเปลี่ยนแปลง (เกิดขึ้นขณะที่ทำการตกตะกอนดีเอ็นเอ ด้วย absolute ethanol)

(Moore 1992, 2-6)อย่างไรก็ตาม ดีเอ็นเอที่สกัดได้นั้นไม่สามารถหาสัดส่วน ระหว่างนิวเคลียร์ดีเอ็นเอ กับไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอได้

การเพิ่มปริมาณยีนโดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่ควรจะได้มีการหาสภาวะที่เหมาะสม (Kidd and Ruano 1994, 1-22) อย่างไรก็ตาม มีหลายปัจจัยที่จะทำให้ได้สภาวะที่เหมาะสมที่สุดโดยเฉพาะการมีข้อมูลพื้นฐานที่เป็นลำดับที่เป็นคู่เบสของยีนใดยีนหนึ่ง เพื่อนำมาศึกษาแนวโน้มของการเรียงลำดับของคู่เบสที่เหมือน ๆ กันในสิ่งมีชีวิตที่มีระดับอนุกรมวิธานที่ใกล้ชิดกัน ซึ่งจะนำไปสู่การได้ข้อมูลที่เป็นลำดับการเรียงตัวของคู่เบสแบบอนุรักษ์ (conserved sequence or consesus sequence) เพื่อนำมา ออกแบบไพร์เมอร์ ซึ่งไพร์เมอร์ที่จำเพาะมีผลอย่างมากต่อการเกิดผลผลิตที่จำเพาะจากปฏิกิริยาลูกโซ่ และต้องทดลองใช้ไพร์เมอร์ต่าง ๆ หลายคู่เพื่อให้เกิดผลผลิตที่จำเพาะจากปฏิกิริยาลูกโซ่ และให้มีแถบของดีเอ็นเอที่ไม่จำเพาะเกิดขึ้นน้อยที่สุดหรือไม่มีเลย (สุรเทพ ภู่ทอง 2541) (Zang and Hewitt 1996, 250) สำหรับงานวิจัยนี้ แม้ว่าไม่มีข้อมูลที่เป็นลำดับของคู่เบสดีเอ็นเอในกลุ่มของนกที่มีอนุกรมวิธานที่ใกล้เคียงกันกับนกขุนทอง แต่ได้ยึดหลักการในการเลือก ยีนไซโตโครมออกซิเดสบี ดังที่กล่าวมาแล้วใน บทที่ 2 และ 3 และงานวิจัยนี้ได้มีการทดสอบผลผลิตจากปฏิกิริยาลูกโซ่ขนาด 650 คู่เบส ว่าคือ ส่วนของยีนไซโตโครมออกซิเดสบีในผลการทำ Nested PCR ดังผลการทดลองภาพที่ 12 และไม่ได้ใช้ผลผลิตปฏิกิริยาลูกโซ่ เพื่อศึกษาเปรียบเทียบความแตกต่างของนกขุนทองตัวอย่างแต่ละกลุ่ม แต่ต้องนำผลผลิตปฏิกิริยาลูกโซ่ไปตรวจสอบลายพิมพ์ ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะอีกครั้งหนึ่ง แล้วจึงตรวจสอบแถบที่เป็นลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ของนกขุนทองแต่ละกลุ่ม

ผลลัพธ์หลังการตรวจสอบลายพิมพ์ ยีนไซโตโครมออกซิเดสบี ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะมี 3 ชนิดที่ให้ผลเป็นรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่หลากหลายขนาดต่าง ๆ ได้แก่ *Bsa* JI, *Bst* YI, และ *Pst* I แต่มีบางแถบดีเอ็นเอที่เข้มชัดมาก และมีบางแถบไม่ชัดเจน ทั้งนี้ เนื่องจากปริมาณดีเอ็นเอ ที่ใช้ตัดไม่สามารถทำให้เท่ากันทุกตัวอย่างอย่างเที่ยงตรงได้ อย่างไรก็ตาม ปริมาณดีเอ็นที่ใช้ตัดนั้นได้ประมาณเป็นช่วงของความเข้มข้น อย่างหยาบ ๆ ด้วยการเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานบนแผ่นเจล แต่อาจมีบางตัวอย่างประมาณได้มากและน้อยกว่าความเป็นจริง และได้ควบคุมปัจจัยด้านต่าง ๆ เช่น

อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการบ่ม รวมทั้งใช้จำนวนหน่วยของเอนไซม์ที่เท่ากัน ในทุกปฏิกิริยาของดีเอ็นเอตัวอย่าง

การวิเคราะห์ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดต่าง ๆ หลังจากการตรวจสอบลายพิมพ์ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 3 ชนิดดังกล่าวโดยอาศัยแนวทางจาก

1. ขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ปรากฏเป็นแถบร่วมกันในทุกตัวอย่างนกขุนทองเพื่อดูแนวโน้มความเหมือนร่วมกัน (common band) ที่ให้ผลรวมมีขนาดเท่ากับ 650 คู่เบส

2. หาความเป็นไปได้ที่จะอธิบาย แถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ปรากฏว่ามีรูปแบบที่นอกเหนือไปจากข้อแรก พบว่ามี

2.1 ปรากฏการณ์การมีรูปแบบที่มากกว่า 1 รูปแบบใน 1 เซลล์ หรือ 1 ตัวซึ่งเรียกว่า sequence heteroplasmy ซึ่งมีสาเหตุจาก

2.2.1 การปนเปื้อนจากนิวเคลียร์ยีน ซึ่งเป็นยีนชุดเดียวกันกับที่อยู่ในไมโตคอนเดรียลยีน และเป็นชุดของยีนที่ถูกสอดแทรกเข้าไปอยู่ในนิวเคลียร์ยีนในช่วงต้น ๆ ของประวัติวัฒนาการของ การเกิด eukaryotic cell type ยีนชุดนี้มีอัตราวิวัฒนาการที่ช้ากว่าเสมือนหนึ่งว่าเป็นโมเลกุลที่มิได้มีการเปลี่ยนแปลงใด ๆ (Molecular “fossil”) เมื่อเปรียบเทียบกับยีนอีกชุดหนึ่งที่อยู่ในไมโตคอนเดรีย (Zhang and Hewitt 1996, quoted in Fukuda et al. 1985; Arctander 1995; Collura and Stewart 1995; Zischler et al.1995)

2.2.2 การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นอย่างแท้จริงในไมโตคอนเดรียลยีน ซึ่งเกิดจากคุณสมบัติ การมีจำนวนชุดของยีนอยู่มากในหนึ่งเซลล์หรือหนึ่งตัว ที่เรียกว่า high copy-number per cell or individual อาจเกิดความแปรผันขึ้นในลักษณะที่เรียกว่า copy-number variant

2.2 การตัดยีน หรือดีเอ็นเอ ที่ไม่สมบูรณ์ของเอนไซม์ตัดจำเพาะ

อย่างไรก็ตามการที่จะตรวจพบความหลากหลายเชิงพันธุกรรมในประชากรของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดได้นั้น ขึ้นอยู่กับ คุณสมบัติของยีนหรือดีเอ็นเอที่จะศึกษา และวิธีการตรวจสอบยีนหรือดีเอ็นเอที่จะศึกษา รวมทั้งคุณสมบัติบางประการของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด เช่น biological potential ซึ่งต้องเหมาะสมและสอดคล้องกัน

การนำยีนใดยีนหนึ่งหรือส่วนใดส่วนหนึ่งของดีเอ็นเอในไมโตคอนเดรียล ดีเอ็นเอ มาเป็นเครื่องหมายของการตรวจสอบความหลากหลาย อาจไม่เหมาะสมและไม่สามารถเป็นเครื่องชี้แนะที่แน่นอนได้ว่า มีความหลากหลายเชิงพันธุกรรมเกิดขึ้นในประชากรของสัตว์ในแต่ละชนิดได้เหมือนกันทั้งหมด ทั้งนี้เนื่องจาก

1) ยีนในไมโตคอนเดรียหนึ่งยีน ไม่สามารถสะท้อนให้ทราบถึงความแตกต่างแปรผันที่เกิดขึ้นในไมโตคอนเดรียลจีโนมทั้งหมดได้ และไมโตคอนเดรียลจีโนมทั้งหมดเป็นเพียงยีนตำแหน่งหนึ่ง เมื่อเทียบกับยีนอีกหลากหลายชนิดที่มีตำแหน่งต่าง ๆ อยู่บนโครมโมโซมของนิวเคลียร์จีโนมที่ประกอบกันเป็นระบบพันธุกรรมทั้งหมดของเซลล์ ได้

2) นักวิทยาศาสตร์ ยังไม่สามารถหาคำตอบที่เกี่ยวกับอณูพันธุศาสตร์ของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอได้ทั้งหมด โดยเฉพาะอย่างยิ่ง คำถามที่เกี่ยวกับความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของดีเอ็นเอที่แยกกันไปคนละทาง ระหว่างความแตกต่างที่เกิดในไมโตคอนเดรีย และความแตกต่างที่เกิดขึ้นในนิวเคลียส แต่น่าแปลกว่า ได้มาประสานร่วมกันทำงานเป็นหนึ่งเซลล์ที่มีสารพันธุกรรมสองระบบได้อย่างไร (Birky 1983)

3) การพบความแตกต่างของรูปแบบของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ มากกว่าหนึ่งรูปแบบ ในหนึ่งเซลล์หรือหนึ่งตัว มีทั้งชนิดที่เรียกว่า length heteroplasmy และ sequence heteroplasmy (Zang and Hewitt 1996) ทำให้ไม่เหมาะสมที่จะศึกษาความแตกต่างแปรผันทางพันธุกรรมที่มีสาเหตุมาจากการแทนที่ของเบสบนเส้นดีเอ็นเอของไมโตคอนเดรีย เพราะคุณสมบัติที่เรียกว่า effective haploidy เปลี่ยนแปลงไป อย่างไรก็ตาม ยีนทุกยีนในไมโตคอนเดรียลจีโนมของสัตว์แต่ละชนิด คงจะมีคุณสมบัติไม่เหมือนทุกยีน ซึ่งบางยีนอาจยังคงคุณสมบัติดังกล่าวไว้ได้

การตรวจสอบความแตกต่างแปรผันเชิงพันธุกรรมโดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะเพื่อตรวจสอบลายพิมพ์ยีนไซโตโครมออกซิเดสบี และใช้เทคนิคซับมารีนอะกาโรสเจลอิเล็คโตรฟอรีซิส เพื่อตรวจสอบผลลายพิมพ์ที่ปรากฏเป็นแถบขนาดต่าง ๆ ยังมีข้อจำกัดที่ไม่สามารถนำมาใช้ตรวจสอบความแตกต่างแปรผันที่เกิดขึ้นในประชากรของสัตว์แต่ละชนิดได้เหมือนกันทั้งหมด ทั้งนี้เนื่องจาก

1) ความแตกต่างแปรผันเชิงสันฐานวิทยา ในประชากรของนกขุนทองซึ่ง

เป็นความแตกต่างแปรผันของสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกัน (intraspecific variation) ซึ่งอยู่ในอนุกรมวิธานในระดับ สกุล (genus) และชนิด (species) เดียวกันโดยยึดแบบแผน 1) biological species concept, 2) ecological species concept, 3) phenetic species concept, และ 4) recognition species concept (Ridley 1993, 383-407) อาจมีความแตกต่างแปรผันเชิงพันธุกรรมในรูปแบบอื่น ๆ ที่ชัดเจนและสอดคล้องกับความแตกต่างแปรผันเชิงสัณฐานวิทยาในประชากรของนกขุนทองมากกว่า

2) อาจเกิดการแทนที่ของเบสขึ้นในบริเวณอื่น ๆ แต่ไม่ได้เกิดในบริเวณจดจำที่เอนไซม์ตัดจำเพาะเข้ามาตัด

3) อาจมีการแทนที่ของเบสเกิดขึ้นในบริเวณจดจำที่เอนไซม์ตัดจำเพาะเข้ามาตัด แต่ไม่สามารถตรวจสอบความแตกต่างของขนาดดีเอ็นเอที่ปรากฏเป็นแถบต่าง ๆ ได้ เนื่องจากมีความแตกต่างของขนาดดีเอ็นเอเพียง 4-6 คู่เบสเท่านั้น ซึ่งอะกาโรสเจลความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ไม่สามารถตรวจสอบความแตกต่างนี้ได้

ข้อเสนอแนะ

การนำยีนไซโตโครมออกซิเดสบี เพียงหนึ่งยีนจากไมโตคอนเดรียลจีโนมมาเป็นเครื่องหมายของการตรวจสอบความแตกต่างแปรผันเชิงพันธุกรรม โดยใช้เทคนิค PCR-RFLP อาจไม่เพียงพอเพื่อที่จะศึกษาว่า กลุ่มตัวอย่างนกขุนทองมีความแตกต่างแปรผันเชิงพันธุกรรมเข้ามาเกี่ยวข้อง และมีความสอดคล้องร่วมกับความแตกต่างแปรผันเชิงสัณฐานวิทยา ควรที่จะ

1. เลือกสุ่มยีน หรือส่วนของดีเอ็นเอแต่ละประเภทจากไมโตคอนเดรียลจีโนมให้ครบ เช่น เลือกยีนที่ทำหน้าที่สังเคราะห์โปรตีน ยีนที่ทำหน้าที่สังเคราะห์อาร์เอ็นเอชนิดต่าง ๆ ยีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการกระบวนสังเคราะห์อาร์เอ็นเอ และส่วนของดีเอ็นเอที่เป็นช่วงต่อระหว่างยีน รวมทั้งเลือกสุ่ม ยีนชนิดต่าง ๆ จากนิวเคลียร์จีโนม เช่น ส่วนของดีเอ็นเอที่เป็น intron ของยีนต่างๆ หรือ ส่วนของดีเอ็นเอที่เป็น single-copy gene

2. ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่าง ๆ มากขึ้น

3. เพิ่มจำนวนนกขุนทองแต่ละกลุ่ม และควรกำหนดแหล่งอาศัยที่สอดคล้องกับสัณฐานวิทยาของนกขุนทองแต่ละกลุ่มที่จะนำมาศึกษาให้ชัดเจน หรือ อีกทางเลือกหนึ่ง คือ สุ่มเก็บตัวอย่างนกขุนทองจากแหล่งอาศัยที่แตกต่างกันในธรรมชาติมาศึกษา

บรรณานุกรม

ทวีศักดิ์ ตีระวัฒนพงษ์. 2541. Enzymatic Manipulation of DNA and RNA. ใน **อณูชีววิทยาทางการแพทย์**, บรรณาธิการโดย นเรศร สุขเจริญ, อภิวัฒน์ มุทิรางกูร และยง ภู่วรวรรณ, หน้า41. กรุงเทพมหานคร: เท็กซ์ แอนด์ เจอร์นัล พับลิเคชั่น.

ดวงพร สีหนันทวงศ์. 2540. ความหลากหลายทางพันธุกรรมในไมโทคอนเดรียลยีนของผึ้งโพรง *Apis cerana* ในประเทศไทย. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

มณี อัชวรานนท์. 2525. **วิวัฒนาการ**. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานคร: ศรีเมืองการพิมพ์.

_____. 2539. นกขุนทองไทย. ใน **การเลี้ยงและขยายพันธุ์นกขุนทองไทย**, หน้า 3-10. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยรามคำแหง.

_____. 2541. โครงการวิจัยนกขุนทองไทย. ใน **27 ปีมหาวิทยาลัยรามคำแหง**, หน้า 22-24. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยรามคำแหง.

ประพนธ์ วิไลรัตน์. 2528. การแยกสารออกจากกันโดยอาศัยแรงเหวี่ยง. ใน **เอกสารประกอบการประชุมปฏิบัติการเรื่อง การแยกของสาร** , หน้า 90-95. กรุงเทพมหานคร: สมาคมวิทยาศาสตรแห่งประเทศไทยฯ ร่วมกับ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร.

พรชัย วงศ์วาสนา. 2543. การศึกษาชีววิทยาประชากรของนกขุนทองในประเทศไทย. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยรามคำแหง.

ลินดา บุหงาเรือง. 2539. การตรวจสอบความหลากหลายทางสายพันธุ์ของผึ้งโพรง *Apis cerana* ในประเทศไทยโดยหาลำดับเบสของไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนโดยพอลิเมอเรสเชนรีเอ็กชัน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วราภรณ์ กิจวิริยะ. 2529. **หลักวิทยาฮีสโต**. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยรามคำแหง.

วาสนา ศิริรังษี. 2539. Gel electrophoresis. ใน **วิทยาการทันสมัยในการตรวจวินิจฉัยโครโมโซมและยีน**, บรรณาธิการโดย วสันต์ จันทราทิตย์, ปราณี ลี้ชนะชัย และวาสนา ศิริรังษี, หน้า 8-2. เชียงใหม่: พงษ์สวัสดิ์ การพิมพ์.

วิสุทธิ์ ใบไม้. 2536. **พันธุศาสตร์**. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพมหานคร: เจ้าพระยาระบบการพิมพ์.

_____. 2538. ความหลากหลายทางพันธุกรรม. ใน **สถานภาพความหลากหลายทางชีวภาพในประเทศไทย**, หน้า 33-35. กรุงเทพมหานคร: สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย.

สุรเทพ ภู่ทอง. 2541. การตรวจสอบความแตกต่างแปรผันทางพันธุกรรมของผึ้งโพรงไทย *Apis cerana* โดยใช้บริเวณควบคุมของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

อาภัสสรา ชมิดท์. 2537. เทคนิคที่สำคัญทางชีวเคมี. ใน **คู่มือทางชีวเคมี**, หน้า 58-59. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานคร: สหมิตรปริ้นติ้ง.

อรอุมา ซองรัมย์. 2540. การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของผึ้งโพรง *Apis cerana* ด้วยเทคนิค PCR-RFLP ของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอบริเวณจีน ATPase 6 - ATPase 8. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

Adams, Roger L. P., John T. Knowler, and David P. Leader. 1992. Appendix : methods of studying nucleic acids. In **The biochemistry of the nucleic acids**, 593-656. 11th ed. London: Chapman & Hall.

Aljanabi, Salah M., and Iciar Martinez. 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. **Nucleic acid research** 25: 4692-4693.

Avise, John C., and Robert M. Zink. 1988. Molecular genetic divergence between avian sibling species: King and Clapper Rails, Long-billed and Short-billed Dowitchers, Tufted and Black-crested Titmice. **Auk** 105: 516-528.

Avise, John C., and William S. Nelson. 1989. Molecular genetic relationships of the extinct Dusky Seaside Sparrow. **Science** 243: 646-648.

_____, Jonathan Arnold, R. Martin Ball, Eldredge Bermingham, Trip Lamp, Joseph E. Neigel, Carol A. Reeb, and Nancy C. Saunders. 1987. Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. **Ann. Rev. Ecol. Syst.** 18: 489-522.

Ball, R. Martin, Jr., Scott Freeman, Frances C. Jemes, Eldredge Bermingham, and John C. Avise. 1988. Phylogeographic population structure of Red-winged Blackbirds assessed by mitochondrial DNA. **Evolution** 85: 1558-1562.

_____, and John C. Avise. 1992. Mitochondrial DNA phylogeographic differentiation among avian populations and the evolutionary significance of subspecies. **Auk** 109: 626-636.

Bermingham, Eldredge, Sievert Rowher, Scott Freeman, and Chris Wood. 1992. Vicariance biogeography in the Pleistocene and speciation in North American Wood Warbler: A test of Mengel's model. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 89: 6624-6628.

Birky, C. William, Jr. 1983. Relaxed cellular controls and organelle heredity. **Science** 22: 468-475.

Brown, Wesley M., Matthew George, Jr., and Allan C. Wilson. 1979. Rapid evolution of animal mitochondria DNA. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 76: 1967-1971.

Cicero, Carla, and Ned K. Johnson. 1995. Speciation in Sapsuckers(*Sphyrapicus*): III. Mitochondrial-DNA sequence divergence at the cytochrome-b locus. **Auk**. 112 (3): 547-563.

Desjardins, Paul, and Rejean Morais. 1990. Sequence and gene organization of the chicken mitochondrial genome: A novel gene order in higher vertebrates. **J. Mol. Biol.** 212: 599-634.

Dessuer, Herbert C., Charles J. Cole, and Mark S.Hafner. 1990. Collection and storage of tissues. In **Molecular Systematics**, eds. David M. Hillis, and Craig Moritz, 25-41. Massachusetts: Sinauer.

Fleischer, Robert C. 1983. A comparison of theoretical and electrophoretic assessments of genetic structure in populations of the House Sparrow (*Passer domesticus*). **Evolution** 37: 1001-1009.

Gill, Frank B. 1990. **Ornithology**. New York: W. H. Freeman.

_____, Alison M. Mostron, and Andrew L. Mack. 1993. Speciation in North American Chickadees: I. Patterns of mt DNA genetic divergence. **Evolution** 47: 195-212.

Harris, D.A. 1987. Spectrophotometric Assays. In **Spectrophotometry & spectrofluorimetry**, eds. D.A. Harris and C. L. Bashford, 49-90. Oxford: IRL Press.

Hart, Daniel L., and Andrew G. Clark. 1989. Darwinian evolution in mendelian population. In **Principles of Population Genetics**, 7-8. 2d ed. Sunderland: Sinauer.

Hillis, Davis M., Allan Larson, Scott K. Davis, and Elizabeth A. Zimmer. 1990. Nucleic acid III: sequencing. In **Molecular systematics**, eds. Davis M. Hillis, and Craig Moritz, 339-340. Massachusetts: Sinauer.

Jeffries, Michael J. 1997. The creation of biodiversity. In **Biodiversity and conservation**, 39. New York: Routledge.

Karcher, Susan J. 1995. Recombinant DNA cloning. In **Molecular biology**, 109-110. San Diego: Academic Press.

Kaufman, Peter B., William Wu, Donghern Kim, and Leland J. Cseke. 1995. Isolation and purification of DNA. In **Handbook of molecular and cellular methods in biology and medicine**, 1-5. Florida: CRC Press.

Kidd, K. K., and G. Ruano. 1994. Optimizing PCR. In **PCR 2**, eds. M. C. McPherson, B. D. Hames, and G. R. Taylor, 1-22. Oxford: IRL Press.

Klein, Nedra, and Wesley M. Brown. 1994. Intraspecific molecular phylogeny in the yellow warbler (*Dendroica petechia*), and implications for avian biogeography in the West Indies. **Evolution** 48: 1914-1932.

Landdgraf, Axel, and Hriner Wolfes. 1993. Tag polymerase. In **Enzymes of molecular biology**, eds. Michael M. Burrel, 35, 42. New Jersey: Humana Press.

Lansman, Robert A., John C. Avise, and Milton D. Huettel. 1983. Critical experimental test of the possibility of "paternal leakage" of mitochondrial DNA. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 80: 1969-1971.

Lekagul, Boonsong, and Philip D. Round.1991. **A Guide to the Birds of Thailand.** Bangkok: Darnsutha Press.

Manee Archawaranon, and Pornchai Wongwasana. 1998. Morphological variation of Hill Mynahs in Thailand. **Ostrich** 69, 3-4: 395.

_____ , and Bongkotrat Techatraisak. 2002. Latitudinal variation in morphology of Hill Mynahs in Thailand. **Condor** (In press).

Maniatis, T, E. F. Fritsch, and J. Sambrook. 1982. Purification of nucleic acids. In **Molecular cloning**, 459. New York: Cold Spring Harbor.

Martinez, Gonzalo, Ehwen Monica Shaw, Manuel Carrillo, and Silvia Zanuy.1998. Protein salting-out method applied to genomic DNA isolation from fish and whole blood. **Biotechniques** 24: 238-239.

McDonald, John. 1995. Transposable elements: possible catalysts of organismic evolution. **Trends Ecol. Evol.** 10: 123-126.

McElroy, D., P. Moran, E. Bermingham, and I. Kornfield. 1991. **The restriction enzyme analysis package version 4.0**. Department of zoology, Migratory Fish Research Institute and Central for Marine Study, University of Maine.

Meyer, Axel. 1994. DNA technology and phylogeny of fish. In **Genetics and Evolution of Aquatic Organisms**, ed. A.R. Beaumont, 219-249. London: Chapman & Hall.

Mindell, Davis P, Michael D. Sorenson, and Derek E. Dimcheff. 1998. Multiple independent origins of mitochondrial gene order in birds. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 95: 10693-10697.

Moore, David D. 1992. Preparation and analysis of DNA. In **Short protocols in molecular biology**, eds. Frederick M. Ausubel, Roger Brent, Robert E. Kingston, David D. Moore, J. G. Seidman, John A. Smith, and Kevin Struhl, 2-6. 2d ed. New York: John Wiley & Sons.

Moore, William S., and Victor R. DeFilippis. 1997. The window of taxonomic resolution for phylogenies based on mitochondrial cytochrome b. In **Avian molecular evolution and systematic**, ed. Davis P. Mindell, 301-324. San Diego: Academic Press.

Moritz, C., T. E. Dowling, and W. M. Brown. 1987. Evolution of animal mitochondrial DNA: Relevance for population biology and systematics. **Ann. Rev. Ecol. Syst.** 18: 262-292.

Nei, Masatoshi, and Fumio Tajima. 1981. DNA polymorphism detectable by resrtiction endonucleases. **Genetics**. 97: 145-163.

New England Biolabs. 1990. **1990-1991 Catalog**. New York: New England Biolab.

Pinggoud, Alfred, Jurgen Alves, and Robert Geiger. 1993. Restriction enzymes. In **Enzymes of molecular biology**, ed. Michael M. Burrell, 108. New Jersey: Humana Press.

Quinn, Thomas W. 1997. Molecular evolution of the mitochondrial genome. In **Avian molecular evolution and systematics**. ed. Davis P. Mindell, 5. San Diego: Academic Press.

Ridley, Mark. 1993. The idea of a species. In **Evolution**, 383-407.Oxford: Blackwell.

Rising, James, and John C. Avise. 1993. Application of genealogical concordance principles to the taxonomy and evolution history of the Sharp-tailed Sparrow (*Ammodramus caudatus*). **Auk** 110: 844-856.

Robson, Craig. 2000. **A Guide to the Birds of Thailand and South-east Asia.** Singapore: Tei Wah.

Seutin, Gilles, Jefferey Brawn, Robert E. Rickless, and Eldredge Bermingham. 1993. Genetic divergence among populations of a tropical passerine, the Streaked Saltator (*Saltator albicollis*). **Auk** 110: 117-126.

_____ , Nedra K. Klein, Robert E. Ricklefs, and Eldredge Bermingham. 1994. Historical biogeography of the Bananaquit (*Coereba flavelola*) in the Caribbean region: A mitochondrial DNA assessment. **Evolution** 48: 1041-1061.

Sibley, Charle G., and Burt L. Monroe, Jr. 1990. **Distribution and taxonomy of birds of the world.** London: Yale University Press.

Skulason, Skuli, and Thomas B. Smith. 1995. Resource polymorphisms in vertebrates. **Trends Ecol. Evol.** 9: 366-370.

Smith, D. R., and W. M. Brown. 1988. Polymorphisms in mitochondrial DNA of European and Africanized honeybees (*Apis mellifera*). **Experimentia** 44: 257-260.

Smith, Thomas B., and Skuli Skulason. 1996. Evolutionary significance of resource polymorphisms in fishes, amphibians, and birds. **Ann. Rev. Ecol. Syst.** 27: 111-131.

Steven, Lewis. 1996. **Avian biochemistry and molecular biology**. Great Britain: Cambridge University Press.

Strachan, Tom, and Andrew P. Read. Organization and expression of the human genome. In **Human Molecular Genetics**, 147. New York: John Wiley & Sons.

Tamen, Imke, Julie Cavanagh, and Marilyn Jones. 2000. DNA – Methodology. TASEAP, Thailand- Australia Science & Engineering Assistance Project. Silpakorn University, 28 February - 17 March.

Volkenandt, Matthias, Adam P. Dicker, Renato Fanin, Debabrata Bannerju, Anthony Albino, and Joseph R. Bertino. 1993. Polymerase chain reaction analysis of DNA from paraffin-embedded tissue. In **PCR protocols**, ed. Bruce A. White, 84. New Jersey: Humana Press.

Wallace, Douglas C. 1982. Structure and Evolution of Organelle Genomes. **Microbiological Reviews** 46: 208-240.

White, P. Scott, and Llewellyn D. Densmore III. 1992. Mitochondrial DNA isolation. In **Molecular genetic analysis of populations**, ed. A. R. Hoelzel, 23-30. Oxford: Oxford university press.

Zhang, De-Xing, and Godfrey M. Wewitt. 1996. Nuclear integrations: challenges for mitochondrial DNA markers. **Trends Ecol. Evol.** 11: 247-251.

Zink, Robert M. 1991. The geography of mitochondrial DNA variation in two sympatric sparrows. **Evolution** 45: 329-339.

_____ , and Donna L. Dittmann. 1993. Gene flow, refugia and evolution of geographic variation in the Song Sparrow (*Melospiza melodia*). **Evolution** 47: 717-729.

_____ . 1997. Phylogeographic studies of North American birds. In **Avian molecular evolution and systematics.** ed. Davis P. Mindell, 301. San Diego: Academic Press.

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-ชื่อสกุล	: นาย เพชร ศรีสุรเมธีกร
วัน เดือน ปีเกิด	: 1 ตุลาคม พ. ศ. 2512
สถานที่เกิด	: จังหวัดเพชรบูรณ์
วุฒิการศึกษา	: สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนปลายจาก โรงเรียนวังน้ำเย็นวิทยาคม ปีการศึกษา 2531 สำเร็จปริญญาตรี วิทยาศาสตรบัณฑิต(ชีววิทยา) จาก มหาวิทยาลัยรามคำแหง ปีการศึกษา 2535
ผลงานทางวิชาการ	: มณี อัชวรานนท์ อำนาจ มีเวที บงกชรัตน์ เตชะไตรศักดิ์ ธิดารัตน์ เอกสิทธิกุล นวลฉวี เวชประสิทธิ์ พรชัย วงศ์วาสนา นารี สุทธิคำ และ เพชร ศรีสุรเมธีกร. 2545. การกำเนิดความแปรผันของกลุ่มประชากรนกขุนทองในประเทศไทย. **วารสารวิทยาศาสตร์** 56 (มีนาคม – เมษายน): 92-99.