การแปรผันของยีนดี-ลูปในประชากรธรรมชาติของนกยูงเขียว *Pavo muticus* Linnaeus, 1766 ในประเทศไทย

นางสาวธนาพร แสวงธรรม

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย
The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาสัตววิทยา ภาควิชาชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2558
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

D-LOOP GENE VARIATION IN NATURAL POPULATIONS OF GREEN PEAFOWL *Pavo muticus* Linnaeus, 1766 IN THAILAND

Miss Thanaporn Sawangtham

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science Program in Zoology

Department of Biology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2015

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การแปรผันของยีนดี-ลูปในประชากรธรรมชาติของนกยูงเขียว *Pavo muticus* Linnaeus, 1766 ในประเทศไทย
โดย	นางสาวธนาพร แสวงธรรม
สาขาวิชา	สัตววิทยา
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	อาจารย์ ดร.อัมพร วิเวกแว่ว

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(รองศาสตราจารย์ ดร.พลกฤษณ์ แสงวณิช)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(อาจารย์ ดร.นพดล กิตนะ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(อาจารย์ ดร.อัมพร วิเวกแว่ว)

.....กรรมการ

(อาจารย์ ดร.ณัฐพจน์ วาฤทธิ์)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พงชัย หาญยุทธนากร)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(นายสัตวแพทย์ ดร.บริพัตร ศิริอรุณรัตน์)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ธนาพร แสวงธรรม : การแปรผันของยีนดี-ลูปในประชากรธรรมชาติของนกยูงเขียว *Pavo muticus* Linnaeus, 1766 ในประเทศไทย (D-LOOP GENE VARIATION IN NATURAL POPULATIONS OF GREEN PEAFOWL *Pavo muticus* Linnaeus, 1766 IN THAILAND) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: อ. ดร.อัมพร วิเวกแว่ว, หน้า.

ประชากรนกยูงไทยหรือนกยูงเขียวในประเทศไทยได้ลดจำนวนลงอย่างรวดเร็ว โดยมีสาเหตุหลักๆ อันเนื่องมาจากป่าอันเป็นถิ่นที่อยู่อาศัยของนกยูงลดจำนวนลง และจากการโดนล่าโดยมนุษย์ ทำให้ปัจจุบันนกยูงในประเทศไทยที่สามารถอยู่รอดได้ในธรรมชาติ มีการกระจายตัวอยู่เพียง 2 บริเวณหลัก ๆ คือ ทางภาคเหนือและทางตะวันตกเท่านั้น ซึ่งงานวิจัยทางด้านพันธุกรรมยังมีจำนวนน้อย ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้มีจุดประสงค์เพื่อตรวจสอบความแปรผันทางพันธุกรรมของนกยูง ด้วยวิธีทางอณูชีววิทยา โดยทำการเก็บขนนกยูงและเปลือกไข่ จาก 4 พื้นที่ของประเทศไทยทั้งหมด 123 ตัวอย่าง ประกอบด้วย พื้นที่ศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้ อันเนื่องมาจากพระราชดำริ (HHK) จังหวัดเชียงใหม่ จำนวน 27 ตัวอย่าง พื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอ (WLO) จังหวัดพะเยา จำนวน 47 ตัวอย่าง พื้นที่เขตห้ามล่าสัตว์ป่าทับพญาลอ (TPL) จังหวัดเชียงราย จำนวน 27 ตัวอย่าง และพื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง (HKK) จังหวัดอุทัยธานี จำนวน 22 ตัวอย่าง ผลการวิเคราะห์พบจำนวนตำแหน่งที่แตกต่างกันทั้งสิ้น 23 (2.11%) ตำแหน่ง จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีลูปในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอทั้งหมด 1,090 คู่เบส มีจำนวนของแฮพโพลไทป์ที่แตกต่างกัน 25 แฮพโพลไทป์ โดยจำนวนของแฮพโพลไทป์ จาก WLO, TPL, HKK และ HHK มีจำนวน 13, 9, 9 และ 7 แฮพโพลไทป์ ตามลำดับ ความถี่ของแฮพโพลไทป์อยู่ระหว่าง 0.79% - 40.65% ค่าความหลากหลายของแฮพโพลไทป์และค่าความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์ พบว่ามีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.811 และ 0.00314 ตามลำดับ ผลจากการวิเคราะห์ mtDNA haplotype network และแผนภูมิแสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ พบว่าประชากรนกยูงทางภาคเหนือและภาคตะวันตก ยังไม่แยกออกจากกันเป็นกลุ่มย่อยตามพื้นที่การกระจายตัว นอกจากนี้ในการวิเคราะห์ population genetic ยังพบว่าระหว่างประชากรทั้งสองกลุ่มมีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมน้อยมาก (5.20%) และไม่มีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ประกอบกับค่า F_{st} ที่ได้โดยรวมมีค่าเข้าใกล้ศูนย์ แสดงให้เห็นว่าประชากรนกยูงเขียวในสภาพธรรมชาติของประเทศไทยยังไม่แยกออกจากกันเป็นกลุ่มประชากรย่อย (population subdivision)

ภาควิชา ชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา สัตววิทยา ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....

ปีการศึกษา 2558

5571995023 : MAJOR ZOOLOGY
KEYWORDS: GENETIC DISTANCE / HAPLOTYPE NETWORK / MITOCHONDRIAL DNA / PEAFOWLS / POPULATION SUBDIVISION

THANAPORN SAWANGTHAM: D-LOOP GENE VARIATION IN NATURAL POPULATIONS OF GREEN PEAFOWL *Pavo muticus* Linnaeus, 1766 IN THAILAND. ADVISOR: AMPORN WIWEKWEAW, Ph.D., pp.

The population size of *Pavo muticus* (Green Peafowl) has declined dramatically in Thailand due to the habitat loss and human exploitation. At present, *P. muticus* is distributed in patchy areas only in northern and western Thailand. However, research on population genetics is rear. In order to determine how much genetic diversity differs between northern and western populations in Thailand, this study aimed to examine the genetic variation of *P. muticus* using a molecular genetic approach. To achieve this goal, 123 molting feathers or egg shells were collected from four locations: Huai Hong Khrai Royal Development Study Center, Chiang Mai (HHK; n=27), Wiang Lor Wildlife Sanctuary, Phayao (WLO; n=47), Tapayalor Non-Hunting Area, Chiang Rai (TPL; n=27) and Huai Kha Khaeng Wildlife Sanctuary, Uthai Thani (HKK; n=22). This study found 23 (2.11%) variable nucleotides from 1,090 bps of the aligned mitochondrial D-loop (control region) sequences, resulting in 25 haplotypes, of which 13, 9, 9 and 7 haplotypes were from the WLO, TPL, HKK and HHK population, respectively. The haplotype frequency ranged from 0.79% - 40.65%. Overall diversity indices were 0.811 and 0.00314 for haplotype and nucleotide diversities, respectively. The results from mtDNA haplotype network and phylogenetic analyses revealed that *P. muticus* from northern and western populations were not clearly subdivided, regardless of their distribution ranges. In addition, the population genetic analyses showed low genetic difference (5.20%) and no significant differences in genetic diversity between the two populations. Moreover, low overall F_{st} value indicated that the population did not differentiated from each other. These results indicate that the wild populations of green peafowl in Thailand are not population subdivision.

Department:	Biology	Student's Signature	.....
Field of Study:	Zoology	Advisor's Signature	.....
Academic Year:	2015		

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี เนื่องมาจากได้รับความกรุณาอย่างสูงจาก อาจารย์ ดร.อัมพร วิเวกแว่ว อาจารย์ที่ปรึกษางานวิจัย ที่มอบเวลาอันมีค่าในการให้คำแนะนำปรึกษา ตลอดจนปรับปรุงแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ด้วยความเอาใจใส่อย่างดียิ่ง ให้คำแนะนำข้อคิด และให้ความช่วยเหลือด้านข้อมูล แนวการทำวิจัยให้ถูกต้องตามระเบียบวิธี ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น ผู้วิจัยได้ตระหนักถึงความตั้งใจจริงและความทุ่มเทของอาจารย์ และขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงมา ณ ที่นี้ด้วย

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์วีณา เมฆวิชัย ที่กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำให้ความรู้ ความเข้าใจ ไปในแนวทางที่ดีและถูกต้องทางด้านข้อมูลทางวิชาการ รวมถึงการออกไปปฏิบัติงานในภาคสนาม

ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.นพดล กิตนะ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พงชัย หาญยุทธนาการ อาจารย์ ดร.ณัฐพจน์ วาฤทธิ์ และนายสัตวแพทย์ ดร.บริพัตร ศิริอรุณรัตน์ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำปรึกษาและคำแนะนำสำหรับการแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ คุณกฤตภาส ขันทะธงสกุลดี หัวหน้าเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอ และคุณเสกสรร มูลอินต๊ะ หัวหน้าเขตห้ามล่าสัตว์ป่าทับพญาลอ คุณศศิธร นิสภา คุณกรานตนา สุทธิวงศ์ คุณเดชา จักรสาน และเจ้าหน้าที่ทุกท่านจากเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอและเขตห้ามล่าสัตว์ป่าทับพญาลอ ที่ให้ความร่วมมือและการช่วยเหลือในการเข้าพื้นที่เพื่อเก็บตัวอย่าง

ขอขอบคุณ ทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์สำหรับนิสิต จากจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่สนับสนุนเงินทุนและสถานที่ในการในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ ขอขอบคุณ คุณกาญจน์ สฤษดิ์นิรันดร์ และคุณศุภกร วงศ์เรืองพิบูล สำหรับการสอนโปรแกรมต่างๆ ในการวิเคราะห์ข้อมูลของงานวิจัยครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณ คุณธารา แสวงธรรม และคุณเพ็ญจิตต์ แสวงธรรม คุณพ่อ-คุณแม่ และญาติพี่น้อง หลานๆ เพื่อนๆ ทุกท่าน ที่ให้การสนับสนุน ให้โอกาสทางการศึกษาตลอดจนเป็นกำลังใจที่สำคัญแก่ข้าพเจ้าในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญ ..... ช

สารบัญตาราง ..... ญ

สารบัญภาพ ..... ฏ

บทที่ 1 บทนำ 1

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 4

2.1 นกยูง 4

2.2 นกยูงไทยหรือนกยูงเขียว 8

2.2.1 อนุกรมวิธาน 8

2.2.2 ลักษณะทั่วไปของนกยูงไทย 9

2.2.3 ถิ่นที่อยู่อาศัยและพฤติกรรมการหาอาหาร 10

2.2.4 พฤติกรรมในฤดูผสมพันธุ์ การเลือกแหล่งทำรัง และการฟักไข่ 10

2.2.5 สถานภาพทางการอนุรักษ์และการแพร่กระจายของนกยูงไทย 11

2.3 การศึกษาและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับนกยูงไทย 16

2.4 พื้นที่ศึกษา 21

2.4.1 พื้นที่ศึกษา ณ ศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้ อันเนื่องมาจากพระราชดำริ จังหวัดเชียงใหม่ 21

2.4.2 พื้นที่ศึกษา ณ เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง จังหวัดอุทัยธานี 24

2.4.3 พื้นที่ศึกษา ณ เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอ จังหวัดพะเยา 26

2.4.4 พื้นที่ศึกษา ณ เขตห้ามล่าสัตว์ป่าทับพญาลอ จังหวัดเชียงราย 28

หน้า

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย 30
3.1 สถานที่ศึกษาและเก็บตัวอย่าง 30
3.2 การเก็บตัวอย่าง 31
3.3 การสกัดดีเอ็นเอ และการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายในหลอดทดลองด้วยเทคนิคพีซีอาร์ 40
3.3.1 วิธีการเตรียม PCR mixture 41
3.4 การตรวจสอบขนาดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis 42
3.5 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) 42
3.6 การวิเคราะห์ข้อมูล 42
บทที่ 4 ผลการศึกษาและอภิปรายผลการศึกษา 47
4.1 ผลการเก็บตัวอย่างขนนกยูงที่หลุดร่วงแล้วในสภาพธรรมชาติจากเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอและเขตห้ามล่าสัตว์ป่าทับพญาลอ 47
4.2 ผลการสกัดดีเอ็นเอ การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิคพีซีอาร์ และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ 60
4.3 ผลการตรวจสอบขนาดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis 62
4.4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรม 70
4.4.1 ข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) ของนกยูงไทย *P. muticus* จากสภาพตามธรรมชาติใน 4 พื้นที่ศึกษา 70
4.4.2 ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของนกยูงไทย *P. muticus* ในสภาพธรรมชาติจากพื้นที่ต่างๆ ในประเทศไทย 79
4.4.3 ผลการวิเคราะห์ mtDNA haplotype network ของนกยูงไทย *P. muticus* ในสภาพธรรมชาติจากพื้นที่ต่างๆ ในประเทศไทย 82
4.4.4 ผลการวิเคราะห์ mtDNA haplotype network ของนกยูงไทย *P. muticus* ในพื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอ และเขตห้ามล่าสัตว์ป่าทับพญาลอ 87

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

หน้า

4.4.5 ผลการวิเคราะห์ population genetics โดยค่าทางสถิติ AMOVA (analysis of molecular variance) ของนกยูงไทย *P. muticus* จากประชากรกลุ่มภูมิภาคเหนือกับประชากรกลุ่มภูมิภาคตะวันตก 92

4.4.6 ผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบความแตกต่างทางพันธุกรรมด้วยค่าทางสถิติ F_{st} ระหว่างกลุ่มประชากรนกยูงไทยจากแต่ละพื้นที่ศึกษา 94

4.4.7 Mismatch distribution 96

4.4.8 Neutrality test 100

บทที่ 5 สรุปผลการศึกษา 102

รายการอ้างอิง 104

ภาคผนวก 112

วัสดุ อุปกรณ์และสารเคมี 113

วัสดุและอุปกรณ์ 113

สารเคมี 114

การสกัดดีเอ็นเอ 115

การตรวจสอบขนาดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis 117

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 118

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 ชื่อและลำดับโอลิโกนิวคลีโอไทด์ของไพร์เมอร์ที่ใช้ในการศึกษา 40

ตารางที่ 2 ตำแหน่ง ชื่อตำแหน่งที่ตั้ง และพิกัด GPS ในการเก็บตัวอย่างขนนกยูงจากเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอและเขตห้ามล่าสัตว์ป่าทับพญาลอ 49

ตารางที่ 3 ตำแหน่ง พื้นที่ศึกษา จำนวนเส้นขนที่เก็บได้ และจำนวนตัวอย่าง (sample size) ที่สามารถระบุได้ โดยพิจารณาตามหลักเกณฑ์ในวิธีการทดลองหัวข้อที่ 3.2.2 จากการเก็บตัวอย่างครั้งที่ 1 จากเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอและเขตห้ามล่าสัตว์ป่าทับพญาลอ..... 53

ตารางที่ 4 ตำแหน่ง พื้นที่ศึกษา จำนวนเส้นขนที่เก็บได้ และจำนวนตัวอย่าง (sample size) ที่สามารถระบุได้ โดยพิจารณาตามหลักเกณฑ์ในวิธีการทดลองหัวข้อที่ 3.2 จากการเก็บตัวอย่างครั้งที่ 2 จากเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอและเขตห้ามล่าสัตว์ป่าทับพญาลอ..... 55

ตารางที่ 5 ตำแหน่ง พื้นที่ศึกษา จำนวนเส้นขนที่เก็บได้ และจำนวนตัวอย่าง (sample size) ที่สามารถระบุได้ โดยพิจารณาตามหลักเกณฑ์ในวิธีการทดลองหัวข้อที่ 3.2.2 จากการเก็บตัวอย่างครั้งที่ 1 และ 2 จากเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอและเขตห้ามล่าสัตว์ป่าทับพญาลอ..... 56

ตารางที่ 6 ผลการสกัดดีเอ็นเอ การเพิ่มปริมาณดีลูปในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ 61

ตารางที่ 7 แสดงผลจากการทำ multiple sequence alignment พบจำนวนของ variable site ทั้งสิ้น 23 (2.11%) ตำแหน่ง..... 73

ตารางที่ 8 ค่าความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) ของนกยูงไทย *P. muticus* ในสภาพตามธรรมชาติจาก 4 พื้นที่ของประเทศไทย ตัวอักษรย่อที่ใช้แสดงในตารางคือ n = จำนวนตัวอย่าง, v = จำนวนของ variable site, h = จำนวนของแฮพโพลไทป์, k = ค่าเฉลี่ยของจำนวน pairwise nucleotide differences, *hd* = haplotype diversity และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (±S.D.) และ

π = nucleotide diversity และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (±S.D.) แฮพโพลไทป์ที่ขีดเส้นใต้แสดงถึงแฮพโพลไทป์ที่มีร่วมกันมากกว่าหนึ่งพื้นที่ศึกษา (shared haplotype) 75

ตารางที่ 9 ค่าระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) ระหว่างและภายในกลุ่มประชากรของนกยูงไทยหรือนกยูงเขียว *P. muticus* ในแต่ละพื้นที่ศึกษา 76

ตารางที่ 10 ข้อมูลต่างๆ ของแฮพโพลไทป์จำนวน 25 แฮพโพลไทป์ (H1-H25) ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ ได้แก่ จำนวนตัวอย่างที่พบแฮพโพลไทป์ในแต่ละพื้นที่ศึกษา และความถี่ของแต่ละแฮพโพลไทป์จากจำนวนตัวอย่างในแต่ละแฮพโพลไทป์นั้นๆ เทียบกับจำนวนตัวอย่างทั้งหมด 123 ตัวอย่าง 85

ตารางที่ 11 จำนวนตัวอย่างและรายชื่อตัวอย่างของนกยูงไทย *P. muticus* ในสภาพตามธรรมชาติของประเทศไทยที่พบในแต่ละแฮพโพลไทป์ จากจำนวนตัวอย่างที่ศึกษาทั้งหมด 123 ตัวอย่าง 86

ตารางที่ 12 ผลการวิเคราะห์ค่าทางสถิติ AMOVA (analysis of molecular variance) ของประชากรนกยูงจาก 4 พื้นที่ศึกษา โดยได้แบ่งออกเป็นสองกลุ่มภูมิภาค ได้แก่ กลุ่มภูมิภาคเหนือ ประกอบไปด้วยสามพื้นที่จากศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้ อันเนื่องมาจากพระราชดำริ เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอ และเขตห้ามล่าสัตว์ป่าทับพญาลอ และกลุ่มภูมิภาคตะวันตก ประกอบไปด้วยหนึ่งพื้นที่จากเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง 93

ตารางที่ 13 การวิเคราะห์เปรียบเทียบความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่มประชากรนกยูงไทยจาก 4 พื้นที่ศึกษา โดยค่าทางสถิติ F_{st} (พื้นที่สีขาว) และค่า *p*-value (พื้นที่สีเทา) 95

ตารางที่ 14 การวิเคราะห์ Mismatch distribution หรือ distribution of pairwise differences ของนกยูงไทยในแต่ละพื้นที่ศึกษา 97

ตารางที่ 15 การวิเคราะห์ neutrality test of equilibrium ซึ่งเป็นการทดสอบขนาดของประชากรนกยูงในแต่ละพื้นที่ศึกษาว่าอยู่ในสภาพสมดุลของ mutation-drift หรือ mutation-selection โดยใช้ค่า Tajima's *D* และ Fu's F_S ในการทดสอบประชากรนกยูงจาก 4 พื้นที่ศึกษา 101

สารบัญภาพ

ภาพที่ 1 ลักษณะสัณฐานภายนอกของนกยูงคองโก (ก) นกยูงอินเดีย (ข) และนกยูงไทย (ค) ทั้งเพศผู้และเพศเมีย 6

ภาพที่ 2 นกยูงลูกผสมระหว่างนกยูงอินเดีย *P. cristatus* และนกยูงไทย *P. muticus* คือ Spalding's peafowl ในสภาพกรงเลี้ยง 7

ภาพที่ 3 การกระจายตัวของนกยูงไทย *P. muticus* ของประเทศไทยในอดีต โดยสีเขียว แสดงถึงการกระจายตัวของนกยูงอินเดีย *P. cristatus* สีส้ม แสดงถึง การกระจายตัวของนกยูงไทยสายพันธุ์พม่า *P. m. specifer* สีฟ้า แสดงถึง การกระจายตัวของนกยูงไทยสายพันธุ์อินโดจีน *P. m. imperator* และสีแดง แสดงถึง การกระจายตัวของนกยูงไทยสายพันธุ์ชวา *P. m. muticus* 14

ภาพที่ 4 การกระจายตัวของนกยูงไทยหรือนกยูงเขียว *P. muticus* ในปัจจุบันของประเทศไทย 15

ภาพที่ 5 ตำแหน่งของดีลูปในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ 20

ภาพที่ 6 ที่ตั้งของศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้ อันเนื่องมาจากพระราชดำริ อำเภอดอยสะเก็ด จังหวัดเชียงใหม่ 22

ภาพที่ 7 แผนที่ตั้งภายในของศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้ อันเนื่องมาจากพระราชดำริ อำเภอดอยสะเก็ด จังหวัดเชียงใหม่ 23

ภาพที่ 8 สภาพพื้นที่และป่าไม้ในพื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง 25

ภาพที่ 9 แผนที่ตั้งของเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอ และหน่วยงานใกล้เคียง 27

ภาพที่ 10 แสดงแผนที่ตั้งของเขตห้ามล่าสัตว์ป่าทับพญาลอ 29

ภาพที่ 11 ตัวอย่างขนนกยูงที่หลุดร่วงในช่วงหลังการจับคู่ผสมพันธุ์ในฤดูกาลผสมพันธุ์ของนกยูงในสภาพป่าเต็งรัง ในพื้นที่เขตห้ามล่าสัตว์ป่าทับพญาลอ 31

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาพที่ 12 สภาพพื้นที่ของป่าเต็งรังโดยการเดินสำรวจป่าในบริเวณเก็บตัวอย่าง ก. สภาพพื้นที่ป่าเต็งรังของเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอ ข. สภาพพื้นที่ป่าเต็งรังของเขตห้ามล่าสัตว์ป่าทับพญาลอ 32

ภาพที่ 13 การเก็บตัวอย่างเส้นขนนกยูงในสภาพตามธรรมชาติ ก. คณะทำงานเตรียมความพร้อมในการออกสำรวจสถานที่ ในพื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอ ข. การเก็บเส้นขนนกยูงซึ่งประกอบไปด้วยการถ่ายภาพ การจดรายละเอียดเกี่ยวกับวันที่และสถานที่แต่ละตำแหน่งลงในสมุดบันทึกและถุงพลาสติกที่เก็บเส้นขน 33

ภาพที่ 14 การใช้เครื่อง GPS เพื่อบันทึกพิกัด ก. แสดงตัวอย่างหน้าจอของเครื่อง GPS ที่พร้อมใช้งาน ข. การใช้งานเพื่อบันทึกพิกัดแต่ละตำแหน่งในพื้นที่เก็บตัวอย่างขนนกยูง 34

ภาพที่ 15 ตัวอย่างขนนกยูงที่เก็บได้บางส่วนจากการออกภาคสนาม ก. แสดงลักษณะสัณฐานภายนอกของขนคลุมหางด้านบน (upper tail covert) ที่สามารถพบได้เฉพาะในเพศผู้เท่านั้น ข. และ ค. แสดงลักษณะสัณฐานภายนอกของนกยูงเพศผู้และตำแหน่งของขนคลุมหางด้านบน ภาพถ่ายโดยคุณสมิทธิ์ สุติบุตร์ (ข) และคุณกาญจน์ สฤษดิ์นิรันดร์ (ค) 36

ภาพที่ 16 ความแตกต่างของลักษณะสัณฐานภายนอกของขนปลายปีก (primary feather) ระหว่างนกยูงเพศผู้และเพศเมีย ก. แสดงลักษณะสัณฐานภายนอกของขนปลายปีกของนกยูงเพศผู้ซึ่งมีลักษณะเป็นขนสีน้ำตาล ไม่มีลวดลาย ข. แสดงลักษณะสัณฐานภายนอกของขนปลายปีกของนกยูงเพศเมียซึ่งมีลักษณะเป็นขนสีน้ำตาลแผ่นขนด้านนอกมีลายตามขวางสีดำ 37

ภาพที่ 17 ความแตกต่างของลักษณะสัณฐานภายนอกของขนคลุมโคนหางด้านล่าง (under tail covert) ระหว่างนกยูงเพศผู้และเพศเมีย ก. แสดงลักษณะสัณฐานภายนอกของขนคลุมโคนหางด้านล่างของนกยูงเพศผู้ซึ่งมีลักษณะเป็นขนสีดำหรือสีเทาหรือสีขาวอมเทาไม่มีลวดลาย เส้นขนไม่เกี่ยวกันเป็นแผ่น ข. แสดงลักษณะสัณฐานภายนอกของขนคลุมโคนหางด้านล่างของนกยูงเพศเมียซึ่งมีลักษณะเป็นขนสีเขียวอมน้ำตาล มีแถบเส้นคู่สีน้ำตาลพาดตามขวาง 38

ภาพที่ 18 เปลือกไข่หรือไข่นกยูงที่พบจากการสำรวจภาคสนาม ก. แสดงลักษณะรังและเปลือกไข่ของนกยูงภายหลังจากการฟักออกเป็นตัว ในพื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอ ข. แสดงไข่ที่แม่นกยูงทิ้งรังไปแล้ว และลูกนกยูงไม่สามารถฟักออกมาได้ ทำการรักษาสภาพตัวอย่างด้วย 99% เอทานอล โดยเจ้าหน้าที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอพบตัวอย่างเมื่อวันที่ 2 พฤษภาคม พ.ศ. 2558 39

ภาพที่ 19 ตำแหน่งและพิกัดการเก็บตัวอย่างเส้นขนนกยูงในสภาพตามธรรมชาติครั้งที่ 1 และ 2 จากภาพจุดสีดำ คือ ตำแหน่งของการเก็บตัวอย่างในครั้งที่ 1 (20-24 เมษายน พ.ศ. 2557) และครั้งที่ 2 (5-9 พฤษภาคม พ.ศ. 2558) ส่วนจุดสีขาว คือ ตำแหน่งที่ผู้วิจัยและคณะเข้าไปสำรวจพื้นที่แต่ไม่พบตัวอย่างขนนกยูง..... 48

ภาพที่ 20 ตำแหน่งและพิกัดการเก็บตัวอย่างเส้นขนนกยูงในสภาพตามธรรมชาติครั้งที่ 1 ระหว่างวันที่ 20-24 เมษายน พ.ศ. 2557 และจำนวนตัวอย่างที่พบจากเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอและเขตห้ามล่าสัตว์ป่าทับพญาลอ 52

ภาพที่ 21 ตำแหน่งและพิกัดการเก็บตัวอย่างเส้นขนนกยูงในสภาพตามธรรมชาติครั้งที่ 2 ระหว่างวันที่ 5-9 พฤษภาคม พ.ศ. 2558 และจำนวนตัวอย่างที่พบจากเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอและเขตห้ามล่าสัตว์ป่าทับพญาลอ 54

ภาพที่ 22 ตำแหน่งที่น่าสนใจในการเข้าไปเก็บตัวอย่างเพิ่มเติม เพื่อให้ได้จำนวนของตำแหน่งและตัวอย่างที่ครอบคลุมพื้นที่ให้มากที่สุด จากภาพจุดสีดำ คือ ตำแหน่งของการเก็บตัวอย่างในครั้งที่ 1 (20-24 เมษายน พ.ศ. 2557) และครั้งที่ 2 (5-9 พฤษภาคม พ.ศ. 2558) จุดสีขาว คือ ตำแหน่งที่ผู้วิจัยและคณะเข้าไปสำรวจพื้นที่แต่ไม่พบตัวอย่างขนนกยูง และจุดสีแดง คือ ตำแหน่งบริเวณรอบนอกและภายในพื้นที่ที่น่าสนใจเข้าไปเก็บตัวอย่างเพิ่มเติม 59

ภาพที่ 23 ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของดีลูปในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของนกยูงเขียว *P. muticus* จากศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้ อันเนื่องมาจากพระราชดำริ ตรวจสอบด้วยการทำ 0.8% agarose gel electrophoresis โดยใช้ความต่างศักย์ 135 โวลต์ เป็นเวลา 20 นาที 62

ภาพที่ 24 ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของดีลูปในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของนกยูงเขียว *P. muticus* จากศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้ อันเนื่องมาจากพระราชดำริ ตรวจสอบด้วยการทำ 0.8%agarose gel electrophoresis โดยใช้ความต่างศักย์ 135 โวลต์ เป็นเวลา 20 นาที 63

ภาพที่ 25 ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของดีลูปในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของนกยูงเขียว *P. muticus* ตรวจสอบด้วยการทำ 0.8% agarose gel electrophoresis โดยใช้ความต่างศักย์ 135 โวลต์ เป็นเวลา 20 นาที 63

ภาพที่ 26 ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของดีลูปในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของนกยูงเขียว *P. muticus* จากเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง ตรวจสอบด้วยการทำ 0.8% agarose gel electrophoresis โดยใช้ความต่างศักย์ 135 โวลต์ เป็นเวลา 20 นาที 64

ภาพที่ 27 ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของดีลูปในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของนกยูงเขียว *P. muticus* จากเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง ตรวจสอบด้วยการทำ 0.8% agarose gel electrophoresis โดยใช้ความต่างศักย์ 135 โวลต์ เป็นเวลา 20 นาที 64

ภาพที่ 28 ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของดีลูปในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของนกยูงเขียว *P. muticus* จากเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอ ตรวจสอบด้วยการทำ 0.8% agarose gel electrophoresis โดยใช้ความต่างศักย์ 135 โวลต์ เป็นเวลา 20 นาที 65

ภาพที่ 29 ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของดีลูปในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของนกยูงเขียว *P. muticus* จากเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอ ตรวจสอบด้วยการทำ 0.8% agarose gel electrophoresis โดยใช้ความต่างศักย์ 135 โวลต์ เป็นเวลา 20 นาที 65

ภาพที่ 30 ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของดีลูปในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของนกยูงเขียว *P. muticus* จากเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอ ตรวจสอบด้วยการทำ 0.8% agarose gel electrophoresis โดยใช้ความต่างศักย์ 135 โวลต์ เป็นเวลา 20 นาที 66

ภาพที่ 31 ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของดีลูปในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของนกยูงเขียว *P. muticus* จากเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอ ตรวจสอบด้วยการทำ 0.8% agarose gel electrophoresis โดยใช้ความต่างศักย์ 135 โวลต์ เป็นเวลา 20 นาที 66

Chulalongkorn University

ภาพที่ 32 ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของดีลูปในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของนกยูงเขียว *P. muticus* ตรวจสอบด้วยการทำ 0.8% agarose gel electrophoresis โดยใช้ความต่างศักย์ 135 โวลต์ เป็นเวลา 20 นาที 67

ภาพที่ 33 ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของดีลูปในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของนกยูงเขียว *P. muticus* จากเขตห้ามล่าสัตว์ป่าทับพญาลอ ตรวจสอบด้วยการทำ 0.8% agarose gel electrophoresis โดยใช้ความต่างศักย์ 135 โวลต์ เป็นเวลา 20 นาที 67

ภาพที่ 34 ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของดีลูปในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของนกยูงเขียว *P. muticus* จากเขตห้ามล่าสัตว์ป่าทับพญาลอ ตรวจสอบด้วยการทำ 0.8% agarose gel electrophoresis โดยใช้ความต่างศักย์ 135 โวลต์ เป็นเวลา 20 นาที 68

ภาพที่ 35 ผลของการตรวจสอบเพื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์ ในฐานข้อมูลของ GenBank โดยใช้โปรแกรม Blast ผลที่ได้พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของทุกตัวอย่าง (มากกว่า 1,000 คู่เบส) มีความเหมือน (identity) กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีลูปในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของนกยูงไทย *P. muticus* ในฐานข้อมูลของ GenBank..... 71

ภาพที่ 36 ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของนกยูงไทย โดยวิเคราะห์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความยาว 1,090 คู่เบส ที่สร้างโดยวิธี Neighbor-joining ที่ bootstrap probabilities 1,000 ซ้ำ โดยมี *P. cristatus* (นกยูงอินเดีย) เป็น outgroup 80

ภาพที่ 37 ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของนกยูงไทย โดยวิเคราะห์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความยาว 1,090 คู่เบส ที่สร้างโดยวิธี Maximum likelihood ที่ bootstrap probabilities 1,000 ซ้ำ โดยมี *P. cristatus* (นกยูงอินเดีย) เป็น outgroup 81

ภาพที่ 38 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างแฮพโพลไทป์ของนกยูงไทย *P. muticus* จาก 4 พื้นที่ศึกษาในประเทศไทย โดยการสร้าง reduce median mtDNA haplotype network โดยวงกลมแต่ละวงแสดงถึงแฮพโพลไทป์ที่แตกต่างกัน ขนาดของวงกลมแสดงถึงจำนวนตัวอย่างที่พบในแฮพโพลไทป์นั้นๆ สีทั้งสี่สี ได้แก่ สีเขียว หมายถึง ตัวอย่างจากศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้ อันเนื่องมาจากพระราชดำริ (HHK) สีชมพู หมายถึง ตัวอย่างจากเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอ (WLO) สีฟ้า หมายถึง ตัวอย่างจากเขตห้ามล่าสัตว์ป่าทับพญาลอ (TPL) และสีดำ หมายถึง ตัวอย่างจาก

เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง (HKK) เส้นขีดบนเส้นเชื่อมระหว่าง แฮพโพล ไทป์ คือ จำนวนการเกิด mutation 84

ภาพที่ 39 แผนที่อาณาเขตระหว่างเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอ fragment ที่ 1 และ 2 กับ เขตห้ามล่าสัตว์ป่าทับพญาลอ 89

ภาพที่ 40 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างแฮพโพลไทป์ของนกยูงไทย *P. muticus* จาก เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอ fragment ที่ 1, 2 และเขตห้ามล่าสัตว์ป่าทับพญาลอ โดยการสร้าง reduce median mtDNA haplotype network โดยวงกลมแต่ละวง แสดงถึงแฮพโพลไทป์ที่แตกต่างกัน ขนาดของวงกลม แสดงถึงจำนวนตัวอย่างที่พบ ในแฮพโพลไทป์นั้นๆ สีทั้งห้าสี ได้แก่ สีเขียว หมายถึง ตัวอย่างจากศูนย์ศึกษาการ พัฒนาห้วยฮ่องไคร้ อันเนื่องมาจากพระราชดำริ (HHK) สีชมพู หมายถึง ตัวอย่าง จากเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอ fragment ที่ 1 (WLOF1) สีขาว หมายถึง ตัวอย่างจากเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอ fragment ที่ 2 (WLOF2) สีฟ้า หมายถึง ตัวอย่างจากเขตห้ามล่าสัตว์ป่าทับพญาลอ (TPL) และสีดำ หมายถึง ตัวอย่างจาก เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง (HKK) เส้นขีดบนเส้นเชื่อมระหว่างแฮพโพลไทป์ คือ จำนวนการเกิด mutation 90

ภาพที่ 41 ภาพ haplotype distribution ของพื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอ fragment ที่ 1, 2 และเขตห้ามล่าสัตว์ป่าทับพญาลอ 91

ภาพที่ 42 ภาพ mismatch distribution ของนกยูงไทยจำนวน 27 ตัวอย่างจากพื้นที่ศูนย์ ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้ อันเนื่องมาจากพระราชดำริ 98

ภาพที่ 43 ภาพ mismatch distribution ของนกยูงไทยจำนวน 47 ตัวอย่างจากพื้นที่เขตรักษา พันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอ 98

ภาพที่ 44 ภาพ mismatch distribution ของนกยูงไทยจำนวน 22 ตัวอย่าง จากพื้นที่เขต รักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง 99

บทที่ 1
บทนำ

นกยูงไทยหรือนกยูงเขียว (green peafowl: *Pavo muticus* Linnaeus, 1766) (กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช; ฐานข้อมูลชนิดพันธุ์ที่ถูกคุกคามในประเทศไทย (Red Data of Thailand); องค์การสวนสัตว์) เป็นนกในวงศ์ไก่ฟ้า (Family Phasianidae) ที่มีขนาดใหญ่และมีความสวยงามมาก พบเจอได้ยากในธรรมชาติ และเป็นนกที่มีคุณค่าชนิดหนึ่งของโลก ในอดีตนั้นนกยูงไทยมีถิ่นที่อยู่อาศัยและการกระจายตัวระหว่างอินเดียตะวันออกและทางตอนใต้ของประเทศจีน ไปจนถึงหมู่เกาะชวา ประเทศอินโดนีเซีย นอกจากนี้ยังสามารถพบนกยูงไทยได้ทั่วไปในพื้นที่เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และเอเชียกลางบางส่วน เช่น ลาว กัมพูชา พม่า เวียดนาม มาเลเซีย และไทย (Brickle et al., 2008; Han et al., 2007; Liu et al., 2009; McGowan and Gillman, 1997) นกยูงไทยถูกจัดเป็นสัตว์ที่ใกล้สูญพันธุ์ของประเทศไทย (Meckvichai, 2008) และจัดเป็นสัตว์ป่าคุ้มครองของประเทศไทย ตามพระราชบัญญัติสงวนและคุ้มครองสัตว์ป่าพุทธศักราช 2535 และทางองค์กรระหว่างประเทศ IUCN 2015 (สหภาพนานาชาติเพื่อการอนุรักษ์ธรรมชาติและทรัพยากรธรรมชาติ: International Union for Conservation of Nature and Natural Resources หรือ World Conservative Union) จัดนกยูงไทยให้อยู่ในสถานภาพที่ใกล้ สูญพันธุ์ของโลก อันมีสาเหตุหลักอันเนื่องมาจากพื้นที่ป่าอันเป็นที่อยู่อาศัยลดลง การล่า และการรบกวนถิ่นที่อยู่อาศัยคือพื้นที่ป่าไม้ จึงทำให้จำนวนและขนาดประชากรของนกยูงไทยในธรรมชาติลดน้อยลงเป็นอย่างมาก (Fuller and Garson, 2000; Meckvichai et al., 2002; Pinthong, 2009) สำหรับประเทศไทยในอดีตสามารถพบนกยูงไทยได้เกือบทุกภาคของประเทศไทย โดยนกยูงไทยชนิดย่อยที่มีรายงานพบ ได้แก่ นกยูงไทยสายพันธุ์อินโดจีนพบได้ตั้งแต่เหนือคอคอดกระขึ้นไป และนกยูงไทยสายพันธุ์ชวาพบตั้งแต่ใต้คอคอดกระลงมา แต่ในระยะ 30 ปีที่ผ่านมานี้ ยังไม่มีรายงานการพบนกยูงไทยสายพันธุ์ชวานี้ในภาคใต้ของประเทศไทยเลย (Meckvichai, 2008) โดยในปัจจุบันนี้ นกยูงไทยมีประชากรที่สามารถอยู่รอดได้ในธรรมชาติเฉพาะในภาคเหนือและภาคตะวันตกของประเทศเท่านั้น ซึ่งทางภาคเหนือ ได้แก่ บริเวณลุ่มแม่น้ำปิง อิง ยม และน่าน (เช่น ที่บริเวณอุทยานแห่งชาติดอยภูนาง อุทยานแห่งชาติแม่ยม เขตพื้นที่ศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้ อันเนื่องมาจากพระราชดำริ) ส่วนทางภาคตะวันตก ได้แก่ บริเวณลุ่มแม่น้ำแม่กลอง ห้วยขาแข้ง และห้วยสาขา โดยพบมากที่สุดบริเวณป่า

แถบลุ่มน้ำห้วยขาแข้งในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง(Meckvichai et al., 2007) ส่วนที่เหลือจะเป็นนกยูงไทยในสภาพกรงเลี้ยง ในสวนสัตว์ หรือในศูนย์เพาะเลี้ยงต่าง ๆ

ดังที่ได้กล่าวไปแล้วข้างต้นว่าประชากรนกยูงไทยในผืนป่าประเทศไทยสามารถพบได้เฉพาะบริเวณทางภาคเหนือและภาคตะวันตก ดังนั้นเมื่อเวลาผ่านไปอาจจะทำให้ประชากรนกยูงไทยจากทั้งสองภูมิภาคไม่สามารถที่จะอพยพถึงกันได้ระหว่างภูมิภาค และอาจจะแยกออกจากกันในแต่ละภูมิภาค โดยสาเหตุที่ประชากรนกยูงไทยจากทั้งสองภูมิภาคนั้นแยกออกจากกันเนื่องมาจากสภาพทางภูมิศาสตร์ และรวมถึงสิ่งก่อสร้างต่างๆ ที่มนุษย์สร้างขึ้น ดังนั้นหากประชากรของนกยูงไทยแยกกันอยู่เป็นระยะเวลานานพอ ประกอบกับการมีขนาดของประชากรไม่ใหญ่มาก อาจจะทำให้นกยูงไทยจากทั้งสองภูมิภาคมีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมได้ ซึ่งถ้าหากความแตกต่างทางพันธุกรรมมีมากพอก็อาจจะทำให้นกยูงไทยในประเทศไทยแยกออกจากกันเป็น 2 ประชากรย่อย ตามพื้นที่การกระจายตัวได้ คือ ประชากรย่อยทางภาคเหนือ และประชากรย่อยทางภาคตะวันตก

ซึ่งจากการศึกษาของ วีณา เมฆวิชัยและคณะในปี พ.ศ. 2539-2551 (Meckvichai, 2008) พบว่าบริเวณในเขตพื้นที่ศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้ อันเนื่องมาจากพระราชดำริ จังหวัดเชียงใหม่ และบริเวณป่าแถบลุ่มน้ำห้วยขาแข้งในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง จังหวัดอุทัยธานี เป็นพื้นที่ที่สามารถพบการกระจายตัวของนกยูงไทยได้มาก นอกจากนี้จากการสำรวจล่าสุดของ วีณา เมฆวิชัยและคณะ พบว่าในพื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอ จังหวัดพะเยา และเขตห้ามล่าสัตว์ป่าทับพญาลอ จังหวัดเชียงราย ยังเป็นอีกสองพื้นที่ที่สามารถพบนกยูงไทยได้ตามธรรมชาติค่อนข้างมาก ซึ่งทั้งสองพื้นที่นี้จัดเป็นพื้นที่บริเวณลุ่มแม่น้ำอิง และยังไม่เคยมีการศึกษาด้านพันธุกรรมของประชากรนกยูงไทยมาก่อน ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้ทำการเก็บตัวอย่างขนนกยูงไทยที่หลุดร่วงแล้วในธรรมชาติจาก 4 พื้นที่ของประเทศไทย ทั้งทางภาคเหนือและภาคตะวันตกที่ปัจจุบันมีรายงานพบประชากรนกยูงไทยอาศัยอยู่จำนวนค่อนข้างมาก ได้แก่ เขตพื้นที่ศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้ อันเนื่องมาจากพระราชดำริ จังหวัดเชียงใหม่ เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอ จังหวัดพะเยา และเขตห้ามล่าสัตว์ป่าทับพญาลอ จังหวัดเชียงราย ซึ่งตัวอย่างจากสามพื้นที่นี้เป็นตัวแทนของนกยูงไทยทางภาคเหนือ และจากเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง จังหวัดอุทัยธานี เป็นตัวแทนของนกยูงไทยทางภาคตะวันตก

จากการสืบสวนเอกสารพบการศึกษาวิจัยที่เกี่ยวข้องกับนกยูงไทยในประเทศไทยเป็นจำนวนมาก โดยส่วนใหญ่เน้นการศึกษาทางด้านนิเวศวิทยา (Arrathrakorn, 2001; Dunkeaw, 2009; Liu et al., 2009; Silapasuwan, 1999) และสัณฐานวิทยา (Sriwatcharakan,

2009) แต่สำหรับการศึกษาทางด้านพันธุกรรมหรือพันธุศาสตร์ยังมีจำนวนน้อย และค่อนข้างจำกัดการศึกษาในกลุ่มประชากรนกยูงไทยในสภาพกรงเลี้ยง (Wiwegweaw and Meckvichai, 2011) มากกว่าในสภาพธรรมชาติ ซึ่งสาเหตุหนึ่งก็อาจเป็นเพราะว่านกยูงไทยเป็นนกที่พบเจอได้ยากในธรรมชาติดังนั้นการศึกษาวิจัยในครั้งนี้จึงสนใจที่จะตรวจสอบการแปรผันทางพันธุกรรมทั้งระดับภายในกลุ่มและระหว่างกลุ่มประชากรของนกยูงไทยจากทั้งภูมิภาคเหนือและภูมิภาคตะวันตก ว่ามีความแตกต่างกันมากน้อยเพียงใด โดยวิเคราะห์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีลูปในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ โดยการศึกษาครั้งนี้มีสมมุติฐานว่า ประชากรนกยูงไทยในประเทศไทยแยกออกจากกันเป็นสองกลุ่มประชากรย่อยตามพื้นที่การกระจายตัว ทั้งนี้ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้สามารถใช้เป็นฐานข้อมูลในการบอกลักษณะโครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรนกยูงไทยในประเทศไทยได้ และสามารถใช้เป็นฐานข้อมูลเพื่อการวางแผนทางการอนุรักษ์ และการขยายพันธุ์ต่อไปได้

วัตถุประสงค์

1. เพื่อตรวจสอบการแปรผันทางพันธุกรรมทั้งระดับภายในกลุ่มและระหว่างกลุ่มประชากรของนกยูงไทย ในพื้นที่ภาคเหนือและภาคตะวันตกของประเทศไทย โดยวิเคราะห์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีลูปในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ
2. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างแฮพโพลไทป์ (haplotype) ของประชากรนกยูงไทยในพื้นที่ภาคเหนือและภาคตะวันตกของประเทศไทย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 นกยูง

นกยูงในโลกแบ่งออกเป็น 3 ชนิด (ภาพที่ 1) ได้แก่ (1) นกยูงคองโก หรือ Congo peafowl (*Afropavo congoensis*) เป็นนกยูงที่มีขนาดตัวเล็กกว่านกยูงชนิดอื่น เพศผู้ไม่มีขนคลุมหางที่ยาว และไม่มีแววมยุรา คอและส่วนล่างของลำตัว รวมถึงปลายหางมีสีม่วงแกมดำ สำหรับในเพศเมีย ส่วนที่เป็นสีม่วงนั้นจะเป็นสีน้ำตาลทั้งหมด เพศผู้หงอนมีลักษณะเป็นเส้นแข็งๆ สีขาวเป็นกระจุก รูปร่างอ้วนป้อมและตัวสั้น พบในป่าดิบชื้นบริเวณลุ่มแม่น้ำคองโก ทวีปแอฟริกา (Mulotwa et al., 2010) (2) นกยูงอินเดีย หรือ Blue peafowl (*Pavo cristatus*) เพศผู้หงอนมีลักษณะเป็นรูปพัดซึ่งพบว่ามีความแตกต่างจากนกยูงไทยที่หงอนมีลักษณะเป็นกระจุก สีของผิวหนังบริเวณหน้ามีสีขาว และสีดำคาดบริเวณตา ขนบริเวณคอและอกมีสีน้ำเงิน ขนบริเวณปีกเป็นลายสีขาวสลับดำ ขนตามลำตัวมีสีเขียวอมน้ำเงิน สำหรับในเพศเมียนั้นมีขนาดเล็กกว่าเพศผู้ มีขนตามลำตัวสีน้ำตาล ขนบริเวณคอและหลังมีสีที่อ่อนกว่าเพศผู้ พบการกระจายพันธุ์ในประเทศอินเดีย ปากีสถาน เนปาล บังกลาเทศ ภูฏาน และศรีลังกา (Delacour et al., 1977) นอกจากนี้ นกยูงอินเดียได้มีการส่งออกเพื่อการค้าไปทั่วโลก (Ramesh and McGowan, 2009) ทั้งนี้ ทางองค์กรเพื่อการอนุรักษ์ระหว่างประเทศ IUCN (International Union for Conservation of Nature and Natural Resources) (2015) ได้จัดนกยูงอินเดียไว้ในกลุ่ม Least concern คือ สิ่งมีชีวิตที่มีความเสี่ยงต่ำต่อการสูญพันธุ์ และ (3) นกยูงไทย หรือ Green peafowl (*Pavo muticus*) มีขนาดตัวที่ใหญ่กว่านกยูงสองชนิดข้างต้น ในเพศผู้อาจยาวได้ถึง 3 เมตร เมื่อวัดจากส่วนหัวถึงปลายขนคลุมโคนหาง และอาจมีน้ำหนักถึง 5 กิโลกรัม หงอนมีลักษณะเป็นกระจุก ซึ่งมีความแตกต่างจากนกยูงอินเดียอย่างชัดเจนดังที่ได้กล่าวไปแล้วข้างต้น บริเวณแผ่นหนังที่หน้ามีสีฟ้าสลับเหลือง ที่บริเวณขนลำตัวมีสีเขียวเป็นประกายแวววเหลือบสีน้ำเงินบนปีกและมีสีทองแดงทางด้านข้าง ลำตัวมีลักษณะเป็นเกล็ดทั้งตัว ขนบริเวณปีกมีสีน้ำตาลแดง ขนคลุมโคนหางยื่นยาวมากและมีแววมยุรา สำหรับเพศเมียมีลักษณะโดยทั่วไปคล้ายเพศผู้ สิ่งที่แตกต่างคือขนสีเหลือบเขียวน้อยกว่าและมีประสีน้ำตาลเหลือง ขนคลุมโคนหางไม่ยื่นยาว พบการกระจายตัวในบริเวณป่าเขตร้อนของเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และเอเชียกลางบางส่วน ได้แก่ ลาว กัมพูชา พม่า เวียดนาม มาเลเซีย และไทย (Brickle et al., 2008; Han et al., 2007; McGowan and Gillman, 1997) อย่างไรก็ตามนกยูงไทยไม่นิยมนำมาเป็นสัตว์เลี้ยง เนื่องจากมีนิสัยที่ค่อนข้างดุ

ร้าย ขี้ระแวง ตื่นตกใจง่าย และมีเดือยที่แหลมคม อาจจะก่อให้เกิดอันตรายแก่ผู้เลี้ยงได้ นอกจากนี้ ในสภาพกรงเลี้ยงเพื่อการค้าบางแห่งพบว่า นกยูงอินเดีย *P. cristatus* และนกยูงไทย *P. muticus* สามารถผสมข้ามสายพันธุ์กันได้ และสามารถให้กำเนิดลูกผสมระหว่างนกยูงทั้งสองสายพันธุ์ คือ Spalding's peafowl ได้ (Leimu and Fischer, 2010) (ภาพที่ 2)

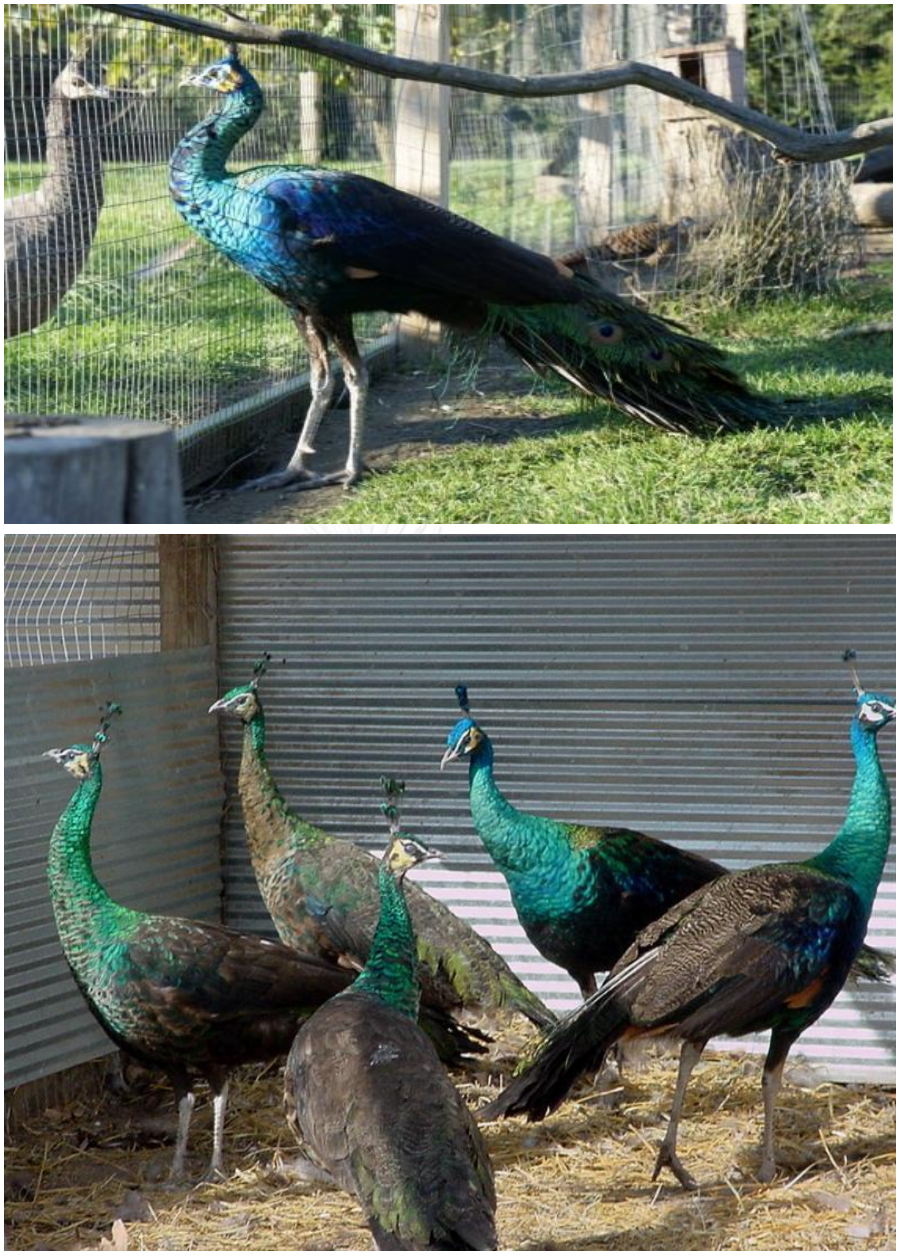
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาพโดย: http://www.biolib.cz/en/image/id215245/

ภาพโดย: http://ibc.lynxeds.com/photo/indian-peafowl-pavo-cristatus/male-peafowl

ภาพโดย: http://www.texaspeafowl.com/peacock.html

ภาพที่ 1 ลักษณะสัณฐานภายนอกของนกยูงคองโก (ก) นกยูงอินเดีย (ข) และนกยูงไทย (ค) ทั้งเพศผู้และเพศเมีย



ภาพโดย: http://www.leggspeafowl.com/photo/spalding.htm

ภาพที่ 2 นกยูงลูกผสมระหว่างนกยูงอินเดีย *P. cristatus* และนกยูงไทย *P. muticus* คือ Spalding's peafowl ในสภาพกรงเลี้ยง

2.2 นกยูงไทยหรือนกยูงเขียว

2.2.1 อนุกรมวิธาน

นกยูงไทย มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Pavo muticus* Linnaeus, 1766 ชื่อสามัญ คือ green peafowl, Peacock (นกยูงเขียวเพศผู้), Peahen (นกยูงเขียวเพศเมีย) สามารถจัดอันดับทางอนุกรมวิธานได้ดังนี้

Class Aves

Order Galliformes

Family Phasianidae

Genus *Pavo*

Species *Pavo muticus* Linnaeus, 1766

นกยูงไทยสามารถแบ่งออกเป็น 3 ชนิดย่อย (subspecies) ตามลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอก และการแพร่กระจายตามภูมิศาสตร์ (Delacour et al., 1977) ดังนี้

1. นกยูงไทยสายพันธุ์ชวา

(Javanese green peafowl: *Pavo muticus muticus*)

เป็นนกยูงที่มีขนาดตัวเล็กและมีสีสันสดใสมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับนกยูงชนิดย่อยอีกสองสายพันธุ์ ขนคลุมปีกมีสีสันสดใสทั้งสีเขียวและสีน้ำเงิน หลังเป็นสีเขียวเหลือบทอง ตัวมีสีออกทองแดง อกและสีข้างมีสีที่สดใส เพศเมียมีแถบประที่คอและอกค่อนข้างแคบ ถิ่นที่อยู่อาศัยและการกระจายตัวอยู่ในแถบหมู่เกาะชวา ประเทศอินโดนีเซีย (Van Balen et al., 1995) คาบสมุทรมาเลเซีย และใต้คอคอดกระของประเทศไทย แต่ในประเทศไทยนั้นไม่พบนกยูงชนิดย่อยนี้มามากกว่าสามสิบปี (Meckvichai, 2008)

2. นกยูงไทยสายพันธุ์พม่า

(Burmese green peafowl: *P. m. specifer*)

เป็นนกยูงชนิดย่อยที่มีลักษณะสีตัวหม่น สีไม่สดใสเมื่อเปรียบเทียบกับนกยูงย่อยชนิดอื่นๆ บริเวณขนคลุมปีกมีสีดำขอบสีน้ำเงินแคบๆ บริเวณหนังของใบหน้าสีไม่สดใส ขนที่คอสีน้ำเงินคล้ำและออกเทาฟ้าอ่อนที่ขอบของขนบริเวณคอ อก หลัง ท้อง และสีข้าง ถิ่นที่อยู่อาศัยและการกระจายพันธุ์พบได้ตั้งแต่รัฐอัสสัมในประเทศอินเดีย บังคลาเทศ และด้านตะวันตกของพม่าไปจนถึงด้านตะวันออกของแม่น้ำอิระวดี (Delacour et al., 1977)

3. นกยูงไทยสายพันธุ์อินโดจีน

(Indochinese green peafowl: *P. m. imperator*)

เป็นนกยูงที่มีสีออกทองแดง เพศผู้มีขนที่คอ อก และหลัง ออกสีทองแดง สีข้างและอกมีสีคล้ำ สำหรับการกระจายตัวนั้นมีขอบเขตการแพร่กระจายกว้างขวางมากที่สุด สามารถพบได้ทางภาคใต้ของยูนานในประเทศจีน บริเวณแม่น้ำสาละวินในพม่า ในลาว กัมพูชา เวียดนาม และในประเทศไทย ซึ่งปัจจุบันพบได้เฉพาะทางภาคตะวันตก และภาคเหนือเท่านั้น นอกจากนี้ยังพบกระจัดกระจายเล็กน้อยในพื้นที่อนุรักษ์ทางภาคตะวันออกเฉียงเหนืออีกด้วย เช่น เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูเขียว จังหวัดชัยภูมิ และเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่ายอดโดม จังหวัดอุบลราชธานี

2.2.2 ลักษณะทั่วไปของนกยูงไทย

นกยูงไทยเป็นนกในวงศ์ไก่ฟ้า (Family Phasianidae) มีลักษณะสำคัญ คือ มีขนาดใหญ่ สีสันสวยงาม ขนคลุมหางที่ยื่นยาวและมีแววมยุรา ลักษณะคล้ายรูปดวงตาบริเวณปลายเส้นขน (พบเฉพาะในเพศผู้) สำหรับใช้ในการเกี้ยวพาราสี นอกจากนี้ยังพบว่ามีลักษณะทางสัณฐานวิทยาอื่นๆ ที่สำคัญ ได้แก่ หัวมีขนาดเล็ก คอยาว ปีกมนกลม และขนปลายปีกเส้นแรกสั้น แข้งหนาแข็งแรง มีเดือยแหลม หางแผ่แบนเป็นสีหม่น (Meckvichai, 2008) ในเพศผู้นั้นขนหางได้ถูกซ่อนไว้ใต้ขนคลุมหางที่ยื่นยาว นกยูงเพศผู้นั้นมีเสียงร้องประกาศอาณาเขตที่ค่อนข้างดังและก้อง และมีพฤติกรรมการรำแพนเกี้ยวพาราสีตัวเมีย โดยใช้ขนคลุมหาง (Calkins and Burley, 2003; Dakin and Montgomerie, 2011; Delacour et al., 1977; Hernowo et al., 2011) สำหรับเพศเมียนั้นมีหงอนบนหัวเช่นเดียวกับเพศผู้ แต่ไม่พบว่ามีขนคลุมหางที่ยื่นยาวออกมา เดือยมีลักษณะที่สั้นกว่าและสีสันไม่สดใส นอกจากนี้นกยูงเพศผู้ที่มีอายุต่ำกว่า 1 ปี มีสีสันที่คล้ายคลึงกับนกยูงเพศเมีย แต่จะมีสีที่คอสดใสกว่านกยูงเพศเมียในวัยเดียวกัน นกยูงเพศผู้โตเต็มวัยและสามารถสืบพันธุ์ได้เมื่ออายุ 3 ปี โดยที่ลักษณะของเพศผู้มีสีสันเหมือนตัวเต็มวัยเมื่ออายุ 2 ปี แต่ยังไม่มีขนคลุมหางที่ยื่นยาวออกมา โดยขนคลุมหางจะยาวเต็มที่เมื่ออายุ 5 ปี สำหรับเพศเมียจะโตเต็มวัยและสามารถสืบพันธุ์ได้เมื่ออายุ 2 ปี (Laowthong and Piriya, 1989) นกยูงไทยมีการผลัดขนทุกปีในช่วงหลังฤดูผสมพันธุ์ ซึ่งฤดูกาลจับคู่ผสมพันธุ์ของนกยูงอยู่ในช่วงประมาณเดือนพฤศจิกายนถึงเดือนมีนาคม (Ponsena, 1988)

2.2.3 ถิ่นที่อยู่อาศัยและพฤติกรรมการหาอาหาร

ถิ่นที่อยู่อาศัยในธรรมชาติของนกยูงไทยนั้น โดยทั่วไปเป็นพื้นที่โล่งป่าโปร่ง เช่น ป่าเบญจพรรณ ป่าเต็งรัง บริเวณพื้นที่การเกษตรกรรมที่อยู่ชายป่าที่มีแหล่งอาหาร หาดทรายริมลำน้ำในป่า หรือพื้นที่ที่มีหญ้าสูงและต้นไม้ประปราย ส่วนใหญ่มักพบนกยูงไทยที่ระดับความสูงของพื้นที่ประมาณ 100 ถึง 900 เมตรจากระดับน้ำทะเล โดยมักอาศัยอยู่ใกล้แหล่งน้ำ (Ponyeam, 1993; Rojanadilog et al., 1986)

โดยทั่วไปเรามักพบว่าอาหารของนกยูงไทยส่วนใหญ่ ได้แก่ ส่วนต่างๆ ของพืช เช่น ยอดใบอ่อน ต้นอ่อน หน่อ ดอกไม้ เมล็ดหญ้าแห้ง เมล็ดพืช และส่วนต่างๆ ของพืชที่อ่อนนุ่ม โดยเฉพาะขุยไผ่ นอกจากนี้นกยูงยังกินสัตว์ตัวเล็กๆ เป็นอาหารอีกด้วย เช่น แมลง ปลา สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก และสัตว์เลื้อยคลาน จากการจำแนกชนิดของอาหารที่ได้จากการวิเคราะห์ถุงพักอาหาร (crop) พบพืช 66 ชนิดใน 57 สกุล (Ponsena, 1988) นอกจากนี้นกยูงมักกินก้อนกรวดทรายขนาดเล็กสำหรับที่จะใช้ในการย่อยอาหารอีกด้วย (Arrathrakorn, 2001; Ponsena, 1988)

สำหรับพฤติกรรมการหาอาหารของนกยูงไทย พบว่ามีสองช่วงเวลาด้วยกัน คือ ในเวลาตอนเช้าประมาณ 7:00-10:00 นาฬิกา และอาจจะออกหากินช้ากว่าปกติในวันที่หมอกลงจัดหรือฝนตก จากนั้นเมื่อเสร็จสิ้นสำหรับการออกหาอาหารในช่วงเช้า นกยูงจะเข้าไปหลบอยู่ในบริเวณชายป่า และออกมาหาอาหารอีกครั้งในช่วงเวลาประมาณ 14:30 นาฬิกา โดยทั่วไปจะออกหากินกันเป็นฝูง ยกเว้นนกยูงเพศผู้ที่โตเต็มวัย ส่วนใหญ่จะบินหนีก็ต่อเมื่อถูกรบกวน โดยที่หนีในระยะทางที่ไม่เกิน 400 เมตร (Rojanadilog et al., 1986) แบบแผนในการออกหากินค่อนข้างที่จะมีความแน่นอน โดยขึ้นอยู่กับลักษณะอาหารที่หาได้ และจากการหลีกหนีสิ่งรบกวนต่างๆ (Rojanadilog et al., 1986)

2.2.4 พฤติกรรมในฤดูผสมพันธุ์ การเลือกแหล่งทำรัง และการฟักไข่

นกยูงไทยจัดเป็น polygyny bird หมายถึง นกยูงเพศผู้หนึ่งตัวสามารถผสมพันธุ์กับนกยูงเพศเมียได้หลายตัว ในขณะที่นกยูงเพศเมียหนึ่งตัว สามารถผสมพันธุ์กับนกยูงเพศผู้ได้เพียงหนึ่งตัวเท่านั้น โดยในการเลี้ยงดูลูก (parental care) เป็นหน้าที่ของนกยูงเพศเมีย (Gomes et al., 2003; Ptak and Lachmann, 2010) โดยในช่วงฤดูกาลผสมพันธุ์นี้นกยูงเพศผู้จะออกมาทำการจับจองพื้นที่สำหรับใช้เป็นอาณาเขตสำหรับเกี้ยวพาราสีและสืบพันธุ์ จากรายงานการศึกษาเกี่ยวกับพฤติกรรมในฤดูผสมพันธุ์ของนกยูงที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง จังหวัดอุทัยธานี

พบว่านกยูงเพศผู้นั้นจะออกมาหาอาหารในบริเวณเดิมๆ และเริ่มจับจองพื้นที่ ซึ่งพื้นที่ส่วนใหญ่เป็นบริเวณป่าโปร่ง และหาดทรายริมน้ำ โดยที่ภายในบริเวณดังกล่าวนั้นนกยูงเพศผู้แต่ละตัวจะกำหนดจุดพื้นที่หวงห้ามของตนเองเอาไว้ เพื่อใช้ในการเกี้ยวพาราสี และผสมพันธุ์ (mating territory) โดยที่การป้องกันอาณาเขตจะสูงมากในช่วง 2-3 เดือนแรกของฤดูผสมพันธุ์ และจะค่อยๆ ลดลงไปจนถึงปลายฤดูผสมพันธุ์ (Rojanadilog et al., 1986) ในช่วงก่อนฤดูกาลผสมพันธุ์นั้นนกยูงเพศผู้จะมีแพนขนคลุมหาง (train) ซึ่งมีลักษณะที่สวยงามงอกยาวออกมาเรื่อยๆ และจะยาวที่สุดประมาณต้นเดือนมกราคม เมื่อฝูงของนกยูงเพศเมีย เดินมาหาอาหารโดยผ่านทางอาณาเขตของเพศผู้ประมาณ 2-4 ตัว นกยูงเพศผู้จะเริ่มเรียกร้องความสนใจของเพศเมีย เพื่อให้เข้ามาในอาณาเขตของตัวเอง โดยจะส่งเสียงร้องและรำแพนหาง (Rojanadilog et al., 1986)

สำหรับการสร้างรังเป็นหน้าที่ของนกยูงเพศเมีย โดยจะปูพื้นรังด้วยใบไม้แห้ง และกิ่งไม้เล็กๆ ในบริเวณทุ่งหญ้าหรือใต้พุ่มไม้ภายในป่าที่อันเป็นถิ่นที่อยู่อาศัยของนกยูงไทย ซึ่งจากรายงานการศึกษาในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้งพบว่า นกยูงเพศเมียจะทำรังวางไข่ในช่วงเดือนธันวาคมถึงเดือนมีนาคม (Rojanadilog et al., 1986) บริเวณพื้นดินในป่าผลัดใบ เกาะดอนทรายกลางแหล่งน้ำ และอาจมีโอกาสพบได้ในทุ่งหญ้าสูงตามแนวริมน้ำ รังของนกยูงมีลักษณะเป็นหลุมตื้น มีรูปร่างค่อนข้างกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 30 เซนติเมตร มีความลึกประมาณ 5-6 เซนติเมตร รองพื้นรังด้วยใบไม้ และกิ่งไม้แห้ง (Ponsena, 1988) นกยูงเพศเมียเท่านั้นที่มีหน้าที่ในการฟักไข่ ซึ่งระยะเวลาในการฟักประมาณ 26-28 วัน โดยไม่เกิน 30 วัน นกยูงไทยวางไข่คราวละประมาณ 3-8 ฟอง สำหรับลูกนกจะออกบินได้ตั้งแต่ในปีแรกที่เกิด แต่ยังคงออกหาอาหารพร้อมกับแม่จนถึงในฤดูผสมพันธุ์ของปีถัดไป (Ponsena, 1988)

2.2.5 สถานภาพทางการอนุรักษ์และการแพร่กระจายของนกยูงไทย

สำหรับประเทศไทยในอดีตสามารถพบนกยูงไทยได้เกือบทุกภาคของประเทศไทย (ภาพที่ 3) โดยนกยูงไทยที่มีรายงานพบ ได้แก่ นกยูงสายพันธุ์อินโดจีน พบได้ตั้งแต่เหนือคอคอดกระขึ้นไป ทางอำเภอกระบุรี จังหวัดระนอง และอำเภอสวี จังหวัดชุมพร และนกยูงสายพันธุ์ชวา พบใต้คอคอดกระลงไปจนถึงใต้สุดของประเทศไทย ที่อำเภอเบตง จังหวัดยะลา ยกเว้นทางภาคตะวันออกเฉียงใต้ และตอนกลางของลุ่มแม่น้ำเจ้าพระยา (Rojanadilog et al., 1985) ซึ่งในระยะ 30 ปีที่ผ่านมานี้ ยังไม่มีรายงานการพบนกยูงสายพันธุ์ชวานี้ในภาคใต้ของประเทศไทยเลย (Meckvichai, 2008) และตลอดระยะเวลากว่า 18 ปีที่ผ่านมานั้น มีรายงานพบนกยูงไทย

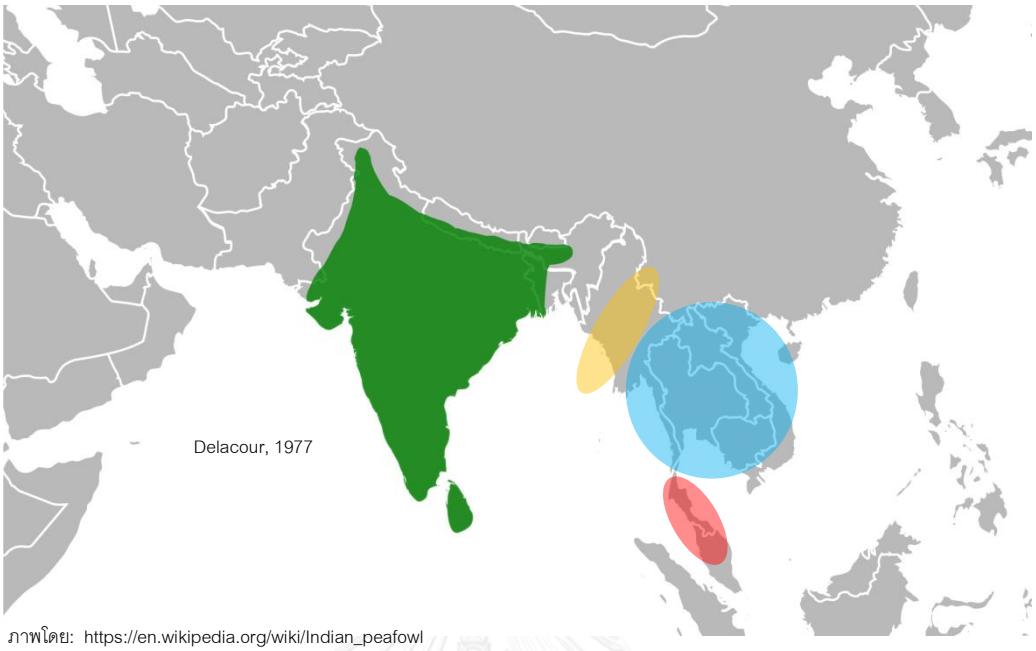
ในป่าธรรมชาติของประเทศไทยจำนวนทั้งสิ้น 11 แห่ง ได้แก่ อุทยานแห่งชาติภูเก้า-ภูพานคำ จังหวัดหนองบัวลำภู อุทยานแห่งชาติภูพาน จังหวัดสกลนคร อุทยานแห่งชาติเขาสก จังหวัดสุราษฎร์ธานี เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าทุ่งใหญ่นเรศวร จังหวัดกาญจนบุรี เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง จังหวัดอุทัยธานี เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูเขียว จังหวัดชัยภูมิ เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าลุ่มน้ำสาละวิน จังหวัดแม่ฮ่องสอน เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่ายอดโดม จังหวัดอุบลราชธานี เขตห้ามล่าสัตว์ป่าบึงเกริง-หนองน้ำซับ จังหวัดกาญจนบุรี (Viboonarong, 2002) อุทยานแห่งชาติดอยภูนาง จังหวัดพะเยา อุทยานแห่งชาติแม่ยม จังหวัดแพร่ (Arrathrakorn, 2001; Meckvichai et al., 2000; Viboonarong, 2002) และอุทยานแห่งชาติเขื่อนศรีนครินทร์ จังหวัดกาญจนบุรี (Meckvichai et al., 2001) ปัจจุบันพบว่าประชากรนกยูงไทยในธรรมชาติได้ลดจำนวนลงอย่างรวดเร็ว โดยสาเหตุหลัก คือ การบุกรุกพื้นที่ป่าของมนุษย์ทำให้ป่าถิ่นที่อยู่อาศัยของนกยูงลดจำนวนลง และจากการโดนล่าเพื่อเอาขนมาทำเป็นเครื่องประดับและเอาเนื้อมาเป็นอาหาร (Aksono and Hermadi, 2014; Fuller and Garson, 2000; Holmes, 1989; Meckvichai et al., 2002) ทำให้ปัจจุบันประชากรนกยูงในประเทศไทยที่สามารถอยู่รอดได้ในธรรมชาติ มีการกระจายตัวอยู่เพียง 2 บริเวณหลักๆ คือ ทางภาคเหนือและทางภาคตะวันตกของประเทศเท่านั้น ทางภาคเหนือสามารถพบได้ในบริเวณ 4 ลุ่มแม่น้ำ ได้แก่ บริเวณลุ่มแม่น้ำปิง อิง ยม และน่าน บริเวณลุ่มแม่น้ำปิงพบนกยูงไทยกระจายตัวอยู่ใน 2 พื้นที่ คือ รอยต่อระหว่างอำเภอจอมทอง จังหวัดเชียงใหม่ กับอำเภอลี้ จังหวัดลำพูน และอำเภอดอยสะเก็ด จังหวัดเชียงใหม่ เช่น เขตพื้นที่ศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้ อันเนื่องมาจากพระราชดำริ จังหวัดเชียงใหม่ บริเวณลุ่มแม่น้ำอิงพบนกยูงไทยกระจายตัวในพื้นที่ เช่น เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอ จังหวัดพะเยา และเขตห้ามล่าสัตว์ป่าทับพญาลอ จังหวัดเชียงราย บริเวณลุ่มแม่น้ำยม สามารถพบนกยูงไทยได้ที่บริเวณอุทยานแห่งชาติดอยภูนาง จังหวัดพะเยา อุทยานแห่งชาติแม่ยม จังหวัดแพร่ และเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าดอยผาช้าง จังหวัดพะเยา (Meckvichai et al., 2002) และบริเวณลุ่มแม่น้ำน่านสามารถพบการแพร่กระจายของนกยูงไทยได้ที่บริเวณอำเภอศรีน่าน และอำเภอแม่จริม จังหวัดน่าน (Meckvichai et al., 2007) ในส่วนของภาคตะวันตกนั้นสามารถพบนกยูงได้ที่บริเวณอำเภออุ้มผาง บริเวณลุ่มแม่น้ำแม่กลอง ห้วยขาแข้งและห้วยสาขา โดยพบมากที่สุดบริเวณป่าแถบลุ่มน้ำห้วยขาแข้งในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง จังหวัดอุทัยธานี และเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าทุ่งใหญ่นเรศวร จังหวัดกาญจนบุรี (Meckvichai et al., 2007) (ภาพที่ 4) นอกจากนี้ยังสามารถพบนกยูงไทยในสภาพกรงเลี้ยงได้อีกด้วย เช่น สวนสัตว์เชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่ สวนสัตว์เปิดเขาเขียว จังหวัดชลบุรี

สถานีเพาะเลี้ยงสัตว์ป่าเขาสอยดาว จังหวัดจันทบุรี และสถานีเพาะเลี้ยงสัตว์ป่าดอยตุง จังหวัดเชียงราย

จากที่กล่าวมานั้นจะเห็นได้ว่าขนาดประชากรของนกยูงในปัจจุบันนี้มีจำนวนลดลงมาก ทั้งนี้ทางองค์กรเพื่อการอนุรักษ์ระหว่างประเทศ IUCN (International Union for Conservation of Nature and Natural Resources) (2015) ได้จัดนกยูงไทยไว้ในกลุ่ม endangered species คือเป็นสัตว์ที่ใกล้สูญพันธุ์ สำหรับอนุสัญญาว่าด้วยการค้าระหว่างประเทศซึ่งชนิดสัตว์ป่าและพืชป่าที่ใกล้สูญพันธุ์ CITES (The Conservation on International trade in endanger species of World Fauna and Fauna) (2015) ได้จัดนกยูงไทยไว้ในกลุ่ม Appendix II ซึ่งหมายถึง สัตว์กลุ่มที่อนุญาตให้ค้าขายได้ ภายใต้การควบคุมการส่งออกของประเทศต้นกำเนิด และมีการรับรองโดยประเทศนั้นๆ ว่าการค้าขายดังกล่าวไม่มีผลต่อการอยู่รอดของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ

นอกจากนี้นกยูงไทยยังจัดเป็นสัตว์ป่าคุ้มครองของประเทศไทยตามพระราชบัญญัติสงวนและคุ้มครองสัตว์ป่าพุทธศักราช 2535 อีกด้วย โดยในปี พ.ศ. 2537 นกยูงไทยจัดเป็นสัตว์ป่าคุ้มครองที่ให้เพาะเลี้ยงในเชิงพาณิชย์ได้ นอกจากนี้นกยูงไทยยังอยู่ภายใต้การคุ้มครองโดยกฎหมายในหลายประเทศ ได้แก่ กัมพูชา จีน อินเดีย บังคลาเทศ อินโดนีเซีย ลาว มาเลเซีย เวียดนาม และไทย (Vongkhamheng et al., 2012)

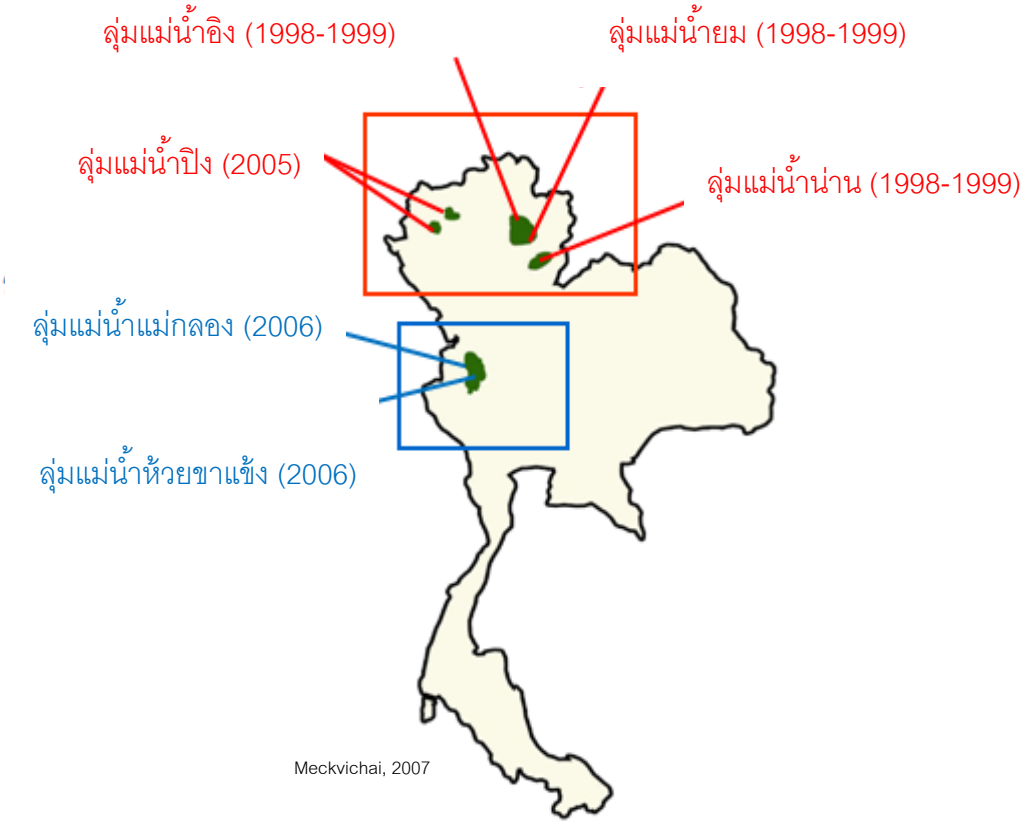
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



ภาพโดย: https://en.wikipedia.org/wiki/Indian_peafowl

ภาพที่ 3 การกระจายตัวของนกยูงไทย *P. muticus* ของประเทศไทยในอดีต โดยสีเขียว แสดงถึงการกระจายตัวของนกยูงอินเดีย *P. cristatus* สีส้ม แสดงถึง การกระจายตัวของนกยูงไทยสายพันธุ์พม่า *P. m. specifer* สีฟ้า แสดงถึง การกระจายตัวของนกยูงไทยสายพันธุ์อินโดจีน *P. m. imperator* และสีแดง แสดงถึง การกระจายตัวของนกยูงไทยสายพันธุ์ชวา *P. m. muticus*

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



ภาพที่ 4 การกระจายตัวของนกยูงไทยหรือนกยูงเขียว *P. muticus* ในปัจจุบันของประเทศไทย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2.3 การศึกษาและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับนกยูงไทย

จากการสืบสวนเอกสารพบการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับนกยูงไทยในประเทศไทยเป็นจำนวนมาก โดยส่วนใหญ่เน้นการศึกษาทางด้านนิเวศวิทยา เช่น (Arrathrakorn, 2001; Dunkeaw, 2009; Ponsena, 1988; Saridniran, 2015; Silapasuwan, 1999) ยกตัวอย่าง เช่น การศึกษาของจิรวัฒน์ ดำแก้ว ในปี พ.ศ. 2552 ได้ศึกษาเกี่ยวกับการแพร่กระจายตามฤดูกาลและโครงสร้างประชากรของนกยูงไทย ที่ศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้ อันเนื่องมาจากพระราชดำริ อำเภอดอยสะเก็ด จังหวัดเชียงใหม่ ผลการศึกษาพบว่าในช่วงฤดูแล้ง (เดือนพฤศจิกายนถึงเดือนเมษายน) การแพร่กระจายของนกยูงจะเกี่ยวข้องกับการสืบพันธุ์ โดยนกยูงเพศผู้จะออกมาจับจองอาณาเขตสำหรับสืบพันธุ์ เป็นพื้นที่เนินดินโล่งๆ และที่ราบโล่งข้างชายป่า หลังจากได้รับการผสมพันธุ์นกยูงเพศเมียจะแยกตัวออกฝูงไปวางไข่และฟักแต่เพียงลำพัง หลังจากนั้นในเดือนมีนาคมลูกนกยูงจะฟักออกจากไข่ โดยโครงสร้างประชากรของนกยูงประกอบด้วย นกยูงเพศผู้ตัวเต็มวัย นกยูงเพศเมียตัวเต็มวัย นกยูงในระยะ subadult เพศผู้และเพศเมีย และลูกนกยูงในระยะ juvenile (Dunkeaw, 2009) นอกจากนี้ในปี พ.ศ. 2557 กาญจน์ สฤษดิ์นิรันดร์ ได้ทำการศึกษาการแพร่กระจายตามฤดูกาลและถิ่นที่อยู่อาศัยของนกยูง ในเขตพื้นที่ของเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอ จังหวัดพะเยา ผลการศึกษาพบว่าในพื้นที่บริเวณรอบอ่างเก็บน้ำแม่จุนและน้ำแวนสามารถพบนกยูงได้ตลอดทั้งปี โดยในฤดูแล้งพบนกยูงและร่องรอยในป่าเบญจพรรณมากที่สุด รองลงมาคือป่าเต็งรัง ป่าชุมชน และพื้นที่เกษตรกรรม ซึ่งในฤดูฝนนั้นไม่พบนกยูงในพื้นที่เกษตรกรรม (Saridniran, 2015) ปัจจุบันการศึกษาทางด้านพันธุกรรมในนกยูงนั้นยังมีจำนวนน้อย และส่วนใหญ่ค่อนข้างจำกัดการศึกษาประชากรในกรงเลี้ยงมากกว่าในธรรมชาติกรงเลี้ยง

การศึกษาและงานวิจัยทางด้านพันธุกรรมในกลุ่มของสัตว์ปีกนั้น ส่วนใหญ่มักศึกษาในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ โดยเฉพาะบริเวณที่เรียกว่าดีลูป (D-loop หรือ Displacement loop) ซึ่งเป็น noncoding, control region ของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ (ภาพที่ 5) ที่มีอัตราการเกิดการกลายพันธุ์ (mutation) สูงกว่าบริเวณอื่นๆ (hypervariable region) (Van de walle et al., 1983) มีหน้าที่สำคัญ คือ เป็นจุดเริ่มต้นของการเพิ่มจำนวนชุดของดีเอ็นเอ (DNA replication) ของสาย heavy strand และเป็นจุดเริ่มต้นขบวนการสร้าง RNA โดยวิธีการถ่ายทอดรหัสของยีน (transcription) ซึ่งดีลูปในกลุ่มนกมีความยาวประมาณ 1,100-1,400 bps แบ่งออกได้เป็น 3 domain โดย domain I เป็นบริเวณที่มีความแปรผันสูงหรือเรียกว่า hypervariable domain ในขณะที่ central domain II เป็นบริเวณที่ conserve มากที่สุด และ domain III เป็นอีกหนึ่งบริเวณที่มีความแปรผันสูง (Desjardins and Morais, 1990) ดังนั้นจึงเหมาะสมที่จะนำมาศึกษา

ลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อหาความแปรผันทางพันธุกรรมในสัตว์ปีก (Al Farhan et al., 2011) ยกตัวอย่างเช่น งานวิจัยของ Merila และคณะในปี ค.ศ. 1997 ได้ศึกษาโครงสร้างประชากรของนกจาบปีกอ่อนเขียว (*Carduelis chloris*) โดยศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีลูปในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอที่ความยาว 637 เบส คือบริเวณ domain I และ II ผลการศึกษาที่ได้พบว่ามีจำนวน variable site ทั้งสิ้น 13 ตำแหน่ง 18 แฮพโพลไทป์ ซึ่งถือว่ามีความหลากหลายทางพันธุกรรมภายกลุ่มประชากรต่ำ (Merila et al., 1997) ต่อมาในปี ค.ศ. 2001 งานวิจัยของ Niu และคณะ ได้ทำการศึกษาเพื่อหาต้นกำเนิดและความหลากหลายทางพันธุกรรมของสายพันธุ์ไก่พื้นเมืองในประเทศจีน ด้วยวิธีการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีลูปในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอที่ความยาว 539 เบส คือบริเวณ domain I และ II ผลการศึกษาที่ได้พบว่ามีจำนวน variable site ทั้งสิ้น 115 ตำแหน่ง 32 แฮพโพลไทป์ และพบว่าไก่พื้นเมืองในประเทศจีนมีความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ต่ำ และอาจจะมีต้นกำเนิดมาจากไก่ป่า (red junglefowl) จากประเทศไทย (Niu et al., 2001) และต่อมาในปี ค.ศ. 2008 งานวิจัยของ Silva และคณะ ได้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและความสัมพันธ์ระหว่างไก่พันธุ์พื้นเมืองในประเทศศรีลังกาและไก่ป่าลังกา (*Gallus lafayetti*) โดยวิเคราะห์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีลูปที่ความยาว 613 และ 675 เบส คือบริเวณ domain I และ II ซึ่งผลการศึกษาพบว่ามีความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ต่ำ และไก่พันธุ์พื้นเมืองในประเทศศรีลังกามีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมกับ red junglefowl และ gray junglefowl มากกว่าไก่ป่าลังกา อาจเป็นไปได้ว่ามาจากหลากหลายต้นกำเนิด โดยที่การศึกษานี้มีประโยชน์ทางด้านการปรับปรุงพันธุกรรมและด้านการอนุรักษ์ (Silva et al., 2008)

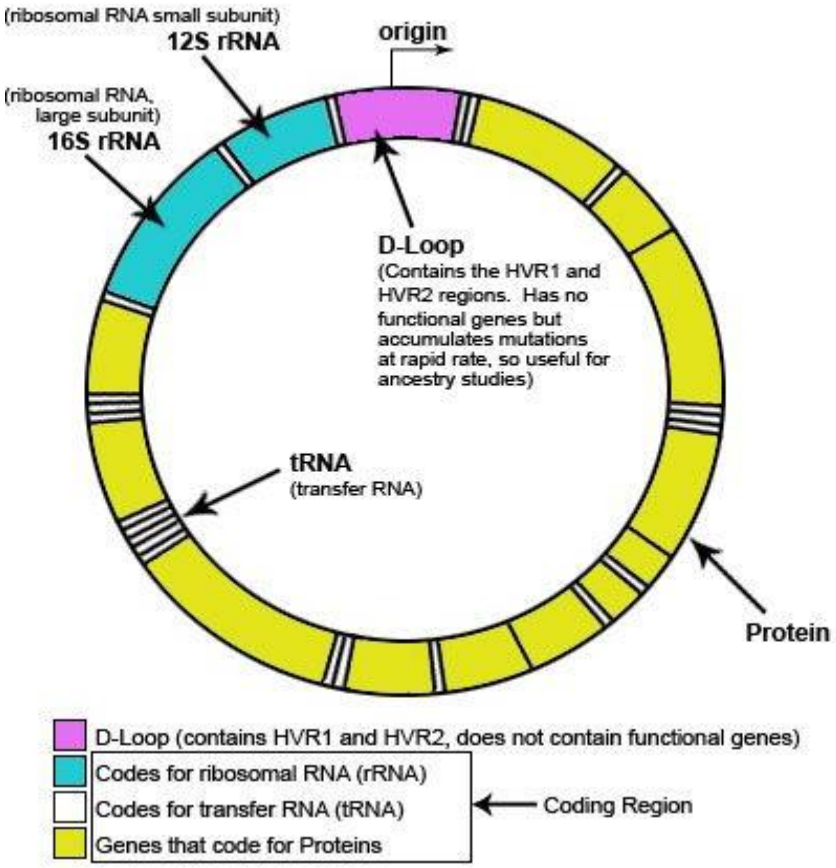
นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาความหลากหลายทางด้านพันธุกรรมของนกยูงไทยด้วย แต่ทั้งนี้ค่อนข้างจำกัดการศึกษาในกลุ่มประชากรนกยูงเขียวในสภาพกรงเลี้ยงมากกว่านกยูงไทยในสภาพธรรมชาติ ซึ่งสาเหตุหลักหนึ่งก็อาจเป็นเพราะว่านกยูงไทยเป็นนกที่พบเจอได้ยากในธรรมชาติ ซึ่งการศึกษาทางด้านพันธุกรรมของนกยูงไทยในสภาพกรงเลี้ยงในประเทศไทยนั้นได้มีการศึกษาในปี ค.ศ. 2011 โดยงานวิจัยของอัมพร วิเวกแว่ว และวีณา เมฆวิชัย เกี่ยวกับการแปรผันทางพันธุกรรมของนกยูงไทยในสภาพกรงเลี้ยงจาก 5 พื้นที่ศึกษา ได้แก่ สถานีวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์ป่าดอยตุง สวนสัตว์เชียงใหม่ ศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้ อันเนื่องมาจากพระราชดำริ สวนสัตว์เปิดเขาเขียว และสถานีวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์ป่าเขาสอยดาว โดยศึกษาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีลูปในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอที่ความยาว 309 เบส ซึ่งเป็นบริเวณ domain I ผลการศึกษา ที่ได้พบว่ามี 18 แฮพโพลไทป์ โดยพบว่าค่าความหลากหลายของแฮพโพลไทป์และค่าความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์มีค่าสูง (Wiwegweaw and Meckvichai,

2011) และในปี พ.ศ. 2554 งานวิจัยของช่อแก้ว เจียมกนกชัย ได้ทำการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีลูปของนกยูงไทยเปรียบเทียบกับกลุ่มประชากรในกรงเลี้ยงในพื้นที่ต่างๆ ของประเทศไทย จาก 5 พื้นที่ดังกล่าวก่อนหน้านี้ โดยจากผลการศึกษาพบว่าประชากรนกยูงไทย จากศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้ อันเนื่องมาจากพระราชดำริ สวนสัตว์เปิดเขาเขียว และสถานีวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์ป่าเขาสอยดาว มีความหลากหลายทางพันธุกรรมค่อนข้างสูง

สำหรับการศึกษาทางด้านพันธุกรรมของนกยูงไทยในสภาพตามธรรมชาติที่เคยมีรายงานการศึกษา ยกตัวอย่างเช่น ในปี พ.ศ. 2543 โดยงานวิจัยของภัทรา พลับเจริญสุข ได้ทำการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีลูปของนกยูงไทยในธรรมชาติที่ความยาว 330 เบส ซึ่งเป็นบริเวณ domain I โดยทำการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มประชากรในอุทยานแห่งชาติดอยภูนางซึ่งเป็นตัวแทนของลุ่มแม่น้ำยม และกลุ่มประชากรจากเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอซึ่งเป็นตัวแทนของลุ่มแม่น้ำอิง พบว่ามีค่าความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์เท่ากับ 1.92 และ 0.22 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าประชากรนกยูงที่อุทยานแห่งชาติดอยภูนางมีการแปรผันทางพันธุกรรมมากกว่าเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอ นอกจากนี้กลุ่มประชากรนกยูงไทยในพื้นที่อุทยานแห่งชาติดอยภูนางน่าจะถูกแยกออกจากกันด้วยถนน หมู่บ้าน และเขาสูงที่กั้นระหว่างลุ่มน้ำ (Plubcharoensook, 2000) ต่อมาในปี พ.ศ. 2554 งานวิจัยของ ณัฐนรี หนุนพาณิชพงศ์ ศึกษาลำดับเบสบริเวณ domain I และ II ของดีลูปที่มีความยาว 536 เบส คือ เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มประชากรทางภาคเหนือและภาคตะวันตก คือ ศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้ อันเนื่องมาจากพระราชดำริ และเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง พบแฮพโพลไทป์จำนวน 4 แฮพโพลไทป์ และมีตำแหน่งที่มีความแปรผันทางพันธุกรรมจำนวน 2 (0.34%) ตำแหน่ง โดยจากข้อมูลดังกล่าวนั้นแสดงว่าทั้งสองประชากรมีความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรม (Noonpanichphong, 2011) เนื่องจากผลการศึกษาที่ได้พบการแปรผันทางพันธุกรรมไม่สูงมากนัก ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่านกยูงในแต่ละประชากรมีความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรม หรืออาจเป็นเพราะข้อมูลที่ใช้ในการวิเคราะห์ยังไม่เพียงพอ เนื่องจากศึกษาเพียง fragment สั้นๆ เท่านั้น อนึ่งเนื่องจาก domain III ของดีลูปจัดได้ว่าเป็นบริเวณที่มีความแปรผันสูงเช่นเดียวกับ domain I และยังไม่เคยมีรายงานการศึกษาในประชากรนกยูงไทยมาก่อน ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงสนใจที่จะทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีลูปทั้งชิ้นส่วนของกลุ่มประชากรนกยูงไทย ในสภาพตามธรรมชาติในภาคเหนือและภาคตะวันตกของประเทศประเทศไทย ทั้งนี้จากการศึกษาของวีณา เมฆวิชัยและคณะในปี พ.ศ. 2539-2551 (Meckvichai, 2008) พบว่าบริเวณในเขตพื้นที่ศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้ อันเนื่องมาจากพระราชดำริ จังหวัดเชียงใหม่ และบริเวณป่า

แถบลุ่มน้ำห้วยขาแข้งในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง จังหวัดอุทัยธานี เป็นพื้นที่ที่สามารถพบการกระจายตัวของนกยูงได้มาก นอกจากนี้ในการสำรวจล่าสุดของ วีณา เมฆวิชัยและคณะ พบว่าในพื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอ จังหวัดพะเยา และเขตห้ามล่าสัตว์ป่าทับพญาลอ จังหวัดเชียงราย ยังเป็นอีกสองพื้นที่ที่สามารถพบนกยูงได้ตามธรรมชาติค่อนข้างมาก ซึ่งทั้งสองพื้นที่นี้จัดเป็นพื้นที่บริเวณลุ่มแม่น้ำอิงและยังไม่เคยมีการศึกษาด้านพันธุกรรมของประชากรนกยูงมาก่อน ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงสนใจที่จะใช้ตัวอย่างนกยูงในธรรมชาติ จากพื้นที่ศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้ เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอ และเขตห้ามล่าสัตว์ป่าทับพญาลอ เป็นตัวแทนของนกยูงทางภาคเหนือ และใช้ตัวอย่างนกยูงจากพื้นที่ในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้งเป็นตัวแทนของนกยูงทางภาคตะวันตก ทั้งนี้ในการแยกอยู่เป็นหย่อมป่าของนกยูงทางภาคเหนือและภาคตะวันตกของประเทศนั้น เมื่อเวลาผ่านไปอาจทำให้ประชากรนกยูงจากทั้งสองพื้นที่ไม่มีการอพยพระหว่างประชากร ดังนั้นหากประชากรของนกยูงแยกกันอยู่เป็นระยะเวลานานพอประกอบกับการมีขนาดของประชากรไม่ใหญ่มาก อาจทำให้ประชากรนกยูงจากทั้งสองพื้นที่มีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมได้ ซึ่งถ้าความแตกต่างทางพันธุกรรมมีมากพอก็อาจทำให้นกยูงในประเทศไทยแยกออกจากกันเป็น 2 ประชากรย่อย ตามพื้นที่การกระจายตัวได้ คือ ประชากรย่อยทางภาคเหนือ และประชากรย่อยทางภาคตะวันตก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



ภาพโดย: http://www.sas.upenn.edu/~tgschurr/labwork/labwork_text.html

ภาพที่ 5 ตำแหน่งของดีลูปในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2.4 พื้นที่ศึกษา

2.4.1 พื้นที่ศึกษา ณ ศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้ อันเนื่องมาจากพระราชดำริ จังหวัดเชียงใหม่

สำหรับประเทศไทยนั้น นกยูงไทยได้ลดจำนวนลงอย่างรวดเร็ว เป็นผลอันเนื่องมาจากพื้นที่ป่าลดลง ดังนั้นนกยูงไทยจึงคงเหลืออยู่แต่เพียงในสวนสัตว์ และพื้นที่ของป่าอนุรักษ์เท่านั้น ซึ่งหนึ่งในป่าอนุรักษ์นั้นคือศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้ อันเนื่องมาจากพระราชดำริ จังหวัดเชียงใหม่ ซึ่งตั้งอยู่ห่างจากตัวเมืองเชียงใหม่ไปทางทิศตะวันออกเฉียงเหนือ บนถนนหลวง เส้นทางที่ 118 สายเชียงใหม่-เชียงราย ระยะทางประมาณ 27 กิโลเมตร ที่ตั้งของศูนย์จะอยู่ด้านขวามือห่างจากถนนใหญ่ประมาณ 2 กิโลเมตร โดยตั้งอยู่ในเขตรอยต่อของตำบลป่าเมี่ยงและตำบลแม่โป่ง อำเภอดอยสะเก็ด จังหวัดเชียงใหม่ (ภาพที่ 6) มีพื้นที่ดำเนินการทั้งหมดประมาณ 8,500 ไร่ (136 ตารางกิโลเมตร) อยู่ในตำแหน่งเส้นรุ้งที่ 18 องศา 53 ลิปดา ถึง 18 องศา 56 ลิปดาเหนือ และเส้นแวงที่ 99 องศา 14 ลิปดา ถึง 99 องศา 16 ลิปดาตะวันออก อยู่ในแผนที่ระวางหมายเลข 4848 III ลำดับชุด L1707 อยู่ในเขตป่าสงวนแห่งชาติป่าขุนแม่กวง ความสูงเหนือระดับน้ำทะเลปานกลางเฉลี่ยระหว่าง 350-580 เมตร มีพื้นที่ลุ่มน้ำ 8,500 ไร่ ความกว้างเฉลี่ยของลุ่มน้ำ 2,500 เมตร ความยาวเฉลี่ย 6,500 เมตร ทิศทางความลาดชันของพื้นที่จากทิศเหนือลงไปทางใต้ (Watershaderesearchunit, 2007)

เขตพื้นที่ของศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้อันเนื่องมาจากพระราชดำริ จังหวัดเชียงใหม่ ตั้งอยู่ในบริเวณลุ่มแม่น้ำปิง ซึ่งเป็นหนึ่งในสี่ของลุ่มแม่น้ำทางภาคเหนือที่พบว่ามีการกระจายตัวของนกยูงไทย นอกจากนี้ทางผู้วิจัยและคณะได้เข้าไปทำการสำรวจพื้นที่ป่า พบว่าสภาพของพื้นที่ป่าส่วนใหญ่เป็นป่าเต็งรัง และบางพื้นที่เป็นป่าโปร่งคือเป็นลูกไม้ขนาดเล็กและไม้ที่สูงไม่เกิน 9 เมตร ซึ่งเป็นลักษณะพื้นที่ที่เหมาะสมแก่การเป็นถิ่นที่อยู่อาศัยของนกยูงไทยตามธรรมชาติ นอกจากนี้เจ้าหน้าที่ได้ทำการสำรวจ และได้มีการรายงานเกี่ยวกับการพบนกยูงไทยในพื้นที่ดังกล่าวอีกด้วย โดยได้มีการรายงานไว้ดังนี้ นกยูงไทยภายในพื้นที่จะอยู่ร่วมกันเป็นฝูงและออกหากินเองตามธรรมชาติ หากไม่ใช่ฤดูผสมพันธุ์จะอยู่รวมกันทั้งตัวผู้และตัวเมีย แต่ถ้าหากเป็นฤดูผสมพันธุ์ประมาณเดือนพฤศจิกายนถึงเดือนเมษายน ในหนึ่งฝูงนั้นจะมีตัวผู้อยู่เพียงตัวเดียวเท่านั้น และที่พบเห็นในพื้นที่มีทั้งหมด 4 ฝูง ซึ่งแต่ละฝูงจะมีนกยูงเขียวประมาณ 15-20 ตัว และกระจายตัวในพื้นที่ดังต่อไปนี้

ฝูงที่ 1 จะออกหากินอยู่บริเวณสวนสัตว์

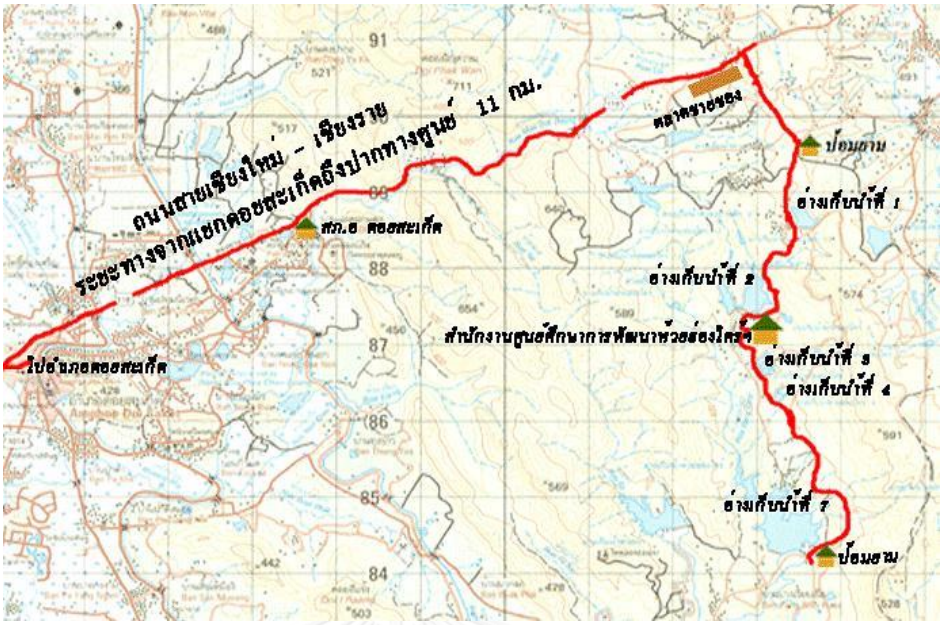
ฝูงที่ 2 จะออกหากินและอาศัยอยู่บริเวณอ่างเก็บน้ำห้วยฮ่องไคร้ที่ 6

ฝูงที่ 3 จะออกหากินและอาศัยอยู่บริเวณอาคารนิทรรศการพืช

ฝูงที่ 4 จะออกหากินและอาศัยอยู่บริเวณอ่างเก็บน้ำห้วยฮ่องไคร้ที่ 3 ไปถึงแปลงแมคคาเดเมีย (ที่มา: http://irrigation.rid.go.th/rid1/HongKhrai/page1.htm) (ภาพที่ 7)

ภาพโดย: http://irrigation.rid.go.th/rid1/HongKhrai/page1.htm

ภาพที่ 6 ที่ตั้งของศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้ อันเนื่องมาจากพระราชดำริ อำเภอดอยสะเก็ด จังหวัดเชียงใหม่



ภาพโดย: http://irrigation.rid.go.th/rid1/HongKhrai/page1.htm

ภาพที่ 7 แผนที่ตั้งภายในของศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้ อันเนื่องมาจากพระราชดำริ อำเภอดอยสะเก็ด จังหวัดเชียงใหม่

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2.4.2 พื้นที่ศึกษา ณ เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง จังหวัดอุทัยธานี

เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้งเป็นผืนป่าขนาดใหญ่ในตำบลแก่นมะกรูด อำเภอบ้านไร่ จังหวัดอุทัยธานี (ภาพที่ 8) เนื่องจากป่าแห่งนี้เป็นป่ารกทึบยังไม่มีผู้บุกรุกทำลายป่า จึงเรียกกันว่าเป็นป่าบริสุทธิ์ (virgin forest) หมายถึง ป่าที่ยังไม่เคยมีการจัดการทางด้านป่าไม้มาก่อน จนกระทั่งเมื่อวันที่ 26 สิงหาคม พ.ศ. 2515 ตามประกาศคณะปฏิวัติ ฉบับที่ 210 ได้ประกาศให้ป่าห้วยขาแข้ง ซึ่งอยู่ในท้องที่อำเภอลานสัก อำเภอบ้านไร่ จังหวัดอุทัยธานีและอำเภออุ้มผาง จังหวัดตาก เนื้อที่ 1,019,375 ไร่ หรือ 1,631 ตารางกิโลเมตร เป็น “เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง” และต่อมาในปี พ.ศ. 2529 ได้มีการผนวกพื้นที่เพิ่มเติมทางด้านทิศตะวันออก และทิศใต้รวมเป็นเนื้อที่ทั้งหมด 1,737,587 ไร่ หรือ 2,780.14 ตารางกิโลเมตร (ประกาศเพิ่มพื้นที่เมื่อวันที่ 3 ธันวาคม 2535) นับว่าเป็นเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าที่มีพื้นที่ใหญ่เป็นอันดับสองของประเทศไทย ทั้งนี้อาณาเขตของเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้งนั้น ครอบคลุมตำบลระบำ ตำบลป่าอ้อ อำเภอลานสัก ตำบลทองหลาง กิ่งอำเภอห้วยคต อำเภอบ้านไร่ และตำบลแก่นมะกรูด อำเภอบ้านไร่ จังหวัดอุทัยธานี และตำบลแม่ละมุ้ง อำเภออุ้มผาง จังหวัดตาก

บริเวณป่าแถบลุ่มน้ำห้วยขาแข้งในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง จังหวัดอุทัยธานี เป็นบริเวณที่พบนกยูงไทยมากที่สุด มีจำนวนประมาณ 400 ตัวรองลงมาคือ เขตรักษาเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าทุ่งใหญ่นเรศวร ซึ่งมีอาณาเขตติดต่อกับฝั่งตะวักตกของเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง (ที่มา: http://www.baanjomyut.com/library_2/extension-2/peacock/04.html) (Meckvichai et al., 2007) ซึ่งพื้นที่ของเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้งนั้น เป็นผืนป่าที่มีความอุดมสมบูรณ์ และเป็นแหล่งที่รวมสภาพป่าที่แตกต่างกันไว้ 5 ประเภท ได้แก่ ป่าดิบเขา ป่าดิบชื้น ป่าดิบแล้ง ป่าเบญจพรรณ และป่าเต็งรัง โดยที่ป่าเต็งรังนั้นเป็นสภาพป่าที่สามารถพบการอยู่อาศัยของนกยูงไทยได้ในธรรมชาติ เนื่องด้วยเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้งไม่ใช่แหล่งท่องเที่ยวที่เปิดให้ประชาชนทั่วไปได้เข้าชม เพราะพื้นที่แห่งนี้จัดเป็นพื้นที่อนุรักษ์เพื่อสัตว์ป่าโดยเฉพาะ ใช้เป็นถิ่นที่อยู่อาศัยของสัตว์ โดยปราศจากการรบกวนของมนุษย์ ซึ่งพื้นที่ดังกล่าวได้มีการป้องกันและดูแลเป็นพิเศษ การอนุญาตให้บุคคลภายนอกเข้าไปในพื้นที่กระทำได้เฉพาะในกรณีจำเป็นเท่านั้น ซึ่งหากมีคนจำนวนมากเข้าไปในพื้นที่ อาจจะก่อให้เกิดปัญหาด้านความไม่สมดุลของระบบนิเวศได้

ภาพโดย: http://info.dla.go.th/public/travel.do?cmd=goDetail&id=403645&random=1446432173031

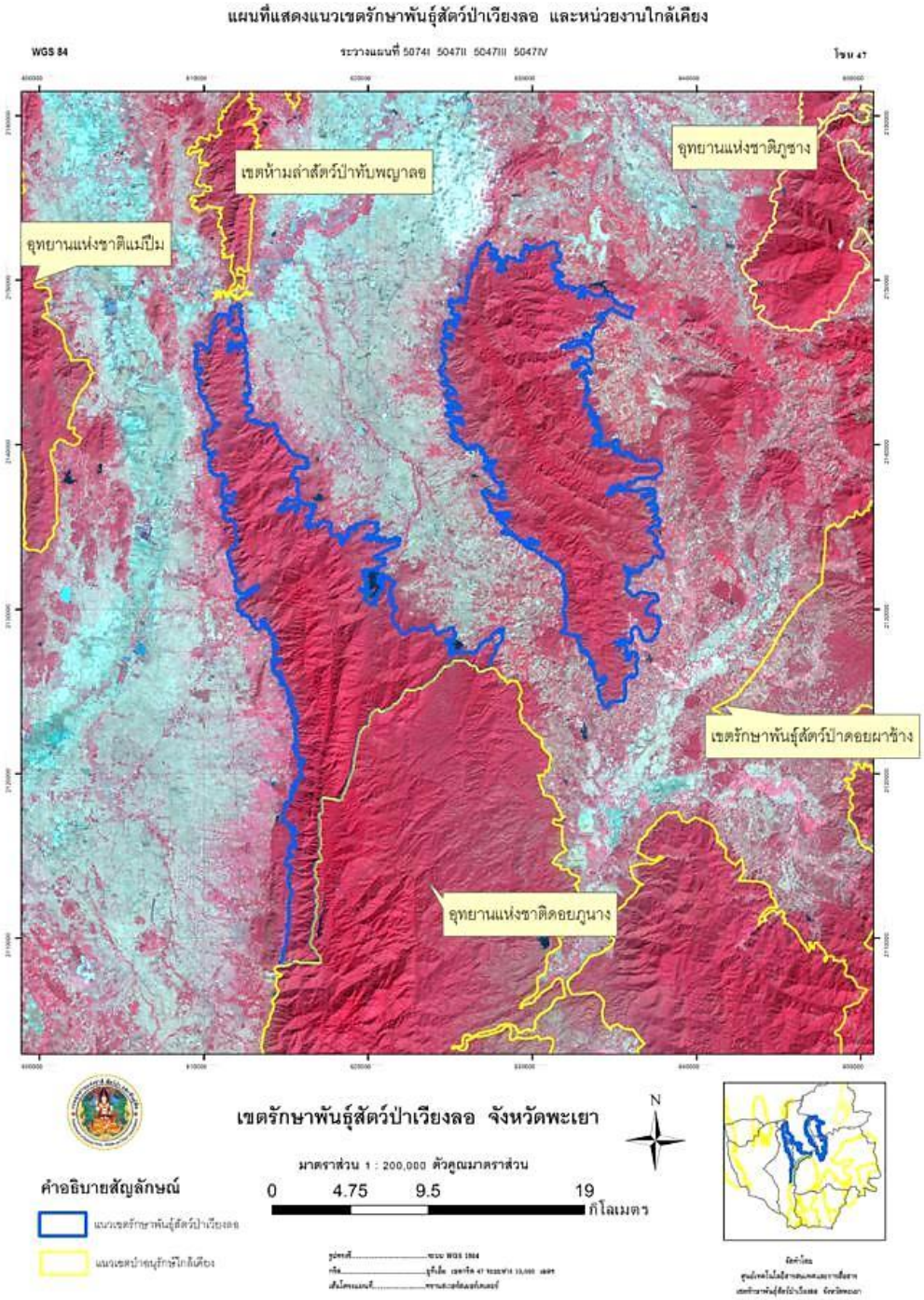
ภาพที่ 8 สภาพพื้นที่และป่าไม้ในพื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2.4.3 พื้นที่ศึกษา ณ เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอ จังหวัดพะเยา

จากการสำรวจล่าสุดของ วีณา เมฆวิชัยและคณะ พบว่าในพื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอ จังหวัดพะเยา เป็นพื้นที่ที่สามารถพบการกระจายของนกยูงไทยในธรรมชาติได้ค่อนข้างมาก และนอกจากนี้ยังมีการศึกษาของกาญจน์ สฤษดิ์นิรันดร์ เกี่ยวกับการแพร่กระจายตามฤดูกาลและถิ่นที่อยู่อาศัยของนกยูง ในเขตพื้นที่ของเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอทั้ง 2 fragment อย่างละเอียด ในบริเวณพื้นที่รอบอ่างเก็บน้ำแม่จุนและน้ำแวน ผลที่ได้พบว่าสามารถพบนกยูงได้ตลอดทั้งปี ซึ่งพื้นที่ดังกล่าวจัดเป็นพื้นที่บริเวณลุ่มแม่น้ำอิงและยังไม่เคยมีการศึกษาด้านพันธุกรรมของประชากรนกยูงมาก่อน ซึ่งมีพื้นที่ป่าครอบคลุมท้องที่อำเภอจุน อำเภอเชียงคำ อำเภอดอกคำใต้ และอำเภอปง จังหวัดพะเยา มีเนื้อที่ประมาณ 231,875 ไร่ หรือประมาณ 371 ตารางกิโลเมตร อยู่ในระวางแผนที่ 1 : 50,000 ของกรมแผนที่ทหาร ลำดับชุดที่ L7017 ระวางระหว่างเส้นรุ้งที่ 19 องศา 4 ลิปดาเหนือ ที่ 19 องศา 28 ลิปดาเหนือ และเส้นแวงที่ 100 องศา 3 ลิปดาตะวันออก ถึง 100 องศา 19 ลิปดาตะวันออก พื้นที่ป่าส่วนใหญ่เป็นป่าเบญจพรรณ และป่าเต็งรัง เนื่องจากสภาพป่าที่มีความอุดมสมบูรณ์ และต่อเนื่องกับพื้นที่ของอุทยานแห่งชาติดอยภูนางซึ่งเป็นผืนป่าใหญ่ ส่งผลให้มีนกยูงไทยซึ่งเป็นสัตว์ป่าของท้องถิ่นที่สำคัญอาศัยอยู่ในพื้นที่

เมื่อพิจารณาจากแผนที่แนวเขตในพื้นที่ของเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอและหน่วยงานใกล้เคียงนั้น พบว่าพื้นที่ของเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอแบ่งออกเป็น 2 fragment ที่แยกออกจากกัน โดย fragment ที่ 1 ทางทิศเหนือ มีอาณาเขตเกือบติดต่อกับพื้นที่ของเขตห้ามล่าสัตว์ป่าทับพญาลอ ซึ่งห่างกันประมาณ 1.5 กิโลเมตร และ fragment ที่ 1 ห่างจาก fragment ที่ 2 ประมาณ 15 กิโลเมตร ซึ่งระหว่าง fragment ทั้งสองนั้นเป็นพื้นที่ของแหล่งชุมชนและถนน ไม่ได้เป็นผืนป่าติดต่อกัน และ fragment ที่ 2 ห่างจากเขตห้ามล่าสัตว์ป่าทับพญาลอประมาณ 40 กิโลเมตร (ภาพที่ 9) จากภาพจะเห็นได้ว่าทางทิศเหนือติดกับเขตห้ามล่าสัตว์ป่าทับพญาลอ ทิศใต้ติดกับอุทยานแห่งชาติดอยภูนาง ทิศตะวันตกติดกับอุทยานแห่งชาติแม่ปืม ทิศตะวันออกเฉียงเหนือติดกับอุทยานแห่งชาติภูซาง และทิศตะวันออกเฉียงใต้ติดกับเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าดอยผาช้าง

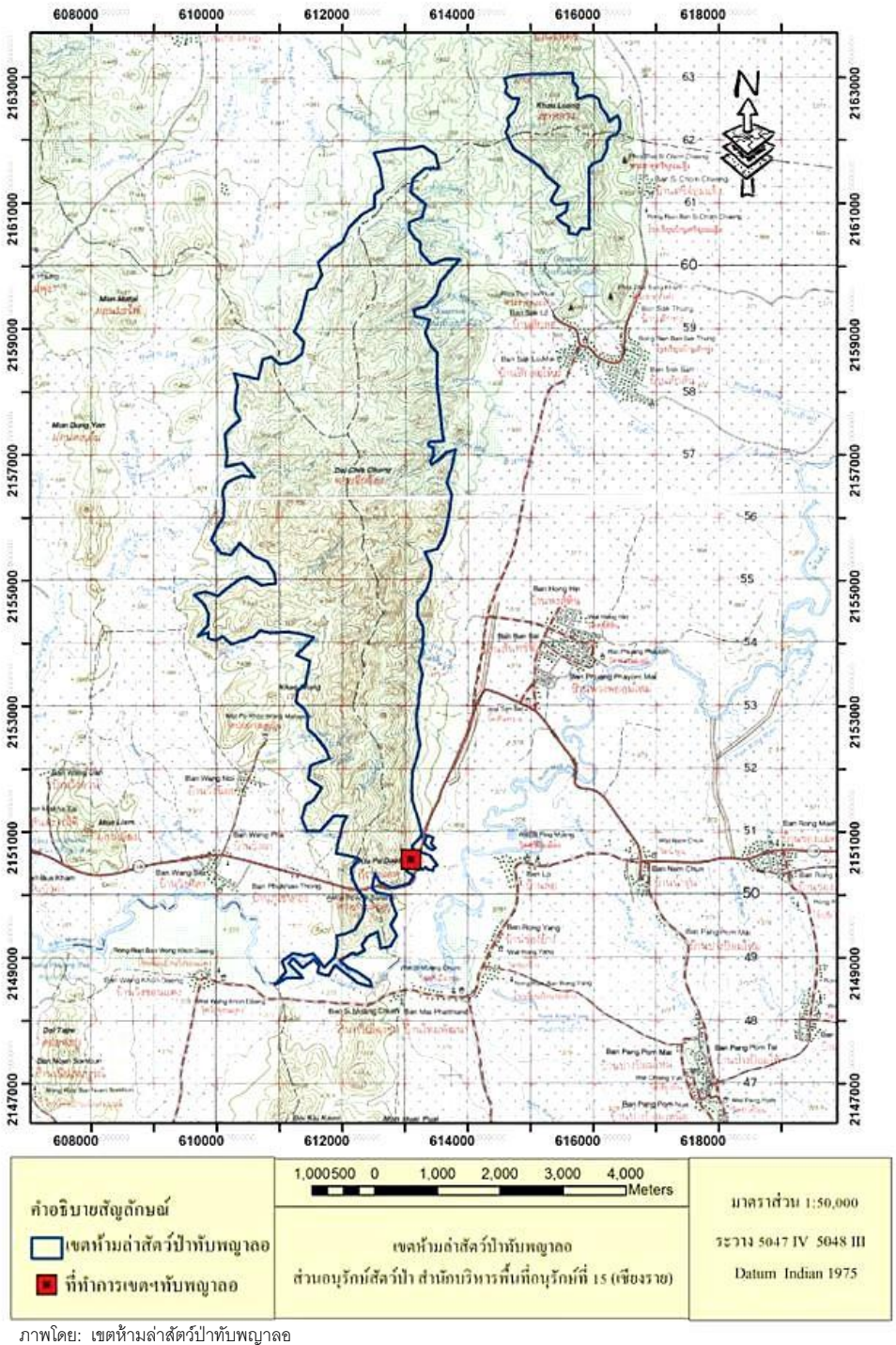


ภาพโดย: เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอ

ภาพที่ 9 แผนที่ตั้งของเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอ และหน่วยงานใกล้เคียง

2.4.4 พื้นที่ศึกษา ณ เขตห้ามล่าสัตว์ป่าทับพญาลอ จังหวัดเชียงราย

เขตห้ามล่าสัตว์ป่าทับพญาลอมีพื้นที่เกือบติดต่อกับเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอทางทิศใต้ และเป็นพื้นที่ใหม่ที่ยังไม่มีรายงานการสำรวจและศึกษาทางด้านพันธุกรรมเกี่ยวกับนกยูงไทยมาก่อน โดยมีเนื้อที่ 18,070 ไร่ หรือประมาณ 28.91 ตารางกิโลเมตร อยู่ในแผนที่ระวาง 1:50,000 ของกรมแผนที่ทหาร ลำดับชุดที่ L 0717 ระวางที่ 5048 III และ 5047 IV ระหว่างเส้นรุ้งที่ 19°25' N ถึง 19°35' N และเส้นแวงที่ 100°3' E ถึง 100°8' E พื้นที่ส่วนใหญ่ของเขตห้ามล่าสัตว์ป่าทับพญาลอ อยู่ในเขตพื้นที่ป่าอนุรักษ์ (ZONE C) ครอบคลุมพื้นที่ ตำบลหงส์หิน อำเภอจุน จังหวัดพะเยา ตำบลสันมะค่า ตำบลป่าแดด อำเภอป่าแดด และตำบลแม่ลอย อำเภอเทิง จังหวัดเชียงราย ในพื้นที่ไม่มีประชาชนอาศัยอยู่หรือเข้าไปทำประโยชน์ ซึ่งนอกจากนี้พื้นที่โดยรอบของพื้นที่เขตห้ามล่าสัตว์ป่าทับพญาลอ ในรัศมี 5 กิโลเมตร พบว่ามีการใช้ประโยชน์พื้นที่ของราษฎรส่วนใหญ่เป็นด้านเกษตรกรรม ปลูกพืชไร่ ปลูกไม้ผล ปลูกยางพารา ทำนาข้าว สภาพพื้นที่โดยทั่วไปเป็นพื้นที่ภูเขาและอยู่ในพื้นที่ของลุ่มแม่น้ำอิงเช่นเดียวกับเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอ ทำให้มีสภาพแวดล้อมที่หลากหลาย สำหรับทรัพยากรป่าไม้ พบว่าพื้นที่ส่วนใหญ่ (มากกว่าร้อยละ 90) ยังคงสภาพเป็นพื้นที่ป่า ที่มีความอุดมสมบูรณ์ ชนิดป่าที่พบในพื้นที่ จำแนกได้ 3 ประเภท คือ ป่าเบญจพรรณ พื้นที่ชุ่มน้ำ และป่าเต็งรัง ซึ่งป่าเต็งรังเป็นป่าที่ครอบคลุมพื้นที่มากที่สุดประมาณร้อยละ 70 ของพื้นที่ จากสภาพทางภูมิศาสตร์ดังกล่าวจึงสามารถพบนกยูงไทยได้ในพื้นที่นี้ และเมื่อพิจารณาจากแผนที่อาณาเขตที่ตั้งของเขตห้ามล่าสัตว์ป่าทับพญาลอพบว่า มีพื้นที่แยกออกจากกันเป็น 2 fragment (ภาพที่ 10) เช่นเดียวกับเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอ แต่มีระยะห่างไม่มากประมาณ 3 กิโลเมตร จากภาพจะเห็นได้ว่าทางทิศใต้และทิศตะวันออกติดกับเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอ และทิศตะวันตกติดกับอุทยานแห่งชาติแม่ปืม



ภาพโดย: เขตห้ามล่าสัตว์ป่าทับพญาลอ

ภาพที่ 10 แสดงแผนที่ตั้งของเขตห้ามล่าสัตว์ป่าทับพญาลอ

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 สถานที่ศึกษาและเก็บตัวอย่าง

ในการศึกษาครั้งนี้ได้นำขนนกยูงที่หลุดร่วงแล้วในสภาพธรรมชาติจาก 4 พื้นที่ของประเทศไทยมาทำการสกัดดีเอ็นเอและเพิ่มปริมาณยีนเป้าหมายด้วยเทคนิค PCR โดยพื้นที่ศึกษาและเก็บตัวอย่าง ได้แก่

1. พื้นที่ศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้อันเนื่องมาจากพระราชดำริ ตำบลป่าเมี่ยงและตำบลแม่โป่ง อำเภอดอยสะเก็ด จังหวัดเชียงใหม่ จำนวน 27 เส้นขน (n=27)
2. พื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอ ตำบลน้ำแวน อำเภอจุน จังหวัดพะเยา จำนวน 123 เส้นขน (n=47)
3. พื้นที่เขตห้ามล่าสัตว์ป่าทับพญาลอ ตำบลหงส์หิน อำเภอป่าแดด จังหวัดเชียงราย จำนวน 109 เส้นขน (n=27)
4. พื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง ตำบลแก่นมะกรูด อำเภอลานสัก จังหวัดอุทัยธานี จำนวน 22 เส้นขน (n=22)

โดยพื้นที่ศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้อันเนื่องมาจากพระราชดำริ และเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้งนั้น ได้ใช้ตัวอย่างเส้นขนนกยูงที่ได้เก็บมาแล้วและใช้เป็น museum collection สำหรับพิพิธภัณฑสถานธรรมชาติวิทยาแห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ของภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จากการเก็บตัวอย่างโดย รองศาสตราจารย์วีณา เมฆวิชัย และคณะ สำหรับในพื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอและเขตห้ามล่าสัตว์ป่าทับพญาลอ ได้ทำการเก็บตัวอย่างขนนกยูงที่หลุดร่วงแล้วในธรรมชาติในช่วงฤดูกาลผสมพันธุ์ในปี พ.ศ. 2557-2558 (ดังรายละเอียดในหัวข้อ 3.2.2)

3.2 การเก็บตัวอย่าง

ในการเก็บตัวอย่างขนนกยูงในสภาพตามธรรมชาตินั้น ปัญหาหลักอย่างหนึ่งในการทำการศึกษาวิจัย คือการเก็บตัวอย่าง กล่าวคือนกยูงเป็นสัตว์ปีกที่มีขนาดตัวใหญ่ สามารถบินได้และตกใจง่ายมาก ถ้าหากได้ยินเสียงที่ผิดปกติ หรือถ้าผู้วิจัยและคณะเดินสำรวจเข้าไปใกล้กับบริเวณที่นกยูงอยู่ อาจทำให้นกยูงเกิดอาการตกใจ บินหนีไป หรืออาจเกิดอาการช็อกได้ ด้วยเหตุนี้จึงไม่สามารถใช้ตาข่ายในการจับตัวหรือใช้ยาสลบเพื่อเก็บตัวอย่างเส้นขนโดยตรงจากตัวนกยูงได้ ดังนั้นจึงมีวิธีการเพียงวิธีเดียวที่เป็นวิธีที่ดี เหมาะสม และปลอดภัยสำหรับนกยูงมากที่สุด คือการเก็บขนที่หลุดร่วงแล้วโดยการเดินสำรวจป่าในช่วงหลังการจับคู่ผสมพันธุ์ในฤดูกาลผสมพันธุ์ของนกยูง เนื่องจากเป็นช่วงที่นกยูงสลัดขน (ภาพที่ 11) ซึ่งฤดูกาลจับคู่ผสมพันธุ์ของนกยูงอยู่ในช่วงประมาณเดือนพฤศจิกายนถึงเดือนมีนาคม (Ponsena, 1988)

ภาพที่ 11 ตัวอย่างขนนกยูงที่หลุดร่วงในช่วงหลังการจับคู่ผสมพันธุ์ในฤดูกาลผสมพันธุ์ของนกยูงในสภาพป่าเต็งรัง ในพื้นที่เขตห้ามล่าสัตว์ป่าทับพญาลอ

สำหรับในพื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอและเขตห้ามล่าสัตว์ป่าทับพญาลอ (ภาพที่ 12) ผู้วิจัยและคณะได้เข้าไปเก็บตัวอย่าง 2 ครั้งด้วยกัน คือ ครั้งที่ 1 ระหว่างวันที่ 20-24 เมษายน พ.ศ. 2557 และครั้งที่ 2 ระหว่างวันที่ 5-9 พฤษภาคม พ.ศ. 2558 โดยแต่ละพื้นที่ได้เข้าไปเก็บตัวอย่างทั้งหมด 14 และ 9 ตำแหน่ง ตามลำดับ ซึ่งแต่ละตำแหน่งนั้นห่างกันมากกว่า 1.5 กิโลเมตร โดยขั้นตอนการเก็บเส้นขนนกยูงประกอบไปด้วยการถ่ายภาพ การจดรายละเอียดเกี่ยวกับวันที่และชื่อสถานที่แต่ละตำแหน่งลงในสมุดบันทึกและถุงพลาสติกที่เก็บเส้นขน (ภาพที่ 13) นอกจากนี้ยังได้ใช้เครื่อง GPS ทำการบันทึกพิกัด (ภาพที่ 14) เพื่อระบุตำแหน่ง ว่าได้พบเส้นขนที่ตำแหน่งใดในพื้นที่อีกด้วย ซึ่งจากการระบุตำแหน่งนั้นทำให้สามารถทราบระยะห่างในแต่ละตำแหน่งได้ โดยใช้โปรแกรม ArcGIS ในการวิเคราะห์

ภาพที่ 12 สภาพพื้นที่ของป่าเต็งรังโดยการเดินสำรวจป่าในบริเวณเก็บตัวอย่าง ก. สภาพพื้นที่ป่าเต็งรังของเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอ ข. สภาพพื้นที่ป่าเต็งรังของเขตห้ามล่าสัตว์ป่าทับพญาลอ

ภาพที่ 13 การเก็บตัวอย่างเส้นขนนกยูงในสภาพตามธรรมชาติ ก. คณะทำงานเตรียมความพร้อมในการออกสำรวจสถานที่ ในพื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอ ข. การเก็บเส้นขนนกยูงซึ่งประกอบไปด้วยการถ่ายภาพ การจดรายละเอียดเกี่ยวกับวันที่และสถานที่แต่ละตำแหน่งลงในสมุดบันทึกและถุงพลาสติกที่เก็บเส้นขน

ภาพที่ 14 การใช้เครื่อง GPS เพื่อบันทึกพิกัด ก. แสดงตัวอย่างหน้าจอของเครื่อง GPS ที่พร้อมใช้งาน ข. การใช้งานเพื่อบันทึกพิกัดแต่ละตำแหน่งในพื้นที่เก็บตัวอย่างขนนกยูง

เนื่องจากในหนึ่งตำแหน่งที่เก็บตัวอย่างนั้น ส่วนใหญ่พบเส้นขนนกยูงมากกว่าหนึ่งเส้นขน (ประมาณ 1-66 เส้นขน โดยเส้นขนที่พบมากที่สุดในการสำรวจคือขนคลุมหางด้านบนของเพศผู้ (ภาพที่ 15)) จึงทำให้ไม่สามารถระบุจำนวนตัวอย่าง (individual) ของเส้นขนที่เก็บมาได้ ว่าเป็นเส้นขนที่มาจากนกยูงตัวเดียวกันหรือคนละตัว ดังนั้นเพื่อให้สามารถระบุจำนวนตัวอย่างของนกยูงได้ ผู้วิจัยใช้วิธีการดังนี้

1. ระยะห่างในแต่ละตำแหน่งของการเก็บเส้นขนมากกว่า 1.5 กิโลเมตร เนื่องจากการศึกษาก่อนหน้านี้ของคุณพงษ์ศักดิ์ พลเสนา ในปี พ.ศ. 2531 ที่ศึกษาเกี่ยวกับลักษณะทางชีววิทยาและพฤติกรรมการสืบพันธุ์ของนกยูงในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง โดยการเดินสำรวจ ศึกษาพฤติกรรมจากห้างดูสัตว์ และการใช้วิทยุติดตามตัวสัตว์ พบว่าในช่วงฤดูกาลผสมพันธุ์ (เดือนพฤศจิกายนถึงเดือนมีนาคม) นกยูงมี home range ประมาณ 148 เฮกแตร์ หรือมีระยะทางประมาณ 1.5 กิโลเมตร (Ponsena, 1988) ดังนั้นจากการศึกษาดังกล่าวทางผู้วิจัยและคณะได้นำมาประยุกต์ใช้ในเรื่องตำแหน่งของการเก็บเส้นขน คือ ตำแหน่งใหม่ในการเก็บเส้นขน

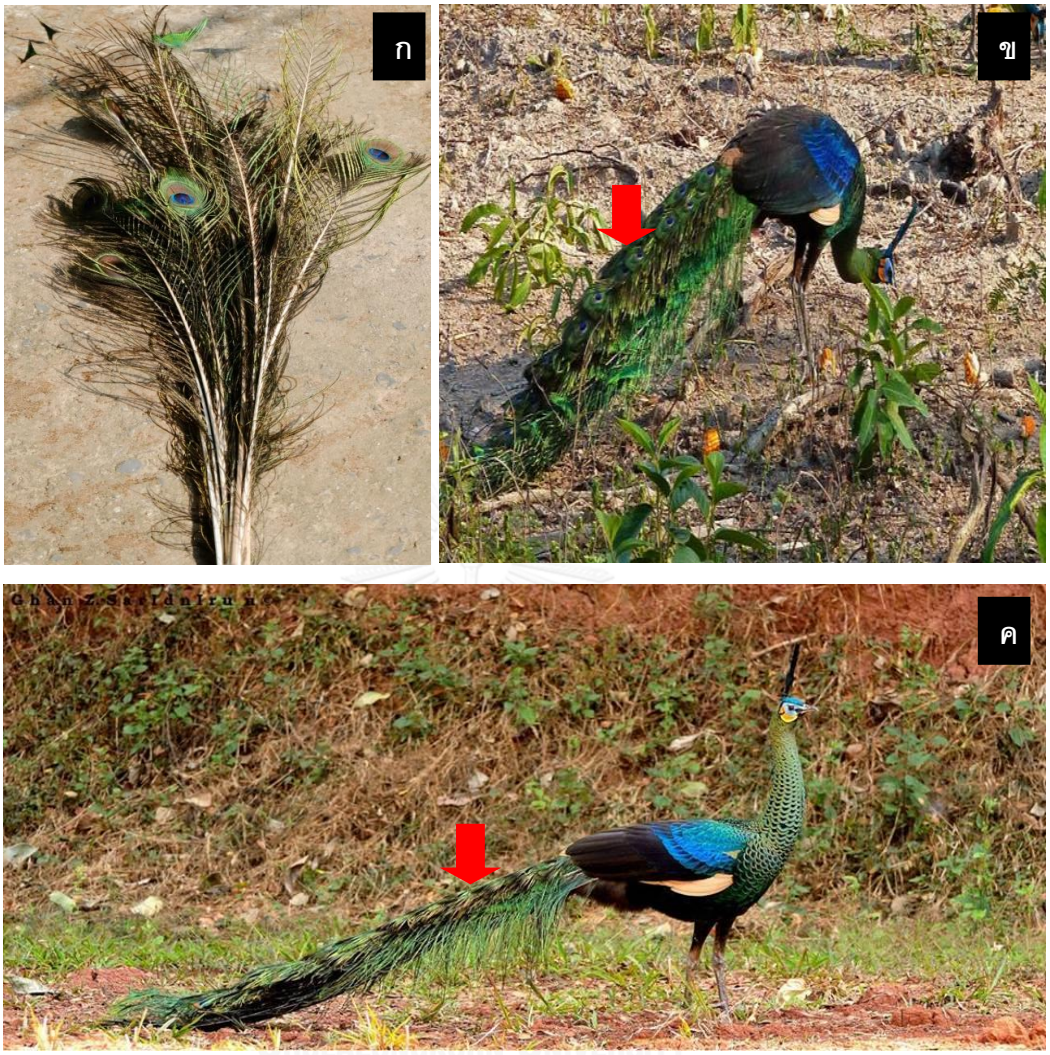
จากพื้นที่ศึกษาเดียวกัน ควรมีระยะห่างจากเส้นขนตำแหน่งเดิมมากกว่า 1.5 กิโลเมตร หรืออาจกล่าวได้ว่าเส้นขนที่ตำแหน่งเดิมกับเส้นขนที่ตำแหน่งใหม่เป็นเส้นขนที่มาจากนกยูงคนละตัวกัน

2. การแยกเพศโดยพิจารณาจากลักษณะสัณฐานภายนอกของเส้นขนนกยูง ในแต่ละตำแหน่งที่เก็บตัวอย่างได้ พบว่าส่วนใหญ่มีเส้นขนของทั้งเพศผู้และเพศเมีย (ภาพที่ 16 และ 17) ดังนั้นจากการจำแนกเพศโดยศึกษาจากลักษณะสัณฐานภายนอกที่แตกต่างกันของเส้นขน โดยอ้างอิงจากหนังสือสัณฐานวิทยาของขนไก่ฟ้าไก่ป่าในประเทศไทย (Meckvichai, 2008) ทำให้ได้จำนวนของตัวอย่างในแต่ละตำแหน่งเพิ่มขึ้น

3. นอกจากการระบุจำนวนตัวอย่างโดยใช้ระยะทางและการแยกเพศแล้ว ผู้วิจัยยังได้ทำการตรวจสอบความแตกต่างของแฮพโพลไทป์ของขนนกยูงที่เหลือในแต่ละตำแหน่ง โดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์เพิ่มเติมอีกด้วย โดยจำนวนเส้นขนที่สุ่มมาตรวจสอบมีจำนวนแตกต่างกันในแต่ละตำแหน่ง (ประมาณ 1-6 เส้นขน/ตำแหน่ง) ทั้งนี้หากพบความแตกต่างของแฮพโพลไทป์เกิดขึ้นก็จะทำให้ได้จำนวนของตัวอย่างในแต่ละตำแหน่งเพิ่มขึ้น

เมื่อเก็บตัวอย่างขนนกยูงจากพื้นที่ศึกษาเสร็จเรียบร้อยแล้ว นำตัวอย่างที่เก็บได้กลับมายังห้องปฏิบัติการและใช้กรรไกรที่ผ่านการฆ่าเชื้อ (autoclave) แล้วตัดเฉพาะบริเวณโคนขน และเก็บโคนขนแต่ละอันใส่ถุงซิปที่ติดฉลากข้อมูลและผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากเชื้อรา และเก็บรักษาตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิห้องในห้องปฏิบัติการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

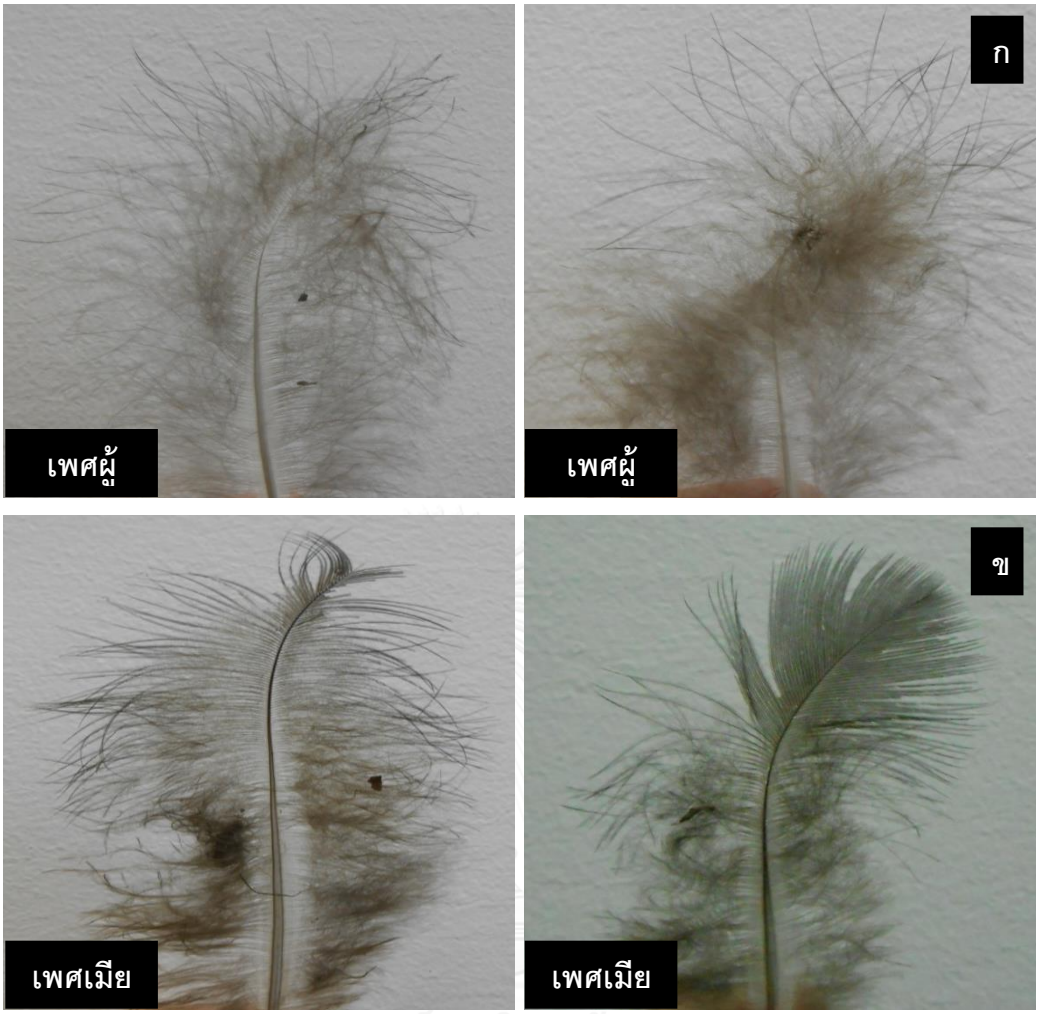


ภาพที่ 15 ตัวอย่างขนนกยูงที่เก็บได้บางส่วนจากการออกภาคสนาม ก. แสดงลักษณะสัณฐานภายนอกของขนคลุมหางด้านบน (upper tail covert) ที่สามารถพบได้เฉพาะในเพศผู้เท่านั้น ข. และ ค. แสดงลักษณะสัณฐานภายนอกของนกยูงเพศผู้และตำแหน่งของขนคลุมหางด้านบน ภาพถ่ายโดยคุณสมิทธิ์ สุติบุตร์ (ข) และคุณกาญจน์ สฤษดิ์นิรันดร์ (ค)

ภาพโดย: https://www.flickr.com/photos/49788843@N03/5555227191

ภาพโดย: คุณกาญจน์ สฤษดินิรันดร์

ภาพที่ 16 ความแตกต่างของลักษณะสัณฐานภายนอกของขนปลายปีก (primary feather) ระหว่างนกยูงเพศผู้และเพศเมีย ก. แสดงลักษณะสัณฐานภายนอกของขนปลายปีกของนกยูงเพศผู้ซึ่งมีลักษณะเป็นขนสีน้ำตาล ไม่มีลวดลาย ข. แสดงลักษณะสัณฐานภายนอกของขนปลายปีกของนกยูงเพศเมียซึ่งมีลักษณะเป็นขนสีน้ำตาล แผ่นขนด้านนอกมีลายตามขวางสีดำ



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาพที่ 17 ความแตกต่างของลักษณะสัณฐานภายนอกของขนคลุมโคนหางด้างล่าง (under tail covert) ระหว่างนกยูงเพศผู้และเพศเมีย ก. แสดงลักษณะสัณฐานภายนอกของขนคลุมโคนหางด้างล่างของนกยูงเพศผู้ซึ่งมีลักษณะเป็นขนสีดำหรือสีเทาหรือสีขาวอมเทาไม่มีลวดลาย เส้นขนไม่เกี่ยวกันเป็นแผ่น ข. แสดงลักษณะสัณฐานภายนอกของขนคลุมโคนหางด้างล่างของนกยูงเพศเมียซึ่งมีลักษณะเป็นขนสีเขียวอมน้ำตาล มีแถบเส้นคู่สีน้ำตาลพาดตามขวาง

นอกจากตัวอย่างขนนกยูงแล้ว ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยยังสามารถเก็บไข่นกยูงในสภาพธรรมชาติได้อีกด้วย ซึ่งไข่นกยูงดังกล่าวนั้นเป็นไข่ที่แม่นกยูงทิ้งรังไปและลูกนกไม่สามารถฟักออกมาเป็นตัวได้ หรือเป็นเศษเปลือกไข่ที่แตกแล้ว โดยที่ลูกนกยูงได้ฟักออกเป็นตัวเรียบร้อยแล้ว (ภาพที่ 18) โดยในพื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอและเขตห้ามล่าสัตว์ป่าทับพญาลอ เก็บไข่นกยูงได้ทั้งสิ้นจำนวน 8 และ 2 ฟอง ตามลำดับ โดยไข่และเปลือกไข่ที่เก็บมาได้ถูกเก็บรักษาสภาพตัวอย่างไว้ใน 99% เอทานอล เพื่อป้องกันไม่ให้ตัวอย่างเกิดการเน่าและเสียหาย โดยผู้วิจัยได้ใช้เยื่อที่ติดอยู่ที่เปลือกไข่มาทำการสกัดดีเอ็นเอต่อไป

ภาพที่ 18 เปลือกไข่หรือไข่นกยูงที่พบจากการสำรวจภาคสนาม ก. แสดงลักษณะรังและเปลือกไข่ของนกยูงภายหลังจากการฟักออกเป็นตัว ในพื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอ ข. แสดงไข่ที่แม่นกยูงทิ้งรังไปแล้ว และลูกนกยูงไม่สามารถฟักออกมาได้ ทำการรักษาสภาพตัวอย่างด้วย 99% เอทานอล โดยเจ้าหน้าที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอพบตัวอย่างเมื่อวันที่ 2 พฤษภาคม พ.ศ. 2558

3.3 การสกัดดีเอ็นเอ และการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายในหลอดทดลองด้วยเทคนิคพีซีอาร์

สกัดดีเอ็นเอ (Total DNA) จากโคนขนและเยื่อที่ติดกับเปลือกไข่ของนกยูงที่เก็บมาได้ โดยใช้ชุดสารเคมีสำเร็จรูปสำหรับสกัดดีเอ็นเอ คือ FavorPrep™ Tissue Genomic DNA Extraction Mini Kit (Favorgen Biotech Corp., Taiwan) โดยทำการสกัดตามคู่มือการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเนื้อเยื่อ จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ซึ่งเทคนิคนี้เป็นเทคนิคที่ช่วยเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมดีเอ็นเอให้มีปริมาณเพิ่มขึ้นหลายเท่าในเวลาอันรวดเร็ว โดยอาศัยหลักการจำลองตัวเองของสายดีเอ็นเอ (DNA Replication) แล้วเลียนแบบกระบวนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอใหม่ตามแบบในสิ่งมีชีวิตตามธรรมชาติ ที่มีการสร้างสายดีเอ็นเอใหม่อีกหนึ่งสายจากดีเอ็นเอเดิม (Doublié et al., 1988) โดยใช้เครื่อง DNA Thermal Cycle ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเป้าหมายที่ต้องการคือดีลูปในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ โดยใช้ไพร์เมอร์ PMDFU-F และ PMDFU-R (ตารางที่ 1) ซึ่งเป็น species-specific primers ในการ amplify DNA ซึ่งไพร์เมอร์ดังกล่าวถูกออกแบบมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีลูปของนกยูง *Pavo muticus* ที่มีข้อมูลอยู่ในฐานข้อมูลของ GenBank (Accession no: NC_012897, EU417811 และ AJ309516) โดยขนาดของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (PCR product) ที่ได้มีความยาวประมาณ 1,100 คู่เบส (base pairs)

ตารางที่ 1 ชื่อและลำดับโอลิโกนิวคลีโอไทด์ของไพร์เมอร์ที่ใช้ในการศึกษา

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ชื่อไพร์เมอร์	ลำดับโอลิโกนิวคลีโอไทด์ของไพร์เมอร์ (5’ – 3’)
PMDFU-F (forward primer)	AACACTTTTTTTAACCTAACCC
PMDFU-R (reverse primer)	CAGTGC TATGCTTTAGGTTAA

3.3.1 วิธีการเตรียม PCR mixture

เตรียมส่วนผสมของสารที่ใช้ในการทำพีซีอาร์ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 0.2 มิลลิลิตร ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว โดยจะใช้ปริมาตรสารต่างๆ ในแต่ละหลอดดังต่อไปนี้

Total DNA template	5.0	µl
10 µM PMDFU-F	1.25	µl
10 µM PMDFU-R	1.25	µl
MilliQ	17.50	µl
2X premix EmeraldAmp® GT PCR Master Mix	25.0	µl
Total volume	**50**	**µl**

สังเคราะห์ยีนเป้าหมายโดยตั้งเครื่อง DNA Thermal Cycle โดยกำหนดโปรแกรมให้มีสภาวะพีซีอาร์ตามเวลาและอุณหภูมิดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 Initial denaturation	95°C	เป็นเวลา	4	นาที
ขั้นตอนที่ 2 (มี 3 ขั้นตอนย่อย)				
■ Denaturation	95°C	เป็นเวลา	40	วินาที
■ Annealing	60.6°C	เป็นเวลา	1.15	นาที
■ Extension	72°C	เป็นเวลา	3	นาที
ขั้นตอนที่ 3 Final extension	72°C	เป็นเวลา	10	นาที

ตั้งโปรแกรมเครื่อง PCR ให้ทำซ้ำในขั้นตอนที่ 2 ตามลำดับขั้นตอนย่อยทั้งสิ้น 39 รอบ

นำหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ที่มีส่วนผสมของสารที่ใช้ในการทำให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสอยู่มาใส่ในเครื่อง DNA Thermal Cycle และเดินเครื่อง จนกระทั่งเครื่อง PCR ทำงานเสร็จตามโปรแกรมที่ตั้งไว้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.4 **การตรวจสอบขนาดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วยวิธี** Agarose gel electrophoresis

นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากขั้นตอนก่อนหน้านี้ มาตรวจสอบขนาดด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis โดยใช้ความต่างศักย์ 135 โวลต์ เป็นเวลา 20 นาที ผ่านตัวกลาง agarose gel ที่มีความเข้มข้น 0.8% (ย้อมเจลด้วย SYBR® Safe DNA gel stain) หลังจากนั้นนำ agarose gel ไปส่องภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง Safe Imager Transilluminator ก็จะเห็นผลิตภัณฑ์พีซีอาร์เรืองแสงขึ้น จากนั้นจึงถ่ายภาพเจลที่ได้ด้วยกล้องถ่ายรูป Nikon COOLPIX L6 เพื่อเป็นการบันทึกผล

3.5 **การหาลำดับนิวคลีโอไทด์** (DNA sequencing)

หลังจากตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของดีลูปในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของนกยูงไทยจากสภาพธรรมชาติใน 4 พื้นที่ของประเทศไทย ภายใต้แสง UV โดยผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้มีขนาดประมาณ 1,100 คู่เบส เห็นเป็นแถบเดียวชัดเจน และไม่มี non-specific band นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ปริมาตร 30 ไมโครลิตรส่งไปยังบริษัท Bioneer เมืองแทจอน ประเทศเกาหลีใต้เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (โดยใช้ทั้ง forward และ reverse primers) ด้วยวิธี automated DNA sequencing โดยทางบริษัทจะส่งข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์มาในรูปแบบไฟล์ข้อมูล และนำข้อมูลทั้งหมดมาทำการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ต่อไป

3.6 **การวิเคราะห์ข้อมูล**

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาตรวจสอบความถูกต้องและความน่าเชื่อถือด้วยตาเปล่า (visual correction) โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความน่าเชื่อถือคือ มีผลของ peak ค่อนข้างชัดเจนและพบการซ้อนทับของแต่ละ peak น้อยมาก จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตรวจสอบแล้วไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของ NCBI (National Center for Biotechnology Information) โดยใช้โปรแกรม Blast (Basic Local Alignment Search Tool) (ที่เว็บไซต์ http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) เพื่อตรวจสอบว่าข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้นั้นตรงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ D-loop ของ *Pavo muticus* หรือไม่ เมื่อตรวจสอบเรียบร้อยแล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาทำ multiple sequence alignment ด้วยโปรแกรม CLUSTAL W (Thompson et al., 1994) เพื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดที่ได้ เพื่อหาตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกัน จากนั้นหาค่าระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) ทั้งภายในและระหว่างกลุ่มประชากรนกยูงไทย โดยใช้โปรแกรม MEGA version 6.06 (ที่เว็บไซต์

www.megasoftware.net) (Tamura et al., 2011) ซึ่งค่าระยะห่างทางพันธุกรรมจะแสดงถึงความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมในประชากร โดยหากค่าระยะห่างทางพันธุกรรมมีค่าน้อย จะแสดงให้เห็นว่าแต่ละประชากรมีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมมาก แต่หากค่าระยะห่างทางพันธุกรรมมีค่ามาก ก็แสดงว่าแต่ละประชากรมีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมน้อย นอกจากนี้ยังคำนวณสัดส่วนของ transition/transversion (ts/tv ratio) จากโปรแกรม MEGA version 6.06 อีกด้วย ซึ่งค่า ts/tv บ่งบอกถึงอัตราส่วนการแทนที่คู่เบสในสายลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอ โดยที่ transition คือ การแทนที่เบสพิวรีน (A, G) ตัวหนึ่งด้วยเบสพิวรีนอีกตัวหนึ่ง หรือเบสไพริมิดีน (T, C) ตัวหนึ่งด้วยเบสไพริมิดีนอีกตัวหนึ่ง และ transversion คือ การแทนที่เบสพิวรีนด้วยเบสไพริมิดีน หรือเบส ไพริมิดีนด้วยพิวรีน

ทำการคำนวณค่าความหลากหลายของแฮพโพลไทป์ (haplotype diversity; *hd*) และค่าความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์ (nucleotide diversity; π) ด้วยโปรแกรม DnaSP (ที่เว็บไซต์ www.ub.edu/dnasp/) (Rozas et al., 2010) ซึ่งค่า *hd* คือ ค่าที่คำนวณได้จากจำนวนและความถี่ของแฮพโพลไทป์ที่แตกต่างกันที่พบในตัวอย่าง เพื่อใช้ในการหาความแตกต่างของแต่ละแฮพโพลไทป์ จากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ในแต่ละพื้นที่ศึกษา

สูตรคำนวณค่าความหลากหลายของแฮพโพลไทป์ (*hd*) = $\frac{n}{n-1}\left(1-\sum_{i=1}^{k} P_i^2\right)$

โดยที่ ค่า n คือ จำนวนตัวอย่าง (sample size)

k คือ จำนวนแฮพโพลไทป์ของตัวอย่าง

P_i คือ ความถี่ของแต่ละแฮพโพลไทป์ (frequency for each mtDNA haplotype) ตำแหน่งที่ i

ส่วนค่า π คือ ค่าเฉลี่ยของจำนวนนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกันเมื่อเปรียบเทียบกับสายลำดับนิวคลีโอไทด์อื่น (Nei and Li, 1979) เพื่อใช้วิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรนกยูงไทยในแต่ละพื้นที่ว่ามีความหลากหลายทางพันธุกรรมมากหรือน้อยเพียงใด นอกจากนี้ยังใช้โปรแกรม DnaSP สำหรับคำนวณหาจำนวนของแฮพโพลไทป์ จำนวนของ variable site และค่าเฉลี่ยของ pairwise nucleotide difference อีกด้วย

สูตรคำนวณค่าความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์ $(\pi) = \sum_{i=1}^{k} \sum_{j<i} P_i P_j \pi_{ij}$

โดยที่ ค่า k คือ จำนวนแฮพโพลไทป์ของตัวอย่าง

P_i คือ ความถี่ของแต่ละแฮพโพลไทป์ (frequency for each mtDNA haplotype) ตำแหน่งที่ i

P_j คือ ความถี่ของแต่ละแฮพโพลไทป์ (frequency for each mtDNA haplotype) ตำแหน่งที่ j

π_{ij} คือ จำนวนของนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกันต่อ 1 ตำแหน่ง ที่เกิดขึ้นระหว่างแฮพโพลไทป์ที่ i ถึง j

วิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของประชากรของนกยูงไทย ในสภาพตามธรรมชาติในประเทศไทย โดยการสร้าง phylogenetic tree ด้วยวิธี Neighbour-joining และ Maximum likelihood ได้เลือกใช้ Kimura 2-parameter model (K80) เป็นแบบจำลองวิวัฒนาการของนิวคลีโอไทด์ ในการสร้าง phylogenetic tree เนื่องจากแบบจำลองนี้ยอมให้มีอัตราการเปลี่ยนแปลงแทนที่ (substitution rate) ที่แตกต่างกันระหว่างการเกิด transition และ transversion โดยค่า ts/tv ratio เท่ากับ 2:1 ด้วยโปรแกรม MEGA version 6.06 โดยคำนวณค่า Bootstrap probability ทั้งหมด 1,000 ครั้ง ซึ่งได้ใช้นกยูงอินเดีย (*Pavo cristatus*) (GenBank Accession Number: KF444060) เป็น outgroup ในการศึกษาครั้งนี้

เนื่องจากการศึกษาครั้งนี้พบการแปรผันทางพันธุกรรมของดีลูปในประชากรนกยูงไทยค่อนข้างต่ำ ดังนั้นเพื่อช่วยอธิบายผลที่ได้จาก phylogenetic tree ให้เห็นภาพที่มีความชัดเจนและละเอียดยิ่งขึ้น ผู้วิจัยจึงได้สร้าง haplotype network ด้วยโปรแกรม Network version 4.6.1.3 (ที่เว็บไซต์ www.fluxus-engineering.com) (Bandelt et al., 1999) เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของแต่ละแฮพโพลไทป์ของประชากรนกยูงไทย ในการสร้าง haplotype network นั้น ไม่ได้ใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีลูปในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอทั้ง 1,090 คู่เบส แต่ได้เลือกใช้เฉพาะตำแหน่งที่แสดงความแปรผันทางพันธุกรรม (variable site) เท่านั้น (ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ใช้ข้อมูลที่เป็น variable site ทั้ง 23 ตำแหน่ง) โดยการสร้าง haplotype network มีวิธีการด้วยกัน 2 วิธี คือ แบบที่ 1 “reduce median” เป็นวิธีการที่ต้องการข้อมูลที่เป็น binary data โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่งนั้น ต้องเป็น A, C, G หรือ T ตัวใดตัวหนึ่งเท่านั้น ส่วนในแบบที่ 2 “median-joining” เป็นวิธีการที่ต้องการข้อมูลที่มีขนาดใหญ่เป็น multi-state data โดยลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นได้ทั้ง

A, C, G, T ที่ตำแหน่งนั้นๆ โดยข้อมูลจากงานวิจัยนี้เป็นแบบ binary data ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกใช้วิธี reduce median ในการศึกษา สำหรับพารามิเตอร์อื่นๆ ที่ใช้เป็นแบบ default parameters

นอกจากนี้ยังคำนวณ AMOVA (analysis of molecular variance) โดยใช้โปรแกรม Arlequin version 3.5.2.2 (ที่เว็บไซต์ http://cmpq.unibe.ch/arlequin35) (Excoffier and Lischer, 2010) สำหรับวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติที่เกี่ยวกับ population structure และ population genetics ของประชากรนกยูงทั้งสี่กลุ่มประชากรอีกด้วย โดยผลที่ได้จากค่า AMOVA สามารถบอกความแตกต่างทางพันธุกรรมทั้งภายในและระหว่างกลุ่มประชากรของนกยูงทั้งทางภาคเหนือและภาคตะวันตก ว่ามีความแตกต่างกันมากหรือน้อยเพียงใดอย่างมีนัยสำคัญ สำหรับการวิเคราะห์นี้ได้จัดแบ่งกลุ่มประชากรนกยูงออกเป็นสองภูมิภาค คือ ประชากรภูมิภาคเหนือได้แก่ ศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้ อันเนื่องมาจากพระราชดำริ จังหวัดเชียงใหม่ เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอ จังหวัดพะเยา และเขตห้ามล่าสัตว์ป่าทับพญาลอ จังหวัดเชียงราย และประชากรภูมิภาคตะวันตก ได้แก่ เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง จังหวัดอุทัยธานี จากนั้นทำการเปรียบเทียบความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่มประชากรภาคเหนือและภาคตะวันตก โดยพิจารณาจากค่า F_{st} โดยที่ค่า F_{st} มีค่าอยู่ระหว่างศูนย์ถึงหนึ่ง ซึ่งหากค่า F_{st} มีค่าเข้าใกล้ศูนย์ แสดงว่ากลุ่มประชากรนกยูงจากทั้งสองภูมิภาคไม่ได้แยกออกจากกัน หรือไม่มีความแตกต่างทางพันธุกรรม ในทางกลับกันหากค่า F_{st} มีค่าเข้าใกล้หนึ่ง แสดงว่ากลุ่มประชากรนกยูงจากทั้งสองภูมิภาคนั้นแยกออกจากกันหรือมีความแตกต่างทางพันธุกรรม

นอกจากนี้ทำการศึกษา mismatch distribution หรือ distribution of pairwise differences ของนกยูงไทยในแต่ละพื้นที่ศึกษา โดยผลการศึกษาที่ได้จะแสดงเป็นกราฟที่แสดงถึงการกระจายของจำนวนเบสที่แตกต่างกันระหว่างแฮพโพลไทป์แต่ละคู่ โดยที่ลักษณะรูปร่างของกราฟจะบ่งบอกถึงคุณสมบัติของประชากร (demographic) ที่เป็นผลมาจากการเพิ่มจำนวนของประชากร (population expansion) กล่าวคือ ในประชากรที่มีการเพิ่มจำนวนประชากรอย่างรวดเร็วเพียงครั้งเดียว จะพบกราฟการกระจายเป็นรูประฆังคว่ำ (unimodal) ในขณะที่กราฟการกระจายแบบไม่สม่ำเสมอ (multimodal) บ่งบอกว่าประชากรนั้นมีจำนวนประชากรที่คงที่เป็นระยะเวลายาวนาน โดยในการทดสอบว่าลักษณะการกระจายของกราฟเป็นแบบใด ทำได้โดยการทดสอบความแตกต่างระหว่างกราฟที่ได้กับ null hypothesis ที่ว่าจำนวนประชากรคงที่เป็นระยะเวลายาวนาน ไม่มีการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของประชากรในอดีต (Dupanloup et al., 2003) และนอกจากนี้ยังทดสอบว่าประชากรนกยูงในแต่ละพื้นที่ศึกษาอยู่ในสภาพสมดุลของ mutation-drift หรือ mutation-selection หรือไม่ โดยทำการทดสอบ neutrality test of equilibrium เพื่อหา

ค่า Tajima's *D* และ Fu's F_S ด้วยโปรแกรม Arlequin โดยค่า Tajima's D และ Fu's F_S นี้จะมีค่าเป็นศูนย์เมื่อประชากรอยู่ในสภาพสมดุล มีค่าเป็นลบเมื่อขนาดประชากรมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นหรืออาจจะบอกได้ถึงแนวโน้มของการคัดเลือกที่เกิดขึ้นเป็น directional selection หรือ purifying selection และมีค่าเป็นบวกเมื่อขนาดของประชากรมีแนวโน้มลดลง หรือแนวโน้มของการคัดเลือกที่เกิดขึ้นเป็น balancing selection (Fu, 1997)

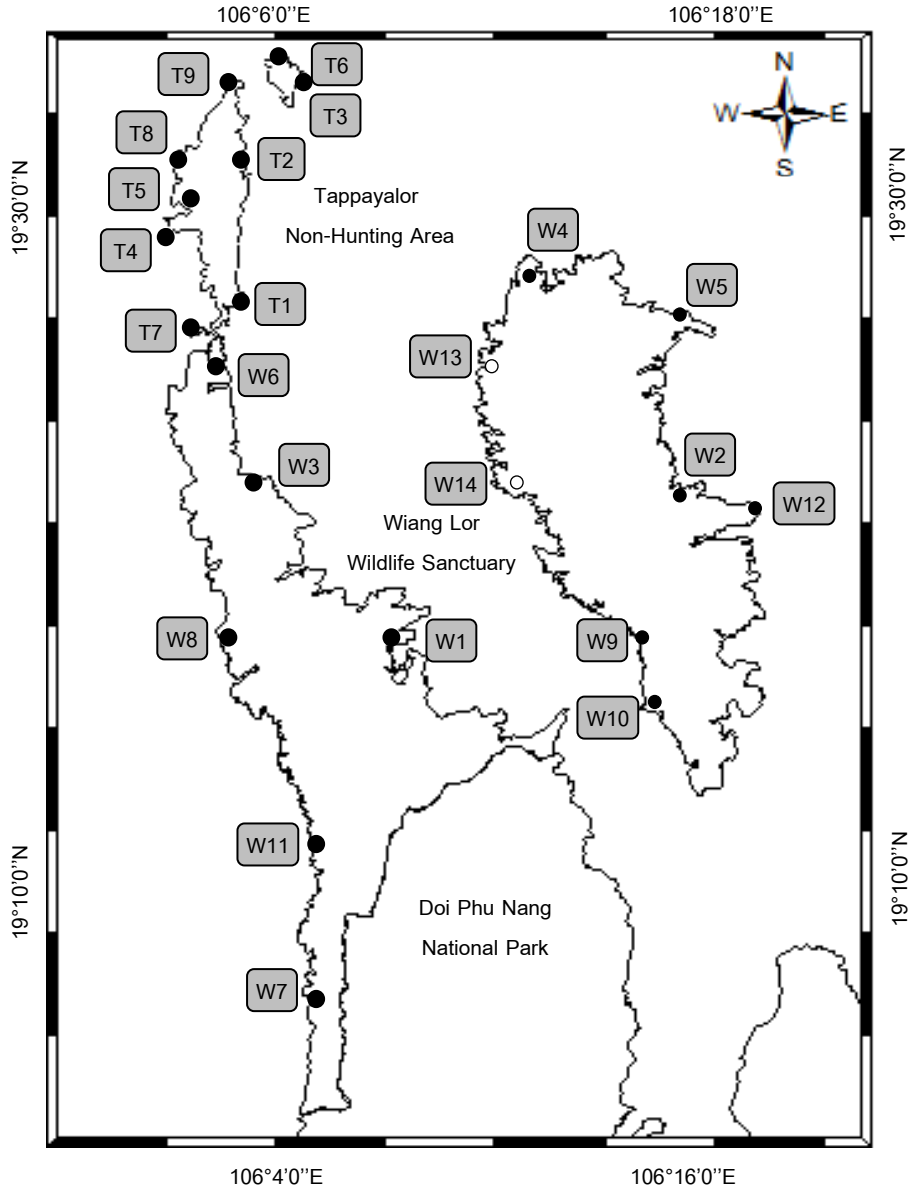
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 4
ผลการศึกษาและอภิปรายผลการศึกษา

4.1 ผลการเก็บตัวอย่างขนนกยูงที่หลุดร่วงแล้วในสภาพธรรมชาติจากเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอและเขตห้ามล่าสัตว์ป่าทับพญาลอ

จากการเก็บตัวอย่างขนนกยูงครั้งที่ 1 และ 2 ในระหว่างวันที่ 20-24 เมษายน พ.ศ. 2557 และวันที่ 5-9 พฤษภาคม พ.ศ. 2558 ตามลำดับ พบว่าได้เข้าไปเก็บตัวอย่างทั้งสิ้น 23 ตำแหน่ง (ภาพที่ 19) ได้แก่ ในพื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอ ได้เข้าไปเก็บตัวอย่างทั้งสิ้น 14 ตำแหน่ง คือ W1-W14 โดยมีเพียง 12 ตำแหน่ง (W1-W12) ที่พบตัวอย่างขนนกยูง และมี 2 ตำแหน่ง (W13-W14) ที่ผู้วิจัยและคณะเข้าไปสำรวจพื้นที่แล้วแต่ไม่พบตัวอย่างขนนกยูง และในพื้นที่เขตห้ามล่าสัตว์ป่าทับพญาลอ ได้เข้าไปเก็บตัวอย่างทั้งหมด 9 ตำแหน่ง คือ T1-T9 โดยผลจากการใช้เครื่อง GPS ในการบันทึกพิกัดแต่ละตำแหน่งจากพื้นที่ศึกษาดังกล่าว แสดงดังต่อไปนี้ (ตารางที่ 2)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



ภาพที่ 19 ตำแหน่งและพิกัดการเก็บตัวอย่างเส้นขนนกยูงในสภาพตามธรรมชาติครั้งที่ 1 และ 2 จากภาพจุดสีดำ คือ ตำแหน่งของการเก็บตัวอย่างในครั้งที่ 1 (20-24 เมษายน พ.ศ. 2557) และครั้งที่ 2 (5-9 พฤษภาคม พ.ศ. 2558) ส่วนจุดสีขาว คือ ตำแหน่งที่ผู้วิจัยและคณะเข้าไปสำรวจพื้นที่แต่ไม่พบตัวอย่างขนนกยูง

ตารางที่ 2 ตำแหน่ง ชื่อตำแหน่งที่ตั้ง และพิกัด GPS ในการเก็บตัวอย่างขนนกยูงจากเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอและเขตห้ามล่าสัตว์ป่าทับพญาลอ

ลำดับที่	ตำแหน่ง	ชื่อตำแหน่งที่ตั้ง	ตำบล และอำเภอ	พื้นที่ศึกษา	พิกัด GPS		
					UTM	X	Y
1	W1	บริเวณสำนักงาน เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอ	ตำบลเวียงลอ อำเภอจุน	WLO	47Q	0620162	2130159
2	W2	บริเวณสำนักงาน เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอ	ตำบลน้ำแวน อำเภอเชียงคำ	WLO	47Q	0634272	2139626
3	W3	วัดกิ่วแก้ว	ตำบลเวียงลอ อำเภอจุน	WLO	47Q	0613606	2141412
4	W4	หน่วยพิทักษ์ป่าที่ วล.3 (แม่ต๋ำ)	ตำบลน้ำแวน อำเภอเชียงคำ	WLO	47Q	0627658	2150980
5	W5	จุดสกัดผาสุก หมู่บ้านผาฮาว	ตำบลน้ำแวน อำเภอเชียงคำ	WLO	47Q	0633625	2149415
6	W6	วัดศรีเมืองชุม รอยต่อ WLO กับ TPL	ตำบลเวียงลอ อำเภอจุน	WLO	47Q	0612364	2146272
7	W7	บ้านถ้ำ ป่าน้ำบ่อทราย	ตำบลเวียงลอ อำเภอจุน	WLO	47Q	0615072	2114934
8	W8	บ้านป่าซาง	ตำบลเวียงลอ อำเภอจุน	WLO	47Q	0611210	2133362
9	W9	ห้วยบ้านวังช้าง	ตำบลน้ำแวน อำเภอเชียงคำ	WLO	47Q	0632382	2131284
10	W10	ห้วยคอกหมู	ตำบลน้ำแวน อำเภอเชียงคำ	WLO	47Q	0631942	2129795
11	W11	หน่วยพิทักษ์ป่า ห้วยชมภู	ตำบลสันโค้ง อำเภอดอกคำใต้	WLO	47Q	0615650	2121373
12	W12	บริเวณสำนักงาน เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอ	ตำบลน้ำแวน อำเภอเชียงคำ	WLO	47Q	0634774	2140136
13	W13	อ่างเก็บน้ำห้วยเคียน	ตำบลน้ำแวน อำเภอเชียงคำ	WLO	47Q	0624896	2143060
14	W14	ห้วยดงดำ	ตำบลน้ำแวน อำเภอเชียงคำ	WLO	47Q	0632341	2128265
15	T1	ป่าชุมชน บ้านสันทราย ม.7	ตำบลหงส์หิน อำเภอจุน	TPL	47Q	0613093	2152464
16	T2	บ้านสักลอใหม่	ตำบลหงส์หิน อำเภอจุน	TPL	47Q	0613250	2158140

17	T3	บ้านศรีจอมแจ้ง	ตำบลหงส์หิน อำเภอจุน	TPL	47Q	0615935	2161900
18	T4	ป่าร่องป่าแดด บ้านวังน้อย	ตำบลส้นมะค่า อำเภอป่าแดด	TPL	47Q	0609613	2156774
19	T5	ป่าอ่างเก็บน้ำ ห้วยผักหนาม บ้านวังน้อย	ตำบลส้นมะค่า อำเภอป่าแดด	TPL	47Q	0609918	2154145
20	T6	บ้านร่องตาด	ตำบลแม่ลอยไร่ อำเภอเทิง	TPL	47Q	0615634	2163351
21	T7	รอยต่อ WLO กับ TPL	ตำบลหงส์หิน อำเภอจุน	TPL	47Q	0612374	2149642
22	T8	ป่าห้วยซาง บ้านส้นโค้งพัฒนา	ตำบลป่าแดด อำเภอป่าแดด	TPL	47Q	0612646	2161999
23	T9	บ้านเกี๋ยงดอย ม.2	ตำบลแม่ลอยไร่ อำเภอเถิง	TPL	47Q	0612145	2162291

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

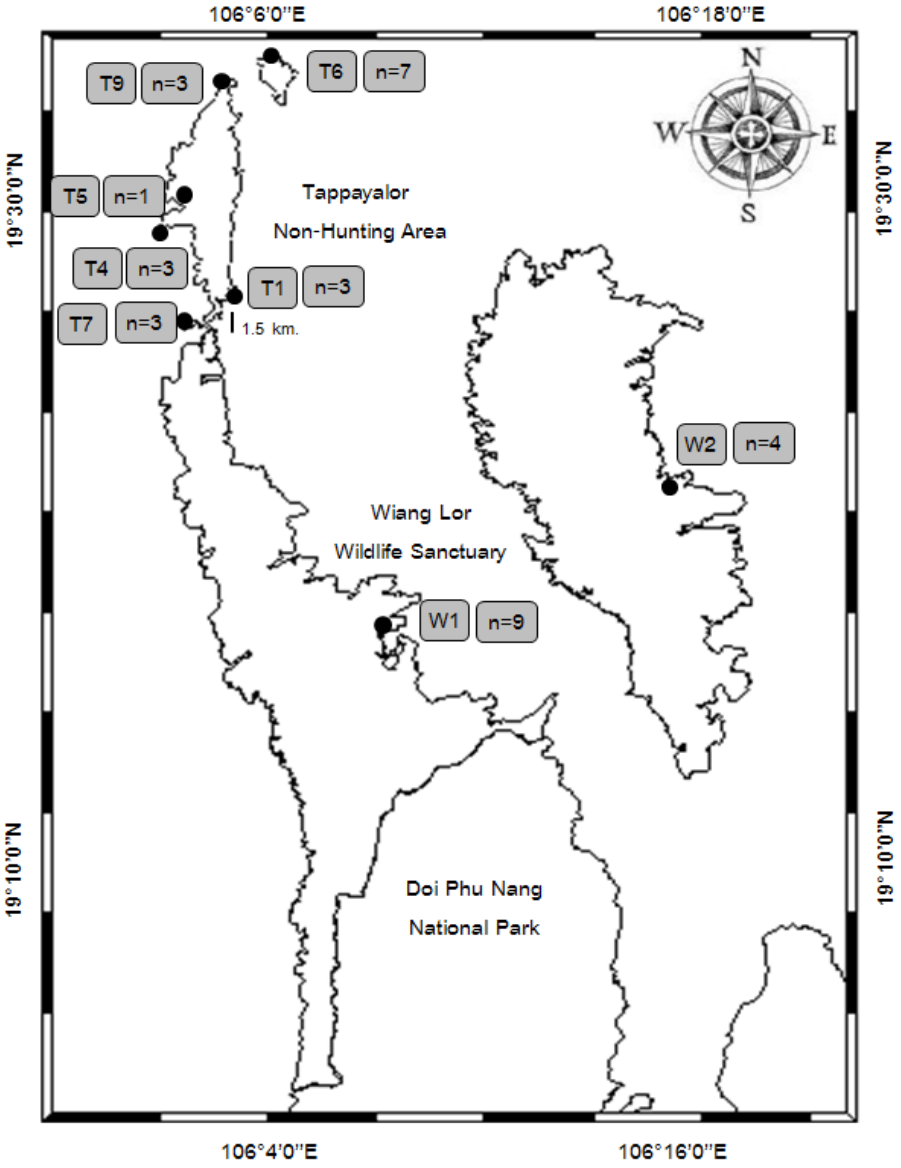
ในการเก็บตัวอย่างขนนกยูงครั้งที่ 1 ระหว่างวันที่ 20-24 เมษายน พ.ศ. 2557 พบว่าในพื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอ ได้เข้าไปเก็บตัวอย่างทั้งสิ้น 2 ตำแหน่ง คือ W1 และ W2 มีจำนวนเส้นขนทั้งหมด 96 เส้นขน และในพื้นที่เขตห้ามล่าสัตว์ป่าทับพญาลอ ได้เข้าไปเก็บตัวอย่างทั้งหมด 6 ตำแหน่ง คือ T1, T4, T5, T6, T7 และ T9 มีจำนวนเส้นขนทั้งหมด 60 เส้นขน (ภาพที่ 20) เมื่อทำการระบุจำนวนตัวอย่างของเส้นขนที่เก็บมาได้ โดยพิจารณาจากวิธีการทั้งสามดังต่อไปนี้ คือ 1. ระยะห่างในแต่ละตำแหน่งของการเก็บเส้นขนมากกว่า 1.5 กิโลเมตร

2. การแยกเพศโดยพิจารณาจากลักษณะสัณฐานภายนอกของเส้นขนนกยูง

3. การตรวจสอบความแตกต่างของแฮพโพลไทป์ของขนนกยูงที่เหลือในแต่ละตำแหน่งโดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์เพิ่มเติม

ผลการศึกษาพบว่าในพื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอ มีจำนวนเส้นขนทั้งหมด 96 เส้นขน คิดเป็นจำนวน n=12 เมื่อรวมตัวอย่างจากไข่นกยูง (n=1) แล้วมีจำนวนตัวอย่างทั้งหมด n=13 และในพื้นที่เขตห้ามล่าสัตว์ป่าทับพญาลอ มีจำนวนเส้นขนทั้งหมด 60 เส้นขน คิดเป็นจำนวน n=18 เมื่อรวมตัวอย่างจากไข่นกยูง (n=2) แล้วมีจำนวนตัวอย่างทั้งหมด n=20 (ตารางที่ 3)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



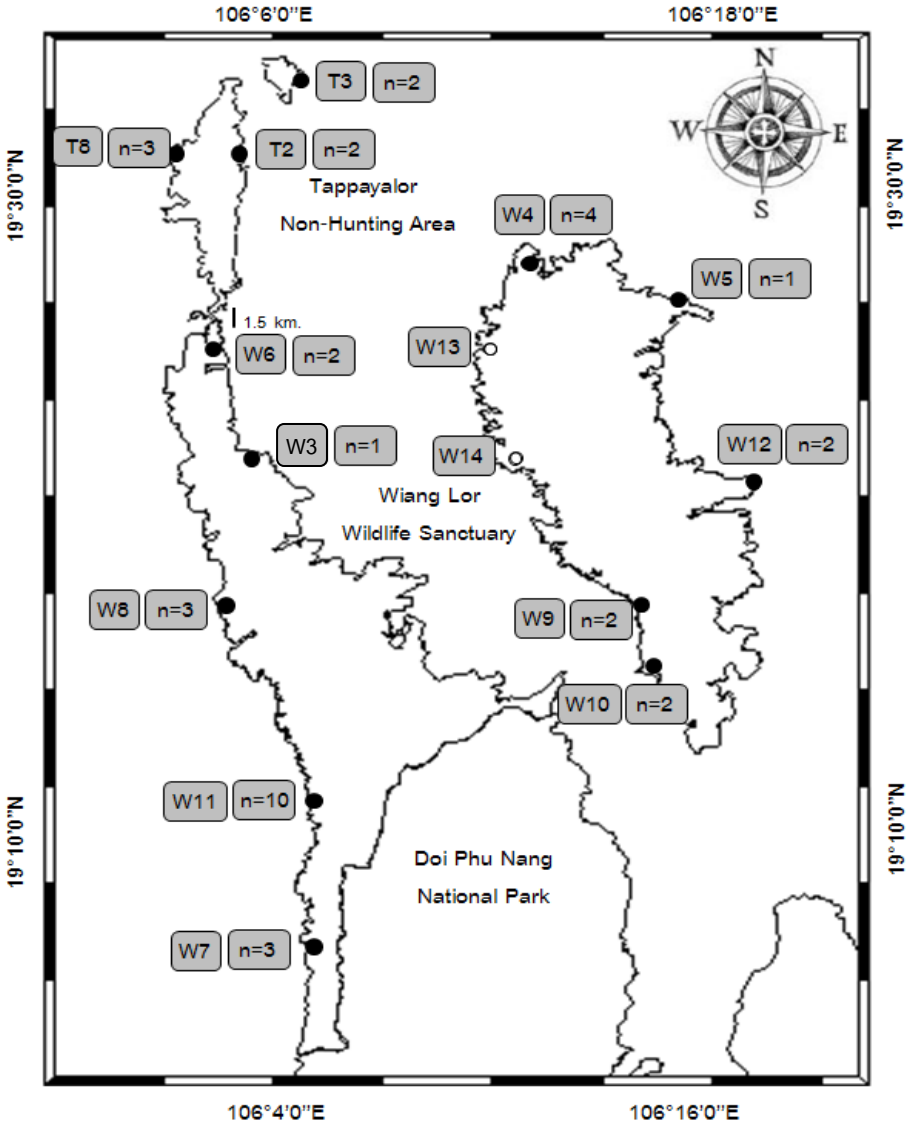
ภาพที่ 20 ตำแหน่งและพิกัดการเก็บตัวอย่างเส้นขนนกยูงในสภาพตามธรรมชาติครั้งที่ 1 ระหว่างวันที่ 20-24 เมษายน พ.ศ. 2557 และจำนวนตัวอย่างที่พบจากเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอและเขตห้ามล่าสัตว์ป่าทับพญาลอ

ตารางที่ 3 ตำแหน่ง พื้นที่ศึกษา จำนวนเส้นขนที่เก็บได้ และจำนวนตัวอย่าง (sample size) ที่สามารถระบุได้ โดยพิจารณาตามหลักเกณฑ์ในวิธีการทดลองหัวข้อที่ 3.2.2 จากการเก็บตัวอย่างครั้งที่ 1 จากเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอและเขตห้ามล่าสัตว์ป่าทับพญาลอ

ลำดับที่	ตำแหน่ง	พื้นที่ศึกษา	จำนวนเส้นขน	จำนวนตัวอย่าง (sample size) ที่สามารถระบุได้			รวม
				ระยะทางมากกว่า 1.5 กิโลเมตร	แยกเพศจากเส้นขน + (ไข่นกยูง)	การตรวจสอบความแตกต่างของแฮพโพลไทป์	
1	W1	WLO	30	1	1 (+1)	6	9
2	W2	WLO	66	1	1	2	4
รวม		**WLO**	**96**	**2**	**3**	**8**	**13**
3	T1	TPL	25	1	1 (+1)	-	3
4	T4	TPL	4	1	1	1	3
5	T5	TPL	1	1	-	-	1
6	T6	TPL	11	1	1	5	7
7	T7	TPL	7	1	1	1	3
8	T9	TPL	12	1	1 (+1)	-	3
รวม		**TPL**	**60**	**6**	**7**	**7**	**20**

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

เนื่องจากการเก็บตัวอย่างในครั้งแรกนั้น จำนวนตัวอย่างที่ได้ยังไม่เพียงพอสำหรับใช้ในการวิเคราะห์ผลของข้อมูลจากทั้งสองพื้นที่ โดยมีเป้าหมายว่าจะเก็บตัวอย่างในแต่ละพื้นที่ให้ได้มากกว่า 20 ตัวอย่าง และประกอบกับการเก็บตัวอย่างจำกัดอยู่เพียงบางบริเวณเท่านั้น โดยเฉพาะในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอได้เก็บตัวอย่างในบริเวณใกล้ๆ กับสำนักงานเท่านั้น จึงยังไม่ครอบคลุมทั่วทุกบริเวณของพื้นที่ ดังนั้นผู้วิจัยและคณะจึงได้เข้าไปเก็บตัวอย่างเพิ่มเติมเป็นครั้งที่ 2 ระหว่างวันที่ 5-9 พฤษภาคม พ.ศ. 2558 โดยผลจากการเก็บขนนกยูงครั้งที่ 2 พบว่าในพื้นที่ของเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอ ได้เข้าไปเก็บตัวอย่างเพิ่มเติมอีก 12 ตำแหน่ง คือ W3-W14 มีจำนวนเส้นขนทั้งหมด 31 เส้นขน คิดเป็นจำนวน n=27 เมื่อรวมตัวอย่างจากไข่นกยูง (n=7) แล้วมีจำนวนตัวอย่างทั้งหมด n=34 และในพื้นที่เขตห้ามล่าสัตว์ป่าทับพญาลอ ได้เข้าไปเก็บตัวอย่างเพิ่มเติมอีกทั้งหมด 3 ตำแหน่ง คือ T2, T3 และ T8 มีจำนวนเส้นขนทั้งหมด 51 เส้นขน คิดเป็นจำนวน n=7 (ภาพที่ 21; ตารางที่ 4)



ภาพที่ 21 ตำแหน่งและพิกัดการเก็บตัวอย่างเส้นขนนกยูงในสภาพตามธรรมชาติครั้งที่ 2 ระหว่างวันที่ 5-9 พฤษภาคม พ.ศ. 2558 และจำนวนตัวอย่างที่พบจากเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอและเขตห้ามล่าสัตว์ป่าทับพญาลอ

ตารางที่ 4 ตำแหน่ง พื้นที่ศึกษา จำนวนเส้นขนที่เก็บได้ และจำนวนตัวอย่าง (sample size) ที่สามารถระบุได้ โดยพิจารณาตามหลักเกณฑ์ในวิธีการทดลองหัวข้อที่ 3.2 จากการเก็บตัวอย่างครั้งที่ 2 จากเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอและเขตห้ามล่าสัตว์ป่าทับพญาลอ

ลำดับที่	ตำแหน่ง	พื้นที่ศึกษา	จำนวนเส้นขน	จำนวนตัวอย่าง (sample size) ที่สามารถระบุได้			รวม
				ระยะทางมากกว่า 1.5 กิโลเมตร	แยกเพศจากเส้นขน + (ไข่นกยูง)	การตรวจสอบความแตกต่างของแฮพโพลไทป์	
1	W3	WLO	5	1	1	3	5
2	W4	WLO	5	1	1	2	4
3	W5	WLO	2	1	-	-	1
4	W6	WLO	2	1	1	-	2
5	W7	WLO	3	1	1	1	3
6	W8	WLO	4	1	1	1	3
7	W9	WLO	2	1	1	-	2
8	W10	WLO	2	1	1	-	2
9	W11	WLO	3	1	1 (+7)	1	10
10	W12	WLO	3	1	1	-	2
11	W13	WLO	-	-	-	-	-
12	W14	WLO	-	-	-	-	-
รวม		**WLO**	**31**	**10**	**16**	**8**	**34**
13	T2	TPL	22	1	-	1	2
14	T3	TPL	14	1	1	-	2
15	T8	TPL	15	1	1	1	3
รวม		**TPL**	**51**	**3**	**2**	**2**	**7**

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

เมื่อนำผลการเก็บตัวอย่างจากครั้งที่ 1 และ 2 มารวมกัน จะพบว่าในพื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอและเขตห้ามล่าสัตว์ป่าทับพญาลอ ได้จำนวนตัวอย่างที่สามารถระบุตัวได้โดยใช้วิธีการจำแนกตัวอย่างทั้งสิ้น 47 และ 27 ตัวอย่างตามลำดับ (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 ตำแหน่ง พื้นที่ศึกษา จำนวนเส้นขนที่เก็บได้ และจำนวนตัวอย่าง (sample size) ที่สามารถระบุได้ โดยพิจารณาตามหลักเกณฑ์ในวิธีการทดลองหัวข้อที่ 3.2.2 จากการเก็บตัวอย่างครั้งที่ 1 และ 2 จากเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอและเขตห้ามล่าสัตว์ป่าทับพญาลอ

ลำดับที่	ตำแหน่ง	พื้นที่ศึกษา	จำนวนเส้นขน	จำนวนตัวอย่าง (sample size) ที่สามารถระบุได้			รวม
				ระยะทางมากกว่า 1.5 กิโลเมตร	แยกเพศจากเส้นขน + (ไข่นกยูง)	การตรวจสอบความแตกต่างของแฮพโพลไทป์	
1	W1	WLO	30	1	1 (+1)	6	9
2	W2	WLO	66	1	1	2	4
3	W3	WLO	5	1	1	3	5
4	W4	WLO	5	1	1	2	4
5	W5	WLO	2	1	-	-	1
6	W6	WLO	2	1	1	-	2
7	W7	WLO	3	1	1	1	3
8	W8	WLO	4	1	1	1	3
9	W9	WLO	2	1	1	-	2
10	W10	WLO	2	1	1	-	2
11	W11	WLO	3	1	1 (+7)	1	10
12	W12	WLO	3	1	1	-	2
13	W13	WLO	-	-	-	-	-
14	W14	WLO	-	-	-	-	-
รวม		WLO	127	12	19	16	47
15	T1	TPL	25	1	1 (+1)	-	3
16	T2	TPL	22	1	-	1	2
17	T3	TPL	14	1	1	-	2
18	T4	TPL	4	1	1	1	3
19	T5	TPL	1	1	-	-	1
20	T6	TPL	11	1	1	5	7
21	T7	TPL	7	1	1	1	3
22	T8	TPL	15	1	1	1	3
23	T9	TPL	12	1	1 (+1)	-	3
รวม		TPL	111	9	9	9	27

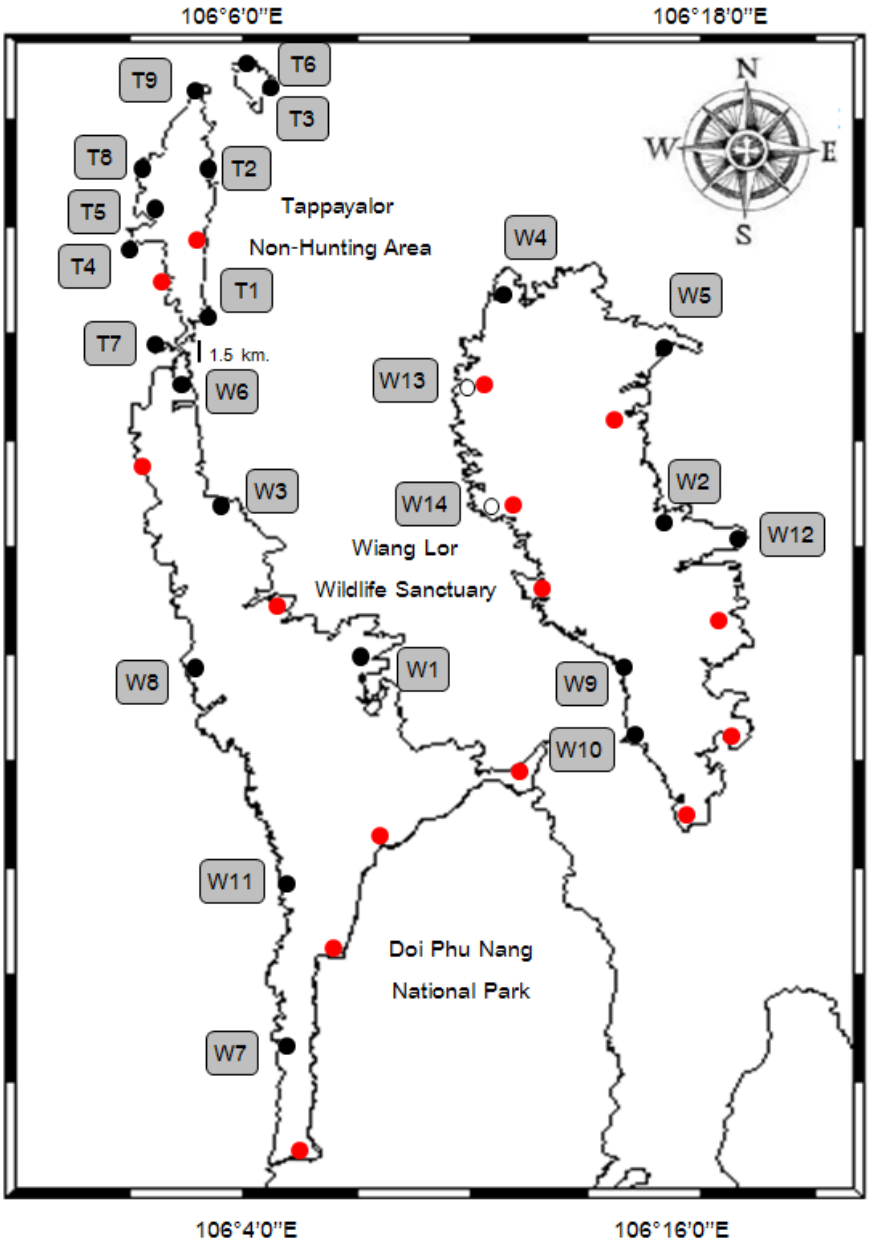
งานวิจัยนี้ได้ดำเนินการเก็บตัวอย่างขนนกยูงและเปลือกไข่จากเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอ และเขตห้ามล่าสัตว์ป่าทับพญาลอ ซึ่งนับว่าเป็นการศึกษาครั้งแรกที่มีการสำรวจและเก็บตัวอย่างนกยูงครอบคลุมเป็นบริเวณกว้างในพื้นที่ศึกษาดังกล่าว ถึงแม้ว่าก่อนหน้านี้ในปี พ.ศ. 2557 กาญจน์ สฤษดิ์นิรันดร์ ได้เข้าทำการศึกษาการแพร่กระจายตามฤดูกาลและถิ่นที่อยู่อาศัยของนกยูงในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอแล้วก็ตาม แต่การศึกษาของเขาจำกัดอยู่เพียงบริเวณพื้นที่รอบอ่างเก็บน้ำแม่จุนและน้ำแวนเท่านั้น (Saridniran, 2015) แต่พื้นที่อื่นๆ นอกเหนือจากนี้ยังไม่เคยมีการสำรวจมาก่อน โดยจากการเก็บตัวอย่างขนนกยูงในครั้งแรกนั้น จำนวนตัวอย่างที่ได้ยังไม่เพียงพอสำหรับใช้ในการวิเคราะห์ผลของข้อมูล และจำนวนของตำแหน่งที่เข้าไปเก็บตัวอย่างยังไม่ครอบคลุมทั่วทั้งพื้นที่ศึกษาโดยจำกัดอยู่เพียงบางบริเวณเท่านั้น ดังนั้นทางคณะผู้วิจัยจึงได้เข้าไปเก็บตัวอย่างเพิ่มเติมเป็นครั้งที่ 2 ซึ่งจากการเก็บตัวอย่างเพิ่มเติมในครั้งที่ 2 นี้ สามารถทำให้ได้ตัวอย่างจากกลุ่มประชากรนกยูงทั้ง 2 พื้นที่ดังกล่าวเกือบครอบคลุมทั่วพื้นที่ทั้งหมดจากทิศเหนือ ทิศตะวันออก ทิศตะวันตก และทิศใต้ (ภาพที่ 19) แต่เนื่องจากในพื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอมี 2 ตำแหน่งที่ผู้วิจัยและคณะเข้าไปสำรวจพื้นที่แล้วแต่ไม่พบขนนกยูง เนื่องมาจากอุปสรรคในการเดินทางเข้าพื้นที่ ดังนั้นจะเห็นได้ว่าจำนวนของตำแหน่งที่เก็บตัวอย่างนั้นยังไม่ครอบคลุมทั่วทั้งพื้นที่ตามต้องการ นอกจากนี้ยังพบว่ายังมีตำแหน่งที่น่าสนใจในการเข้าไปเก็บตัวอย่างเพิ่มเติมเพื่อให้ได้จำนวนของตำแหน่งและตัวอย่างที่ครอบคลุมพื้นที่ให้มากที่สุด เพื่อผลในการวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรมที่สมบูรณ์มากที่สุด โดยพื้นที่ที่น่าสนใจ ได้แก่ บริเวณโดยรอบ (เพิ่มเติมจากการเก็บตัวอย่างจากครั้งที่ 1 และ 2) และบริเวณภายในพื้นที่ของเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอ และเขตห้ามล่าสัตว์ป่าทับพญาลอ (ภาพที่ 22) จากภาพที่ 22 จะเห็นได้ว่าเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอยังมีตำแหน่งที่น่าสนใจในการที่จะเข้าไปเก็บตัวอย่างเพิ่มเติมอีกประมาณ 13 ตำแหน่ง (รวม 2 ตำแหน่งที่ผู้วิจัยและคณะเข้าไปสำรวจพื้นที่แต่ไม่พบขนนกยูง) และเขตห้ามล่าสัตว์ป่าทับพญาลอพบว่ามีอีกประมาณ 2 ตำแหน่ง ทั้งนี้รวมถึงการเข้าไปเก็บตัวอย่างเพิ่มเติมจากด้านในของทั้งสองพื้นที่ด้วย

ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยได้ทำการจำแนก individual ของตัวอย่างขนนกยูงที่เก็บมาได้โดยใช้เกณฑ์ดังนี้ (1) ระยะห่างในแต่ละตำแหน่งของการเก็บเส้นขนมากกว่า 1.5 กิโลเมตร (2) การแยกเพศโดยพิจารณาจากลักษณะสัณฐานภายนอกของเส้นขนนกยูง และ (3) การตรวจสอบความแตกต่างของแฮพโพลไทป์ของขนนกยูงที่เหลือในแต่ละตำแหน่งโดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์เพิ่มเติม ผลการศึกษาพบว่าทั้งสามวิธีสามารถใช้จำแนกจำนวนตัวอย่างได้ค่อนข้างมีความน่าเชื่อถือ โดยจะพบว่าการตรวจสอบความแตกต่างของแฮพโพลไทป์ และการ

แยกเพศโดยพิจารณาจากลักษณะสัณฐานภายนอกของเส้นขนนกยูงเป็นวิธีที่น่าเชื่อถือ เนื่องจากสามารถจำแนกตัวอย่างได้จากผลของความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้

ทั้งนี้นอกจากวิธีการดังกล่าวแล้ว เรายังสามารถใช้การศึกษาเกี่ยวกับไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ ในการจำแนกตัวอย่างเส้นขนได้อีกด้วย ซึ่งวิธีดังกล่าวมีความน่าเชื่อถือและความถูกต้องสูง โดยวิธีการไมโครแซทเทลไลท์นี้เป็นการศึกษาในระดับนิวเคลียร์ดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสซ้ำกันเป็นชุดๆ เช่น (CA)n, (CAG)n หรือ (GAAA)n โดยอาจเป็นการซ้ำกันของลำดับเบสตั้งแต่ 2-5 เบส (Francisco et al., 1996; Rothuizen and Wolferen, 1994; Zajc et al., 1997) ซึ่งสามารถนำมาใช้แยกความแตกต่างของดีเอ็นเอที่นำมาทดสอบได้เป็นอย่างดี โดยจำนวนลำดับดีเอ็นเอที่ซ้ำกันของไมโครแซทเทลไลท์ในสัตว์แต่ละตัว มีจำนวนซ้ำไม่เท่ากัน ดังนั้นจึงสามารถใช้ในการแยกความแตกต่างทางพันธุกรรม (polymorphism) ได้ และทำให้เกิดความหลากหลายของอัลลีลในกลุ่มประชากรสัตว์ ดังนั้นจึงสามารถใช้วิธีการนี้ในการจำแนกและระบุตัวอย่างนกยูงแต่ละตัวได้ ซึ่งการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยวิธีไมโครแซทเทิลไลท์เป็นวิธีที่นิยมใช้ศึกษาในปัจจุบัน โดยมีรายงานการศึกษาที่หลากหลายในกลุ่มของสัตว์ปีก (Gruszczynska and Michalska, 2013; Hasegawa and Bressan, 2000; Rudresh et al., 2015; Sugimoto et al., 2015)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



ภาพที่ 22 ตำแหน่งที่น่าสนใจในการเข้าไปเก็บตัวอย่างเพิ่มเติม เพื่อให้ได้จำนวนของตำแหน่งและตัวอย่างที่ครอบคลุมพื้นที่ให้มากที่สุด จากภาพจุดสีดำ คือ ตำแหน่งของการเก็บตัวอย่างในครั้งที่ 1 (20-24 เมษายน พ.ศ. 2557) และครั้งที่ 2 (5-9 พฤษภาคม พ.ศ. 2558) จุดสีขาว คือ ตำแหน่งที่ผู้วิจัยและคณะเข้าไปสำรวจพื้นที่แต่ไม่พบตัวอย่างขนนกยูง และจุดสีแดง คือ ตำแหน่งบริเวณรอบนอกและภายในพื้นที่ที่น่าสนใจเข้าไปเก็บตัวอย่างเพิ่มเติม

4.2 ผลการสกัดดีเอ็นเอ การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิคพีซีอาร์ และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์

ในการศึกษาครั้งนี้ ได้ทำการสกัดดีเอ็นเอจากขนนกยูงที่เก็บมาได้จาก 4 พื้นที่ของประเทศไทยทั้งหมด 123 ตัวอย่าง ประกอบด้วยจากพื้นที่ศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้ อันเนื่องมาจากพระราชดำริ จำนวน 27 ตัวอย่าง พื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอ จำนวน 47 ตัวอย่าง พื้นที่เขตห้ามล่าสัตว์ป่าทับพญาลอ จำนวน 27 ตัวอย่าง และพื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง จำนวน 22 ตัวอย่าง (ตารางที่ 6) เมื่อนำตัวอย่างทั้งหมดมาสกัดดีเอ็นเอ เพิ่มปริมาณดีลูปในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ และตรวจสอบขนาดของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis พบว่าตัวอย่างทั้ง 123 ตัวอย่าง ให้ผลของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์เป็นแบนเดียวชัดเจน และไม่มี non-specific band (ภาพที่ 23-34) โดยขนาดของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ต้องการมีขนาดประมาณ 1,100 คู่เบส เมื่อส่งผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท Bioneer ประเทศเกาหลีใต้ พบว่าตัวอย่างทั้งหมดให้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ชัดเจนและน่าเชื่อถือ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

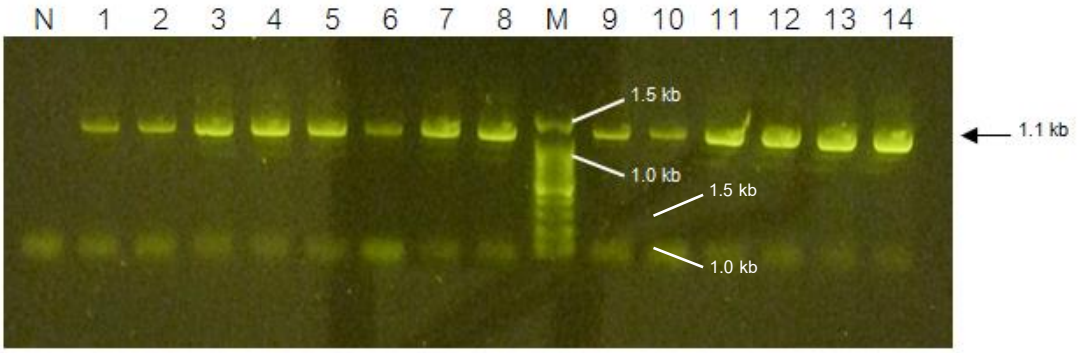
ตารางที่ 6 ผลการสกัดดีเอ็นเอ การเพิ่มปริมาณดีลูปในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์

สถานที่ศึกษา	**อักษรย่อ**	**จังหวัด**	**จำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ**	**จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์เป็นแบนเดียวชัดเจน**	**จำนวนตัวอย่างที่ให้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่น่าเชื่อถือ**
ศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้อันเนื่องมาจากพระราชดำริ	HHK	เชียงใหม่	27	27	27
เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอ	WLO	พะเยา	47	47	47
เขตห้ามล่าสัตว์ป่าทับพญาลอ	TPL	เชียงราย	27	27	27
เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง	HKK	อุทัยธานี	22	22	22
		รวม	123	123	123

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

4.3 ผลการตรวจสอบขนาดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis

ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของดีลูปในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอจาก 4 พื้นที่ศึกษา โดยไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีลูปในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอในหลอดทดลอง คือ PMDFU-F และ PMDFU-R ซึ่งผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ ควรมีขนาดประมาณ 1,100 คู่เบส ซึ่งผลจากการตรวจสอบขนาดของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ด้วยวิธีการทำ agarose gel electrophoresis ผ่านตัวกลางเอกาโรสเจลที่มีความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ความต่างศักย์ 135 โวลต์ เป็นเวลา 20 นาที แสดงดังภาพที่ 23-34



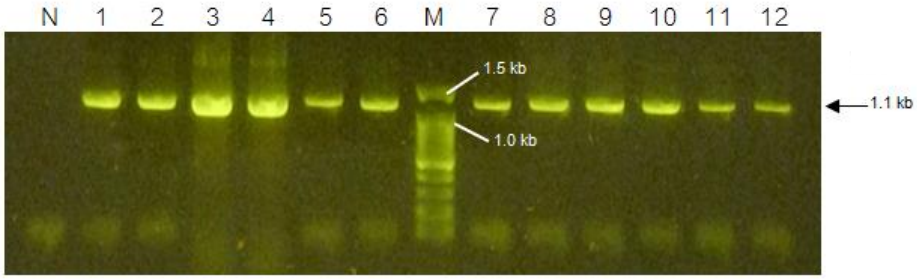
ภาพที่ 23 ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของดีลูปในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของนกยูงเขียว *P. muticus* จากศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้ อันเนื่องมาจากพระราชดำริ ตรวจสอบด้วยการทำ 0.8% agarose gel electrophoresis โดยใช้ความต่างศักย์ 135 โวลต์ เป็นเวลา 20 นาที

แถบ N : Negative control

แถบที่ 1-14 : ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของนกยูงเขียวตัวอย่างที่ HHK2, HHK3, HHK4, HHK6, HHK7, HHK8, HHK9, HHK10, HHK15, HHK21, HHK23, HHK24, HHK25 และ HHK28 ตามลำดับ

แถบ M : 100 bp + 1.5 kb DNA ladder

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

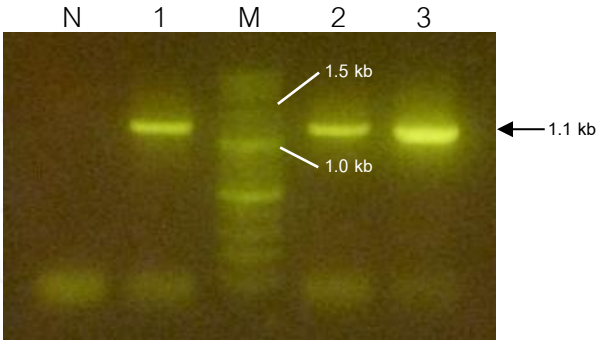


ภาพที่ 24 ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของดีลูปในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของนกยูงเขียว *P. muticus* จากศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้ อันเนื่องมาจากพระราชดำริ ตรวจสอบด้วยการทำ 0.8%agarose gel electrophoresis โดยใช้ความต่างศักย์ 135 โวลต์ เป็นเวลา 20 นาที

แถบ N : Negative control

แถบที่ 1-12 : ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของนกยูงเขียวตัวอย่างที่ HHK30, HHK31, HHK32, HHK34, HHK35, HHK36, HHK371, HHK372, HHK373, HHK38, HHK39 และ HHK41 ตามลำดับ

แถบ M : 100 bp ladder + 1.5 kb DNA ladder



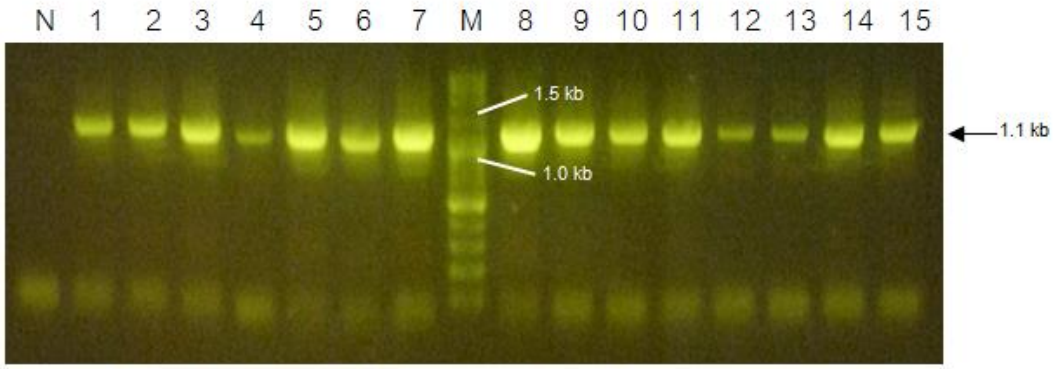
ภาพที่ 25 ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของดีลูปในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของนกยูงเขียว *P. muticus* ตรวจสอบด้วยการทำ 0.8% agarose gel electrophoresis โดยใช้ความต่างศักย์ 135 โวลต์ เป็นเวลา 20 นาที

แถบ N : Negative control

แถบที่ 1 : ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของนกยูงเขียวจากศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้ อันเนื่องมาจากพระราชดำริตัวอย่างที่ HHK42

แถบที่ 2-3 : ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของนกยูงเขียวจากเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้งตัวอย่างที่ HKK1 และ HKK3

แถบ M : 100 bp + 1.5 kb DNA ladder

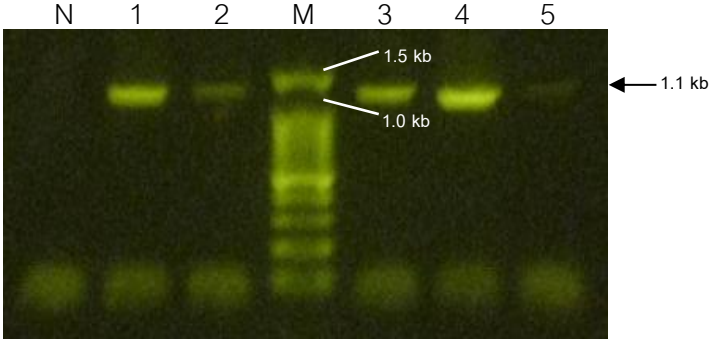


ภาพที่ 26 ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของดีลูปในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของนกยูงเขียว *P. muticus* จากเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง ตรวจสอบด้วยการทำ 0.8% agarose gel electrophoresis โดยใช้ความต่างศักย์ 135 โวลต์ เป็นเวลา 20 นาที

แถบ N : Negative control

แถบที่ 1-15 : ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของนกยูงเขียวตัวอย่างที่ HKK4, HKK5, HKK6, HKK10, HKK11, HKK12, HKK14, HKK15, HKK16, HKK17, HKK18, HKK19, HKK20, HKK21 และ HKK23 ตามลำดับ

แถบ M : 100 bp + 1.5 kb DNA ladder

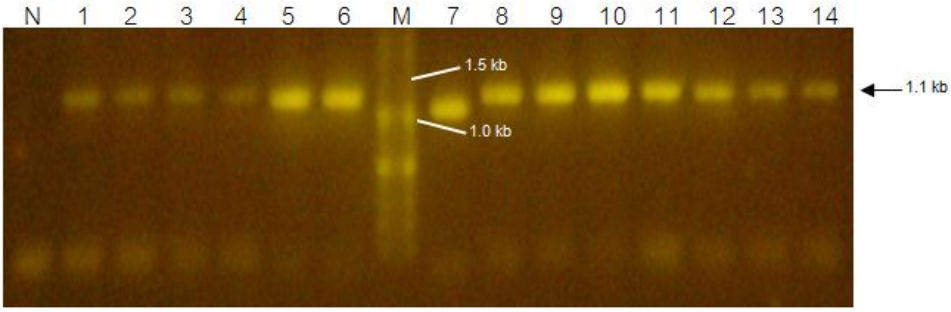


ภาพที่ 27 ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของดีลูปในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของนกยูงเขียว *P. muticus* จากเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง ตรวจสอบด้วยการทำ 0.8% agarose gel electrophoresis โดยใช้ความต่างศักย์ 135 โวลต์ เป็นเวลา 20 นาที

แถบ N : Negative control

แถบที่ 1-5 : ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของนกยูงเขียวตัวอย่างที่ HKK24, HKK26, HKK28, HKK29 และ HKK30 ตามลำดับ

แถบ M : 100 bp + 1.5 kb DNA ladder

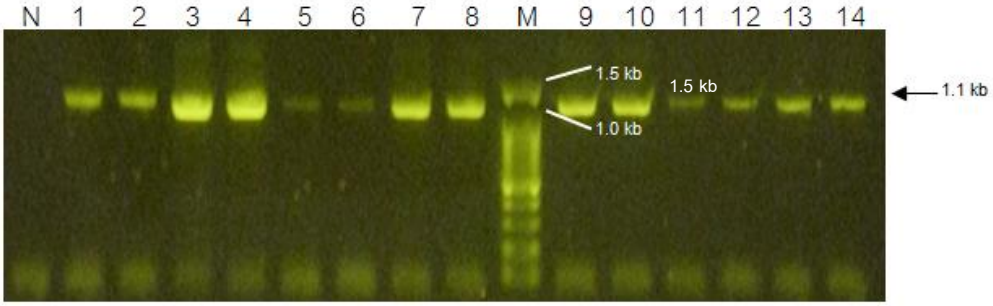


ภาพที่ 28 ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของดีลูปในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของนกยูงเขียว *P. muticus* จากเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอ ตรวจสอบด้วยการทำ 0.8% agarose gel electrophoresis โดยใช้ความต่างศักย์ 135 โวลต์ เป็นเวลา 20 นาที

แถบ N : Negative control

แถบที่ 1-14 : ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของนกยูงเขียวตัวอย่างที่ WLOJ1, WLOJ4, WLOJ5, WLOJ6, WLOJ7, WLOJ7.2, WLOJ8, WLOJ9, WLOJ9.2, WLOJ12, WLOJ18, WLOJ23, WLOJ24 และ WLOJE2 ตามลำดับ

แถบ M : 100 bp + 1.5 kb DNA ladder

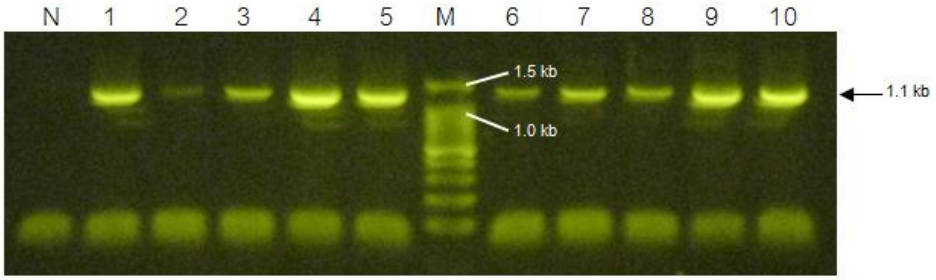


ภาพที่ 29 ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของดีลูปในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของนกยูงเขียว *P. muticus* จากเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอ ตรวจสอบด้วยการทำ 0.8% agarose gel electrophoresis โดยใช้ความต่างศักย์ 135 โวลต์ เป็นเวลา 20 นาที

แถบ N : Negative control

แถบที่ 1-14 : ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของนกยูงเขียวตัวอย่างที่ WLOV8, WLOV17, WLOV36, WLOE01, WLOE02, WLOE03, WLOE04, WLOE05, WLOE06, WLOE07, WLOJ001, WLOJ002, WLOJ003 และ WLOJ004 ตามลำดับ

แถบ M : 100 bp + 1.5 kb DNA ladder

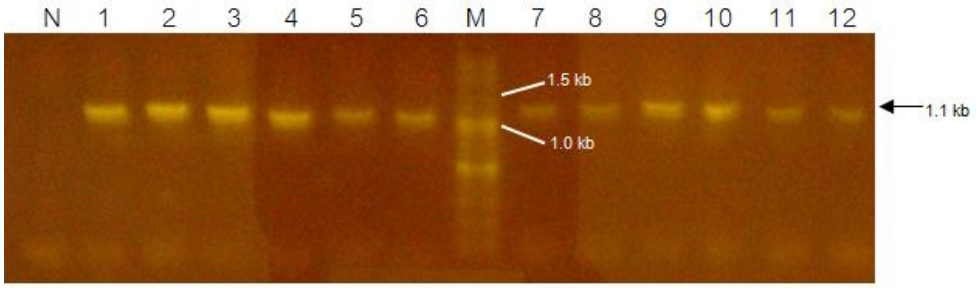


ภาพที่ 30 ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของดีลูปในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของนกยูงเขียว *P. muticus* จากเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอ ตรวจสอบด้วยการทำ 0.8% agarose gel electrophoresis โดยใช้ความต่างศักย์ 135 โวลต์ เป็นเวลา 20 นาที

แถบ N : Negative control

แถบที่ 1-10 : ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของนกยูงเขียวตัวอย่างที่ WLOJ005, WLOV006, WLOV007, WLOV008, WLOV009, WLOV010, WLOJ011, WLOJ012, WLOJ013 และ WLOJ014 ตามลำดับ

แถบ M : 100 bp + 1.5 kb DNA ladder

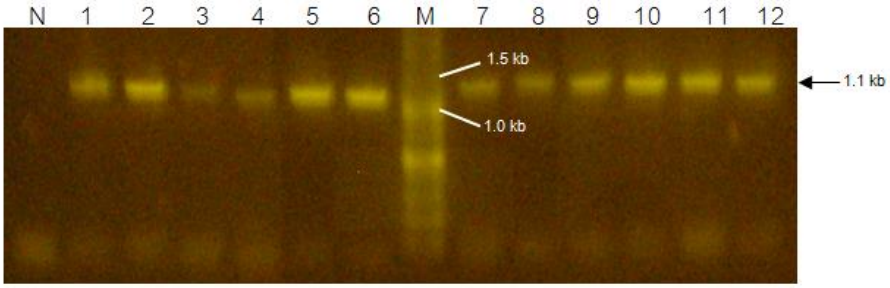


ภาพที่ 31 ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของดีลูปในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของนกยูงเขียว *P. muticus* จากเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอ ตรวจสอบด้วยการทำ 0.8% agarose gel electrophoresis โดยใช้ความต่างศักย์ 135 โวลต์ เป็นเวลา 20 นาที

แถบ N : Negative control

แถบที่ 1-12 : ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของนกยูงเขียวตัวอย่างที่ WLOJ015, WLOJ016, WLOJ017, WLOJ018, WLOJ019, WLOJ020, WLOV021, WLOV022, WLOV023, WLOV024, WLOV025 และ WLOV026 ตามลำดับ

แถบ M : 100 bp + 1.5 kb DNA ladder



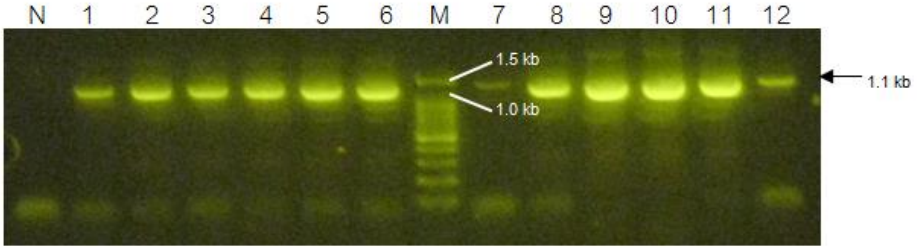
ภาพที่ 32 ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของดีลูปในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของนกยูงเขียว *P. muticus* ตรวจสอบด้วยการทำ 0.8% agarose gel electrophoresis โดยใช้ความต่างศักย์ 135 โวลต์ เป็นเวลา 20 นาที

แถบ N : Negative control

แถบที่ 1-6 : ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของนกยูงเขียวจากเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอตัวอย่างที่ WLOV027 และจากเขตห้ามล่าสัตว์ป่าทับพญาลอตัวอย่างที่ TPL1E, TPL4, TPL14, TPL28 และ TPL35 ตามลำดับ

แถบที่ 7-12 : ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของนกยูงเขียวจากเขตห้ามล่าสัตว์ป่าทับพญาลอตัวอย่างที่ TPL55, TPL58, TPL66, TPL74, TPL79 และ TPL80 ตามลำดับ

แถบ M : 100 bp + 1.5 kb DNA ladder

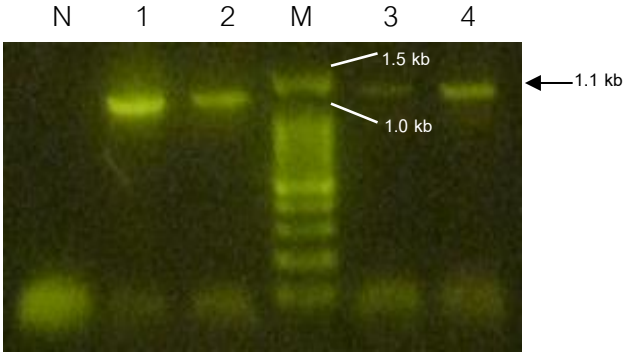


ภาพที่ 33 ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของดีลูปในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของนกยูงเขียว *P. muticus* จากเขตห้ามล่าสัตว์ป่าทับพญาลอ ตรวจสอบด้วยการทำ 0.8% agarose gel electrophoresis โดยใช้ความต่างศักย์ 135 โวลต์ เป็นเวลา 20 นาที

แถบ N : Negative control

แถบที่ 1-12 : ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของนกยูงเขียวตัวอย่างที่ TPL83, TPL84, TPL87, TPL89, TPL93, TPL105, TPL106, TPL113, TPL117, TPL001, TPL002 และ TPL003 ตามลำดับ

แถบ M : 100 bp + 1.5 kb DNA ladder



ภาพที่ 34 ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของดีลูปในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของนกยูงเขียว *P. muticus* จากเขตห้ามล่าสัตว์ป่าทับพญาลอ ตรวจสอบด้วยการทำ 0.8% agarose gel electrophoresis โดยใช้ความต่างศักย์ 135 โวลต์ เป็นเวลา 20 นาที

แถบ N : Negative control

แถบที่ 1-4 : ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของนกยูงเขียวตัวอย่างที่ TPL004, TPL005, TPL006 และ TPL007 ตามลำดับ

แถบ M : 100 bp + 1.5 kb DNA ladder

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

งานวิจัยนี้ถือได้ว่าเป็นการศึกษาครั้งแรกที่รายงานเกี่ยวกับการแปรผันทางพันธุกรรมของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณดีลูปทั้งชิ้นส่วนของประชากรนกยูงในธรรมชาติของประเทศไทย โดยไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ (PMDFU-F และ PMDFU-R) เป็น species-specific primers ที่ออกแบบมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีลูปของนกยูง *P. muticus* ที่มีข้อมูลอยู่ในฐานข้อมูลของ GenBank (Accession number: NC_012897, EU417811 และ AJ309516) โดยในการศึกษาครั้งนี้ประสบความสำเร็จในการเพิ่มปริมาณดีลูปด้วยไพร์เมอร์ดังกล่าว

การศึกษาเกี่ยวกับพันธุกรรมหรือความแปรผันทางพันธุกรรมของสัตว์มีกระดูกสันหลังโดยทั่วไปมักนิยมสกัดดีเอ็นเอจากเลือดและเนื้อเยื่อของสัตว์ (Merila et al., 1997; Niu et al., 2001; Oka et al., 2007; Roques and Negro, 2005; Silva et al., 2008; Wenink et al., 1994) แต่การศึกษานี้ผู้วิจัยประสบความสำเร็จในการสกัดดีเอ็นเอจากโคนขนนกยูงและเยื่อที่ติดกับเปลือกไข่ ซึ่งการสกัดดีเอ็นเอโดยวิธีดังกล่าวจะไม่ก่อให้เกิดเป็นอันตราย บาดเจ็บ หรือเสียชีวิตของนกยูงได้ นอกจากนี้การสกัดดีเอ็นเอจากโคนขนและเยื่อที่ติดกับเปลือกไข่ ยังให้ผลลัพธ์ของการสกัดดีเอ็นเอที่มีคุณภาพใกล้เคียงกับการสกัดดีเอ็นเอจากเลือดและเนื้อเยื่อ ดังจะสังเกตได้ว่าดีเอ็นเอที่สกัดมาสามารถนำมาเพิ่มปริมาณดีลูปได้อย่างดี และจากการตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยวิธี agarose gel electrophoresis ก็เห็นแถบเรืองแสงของดีเอ็นเอเกิดขึ้น โดยตัวอย่างที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอมีทั้งตัวอย่างใหม่และตัวอย่างเก่าที่เก็บมาแล้วเป็นเวลาหลายปี (2-5 ปี)

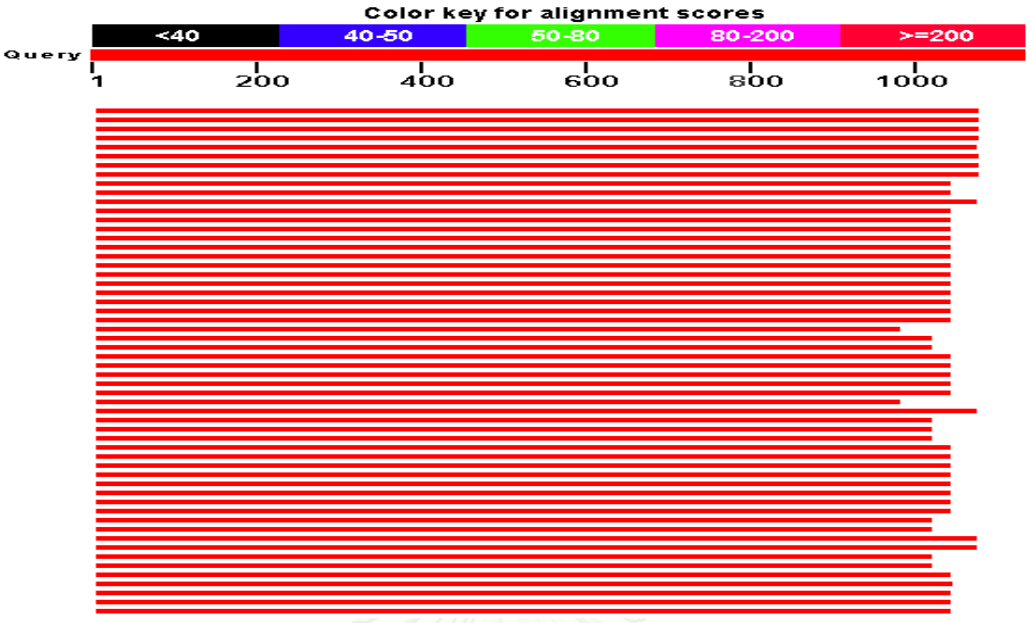
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

4.4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรม

4.4.1 ข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) ของนกยูงไทย *P. muticus* จากสภาพตามธรรมชาติใน 4 พื้นที่ศึกษา

จากผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของดีลูปในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของนกยูงไทย *P. muticus* จาก 4 พื้นที่ศึกษาในประเทศไทยทั้ง 123 ตัวอย่าง พบว่าทุกตัวอย่างให้ผล sequencing ที่ชัดเจน และไม่เกิดการซ้อนทับกันของลำดับเบส และเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูลของ NCBI โดยใช้โปรแกรม Blast พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของทุกตัวอย่าง (มากกว่า 1,000 คู่เบส) มีความเหมือน (identity) กับ complete genome ของ *P. muticus* ในฐานข้อมูลของ GenBank ถึง 98% (Accession number: NC_012897 และ EU417811) และมีความเหมือนกับ control region หรือ D-loop ของ *P. muticus* 97% (Accession number: AJ309516) (ภาพที่ 35) จากผลการศึกษาที่ได้แสดงว่าไพรเมอร์ PMDFU-F และ PMDFU-R ที่ออกแบบมาสำหรับการศึกษาครั้งนี้ สามารถเพิ่มปริมาณดีลูปในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของนกยูงไทยได้ โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มีความยาว 1,090 คู่เบส มี nucleotide composition ดังต่อไปนี้ T (31.25%), C (28.10%), A (27.71%) และ G (12.94%) มีเปอร์เซ็นต์เบส A+T เท่ากับ 58.96% และค่าเฉลี่ยของ transition/transversion (ts/tv) มีค่าเท่ากับ 9.01

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Pavo muticus mitochondrion, complete genome	1844	1844	94%	0.0	98%	gi|166066501|EU417811.1
Pavo muticus mitochondrial control region	1823	1823	94%	0.0	97%	gi|15865455|AJ309516.1
Pavo cristatus mitochondrion, complete genome	1692	1692	94%	0.0	95%	gi|558839784|KF444060.1
Pavo cristatus mitochondrial control region	1692	1692	94%	0.0	95%	gi|15865454|AJ309513.1
Afropavo congensis mitochondrial control region	1592	1592	94%	0.0	94%	gi|15865145|AJ309514.1
Rheinardia ocellata mitochondrial control region	1341	1341	94%	0.0	89%	gi|15865456|AJ309517.1
Argusianus argus mitochondrial control region	1328	1328	94%	0.0	89%	gi|15865146|AJ309515.1
Argusianus argus mitochondrion, partial genome	1323	1323	94%	0.0	89%	gi|380776830|JQ713768.1

ภาพที่ 35 ผลของการตรวจสอบเพื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลของ GenBank โดยใช้โปรแกรม Blast ผลที่ได้พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของทุกตัวอย่าง (มากกว่า 1,000 คู่เบส) มีความเหมือน (identity) กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีลูปในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของนกยูงไทย *P. muticus* ในฐานข้อมูลของ GenBank

จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาทำ Multiple sequence alignment ด้วยโปรแกรม CLUSTAL W เพื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดที่ได้และหาตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกัน ผลการวิเคราะห์พบจำนวน variable site ทั้งสิ้น 23 (2.11%) ตำแหน่ง (ตารางที่ 7) จากลำดับ นิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 1,090 คู่เบส โดยพบตำแหน่งของการเกิด mutation มากที่สุดบริเวณ Domain I รองลงมาคือบริเวณ Domain III และบริเวณ Domain II ตามลำดับ ซึ่งจากจำนวนของ variable site ทั้ง 23 ตำแหน่ง พบว่ามีจำนวนของแฮพโพลไทป์ที่แตกต่างกัน 25 แฮพโพลไทป์ โดยจำนวนของแฮพโพลไทป์ที่พบในพื้นที่ของเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอ มีจำนวน 13 แฮพโพลไทป์ รองลงมาคือเขตห้ามล่าสัตว์ป่าทับพญาลอ และเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง มีจำนวน 9 แฮพโพลไทป์ และศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้ อันเนื่องมาจากพระราชดำริ มีจำนวน 7 แฮพโพลไทป์ (ตารางที่ 8)

จากการคำนวณค่าความหลากหลายของแฮพโพลไทป์ (*hd*) และค่าความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์ (π) ด้วยโปรแกรม DnaSP พบว่านกยูงเขียวจากทั้ง 4 พื้นที่ศึกษามีค่าเฉลี่ยของ *hd* เท่ากับ 0.811 ± 0.032 และค่าของ π เท่ากับ 0.00314 ± 0.0008 โดยประชากรนกยูงจากเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้งมีค่า *hd* สูงสุด (0.827) รองลงมาคือประชากรนกยูงจากศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้ อันเนื่องมาจากพระราชดำริ (0.826), เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอ (0.802) และเขตห้ามล่าสัตว์ป่าทับพญาลอ (0.724) ตามลำดับ (ตารางที่ 8) สำหรับค่า π ของแต่ละประชากรมีค่าค่อนข้างต่ำ กล่าวคือ ประชากรนกยูงจากเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอมีค่า π สูงสุด (0.00354) รองลงมาคือประชากรนกยูงจากศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้ อันเนื่องมาจากพระราชดำริ (0.00306), เขตห้ามล่าสัตว์ป่าทับพญาลอ (0.00282) และเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง (0.00250) ตามลำดับ ซึ่งผลที่ได้จากค่า π แสดงให้เห็นว่าประชากรนกยูงไทยในประเทศไทย มีความแปรผันทางพันธุกรรมที่ต่ำ นอกจากนี้ยังพบว่าค่าเฉลี่ยของจำนวน pairwise nucleotide differences (k) ของประชากรนกยูงไทยจาก 4 พื้นที่ศึกษามีค่าเท่ากับ 3.424 (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 7 แสดงผลจากการทำ multiple sequence alignment พบจำนวนของ variable site ทั้งสิ้น 23 (2.11%) ตำแหน่ง

ตำแหน่งที่	29	43	99	100	103	123	147	148	151	152	155	166
H1	C	T	T	T	C	C	A	C	A	T	T	C
H2	C	T	T	T	C	C	A	C	A	T	T	C
H3	C	T	T	T	C	C	A	T	A	T	T	C
H4	C	T	T	T	C	C	A	A	A	T	T	C
H5	C	T	C	T	T	C	A	A	A	T	T	C
H6	C	T	C	T	C	C	A	A	A	T	T	C
H7	C	T	C	T	C	C	A	A	A	C	T	C
H8	C	T	C	T	C	C	A	A	A	T	T	C
H9	C	T	C	T	C	C	A	A	A	T	T	C
H10	T	A	C	T	C	C	A	A	A	T	T	C
H11	C	T	T	T	C	C	A	A	A	T	T	C
H12	C	T	T	T	C	T	A	A	A	T	T	C
H13	C	T	T	T	C	C	A	A	A	T	T	T
H14	C	A	T	T	C	C	A	A	A	T	T	C
H15	C	T	T	T	C	C	A	A	A	T	T	C
H16	C	T	T	T	C	C	A	A	A	T	T	C
H17	C	A	T	T	C	C	A	A	A	T	T	C
H18	C	A	T	T	C	C	A	A	A	T	T	T
H19	C	A	T	T	C	C	A	A	A	T	T	C
H20	C	A	T	T	C	C	A	A	A	T	T	C
H21	C	T	T	C	C	C	A	A	A	T	C	C
H22	C	T	T	C	C	C	A	A	A	T	C	C
H23	C	T	T	C	C	C	A	A	T	T	C	C
H24	C	A	T	C	C	C	A	A	A	T	C	C
H25	C	T	T	T	C	C	G	A	A	T	C	C

ตำแหน่งที่	171	173	186	235	238	260	312	493	790	836	1,008
H1	C	C	C	C	C	T	G	T	C	T	A
H2	C	C	C	C	C	T	G	C	C	T	A
H3	C	C	C	C	C	T	G	C	C	T	A
H4	C	C	C	T	C	T	G	C	C	T	A
H5	C	C	C	T	C	T	G	C	C	T	A
H6	C	C	C	T	C	T	G	C	C	T	A
H7	C	C	C	T	C	T	G	C	C	T	A
H8	T	C	C	T	C	T	G	C	C	T	A
H9	T	C	C	T	C	T	G	C	C	T	A
H10	T	C	C	T	C	T	G	C	C	T	A
H11	C	T	C	C	C	T	G	T	C	T	A
H12	C	T	C	C	C	T	G	T	C	T	A
H13	C	C	C	C	C	T	G	T	C	T	A
H14	C	C	C	C	C	T	G	T	C	T	A
H15	C	C	C	C	C	T	G	T	C	T	T
H16	C	C	C	C	C	T	G	T	C	T	T
H17	C	C	C	C	T	T	G	T	C	T	A
H18	C	C	C	C	C	T	G	T	C	T	T
H19	C	C	C	C	C	T	G	C	C	T	A
H20	C	C	C	C	C	T	G	C	C	T	T
H21	C	C	C	C	C	T	G	T	C	T	A
H22	C	C	C	C	C	T	A	T	T	T	A
H23	C	C	C	C	C	T	A	T	T	T	A
H24	C	C	C	C	C	T	A	T	T	T	A
H25	C	T	T	C	C	C	G	C	C	C	A

ตารางที่ 8 ค่าความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) ของนกยูงไทย *P. muticus* ในสภาพตามธรรมชาติจาก 4 พื้นที่ของประเทศไทย ตัวอักษรย่อที่ใช้แสดงในตารางคือ n = จำนวนตัวอย่าง, v = จำนวนของ variable site, h = จำนวนของแฮพโพลไทป์, k = ค่าเฉลี่ยของจำนวน pairwise nucleotide differences, *hd* = haplotype diversity และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (±S.D.) และ π = nucleotide diversity และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (±S.D.) แฮพโพลไทป์ที่ขีดเส้นใต้แสดงถึงแฮพโพลไทป์ที่มีร่วมกันมากกว่าหนึ่งพื้นที่ศึกษา (shared haplotype)

พื้นที่เก็บตัวอย่าง	Haplotype	*P. muticus*					
		n	v	h	k	*hd* ± S.D.	π ± S.D.
HHK	H1, H2, H4, H8, H14, H21, H25	27	12	7	3.333	0.826 ± 0.043	0.00306 ± 0.0008
WLO	H1, H2, H3, H9, H12, H15, H16, H19, H20, H22, H23, H24, H25	47	19	13	3.856	0.802 ± 0.048	0.00354 ± 0.0009
TPL	H1, H2, H4, H9, H10, H14, H15, H19, H25	27	13	9	3.071	0.724 ± 0.088	0.00282 ± 0.0009
HKK	H1, H5, H6, H7, H11, H13, H14, H17, H18	22	10	9	2.719	0.827 ± 0.061	0.00250 ± 0.0008
All populations		123	23	25	3.424	0.811 ± 0.032	0.00314 ± 0.0008

ผลการหาค่าระยะห่างทางพันธุกรรม หรือ genetic distance ด้วยโปรแกรม MEGA พบว่าระหว่างประชากรของนกยูงไทย มีค่า genetic distance อยู่ระหว่าง 0.000-0.009 ส่วนค่า genetic distance ภายในกลุ่มประชากร มีค่าดังต่อไปนี้ เขตห้ามล่าสัตว์ป่าทับพญาลอ 0.000-0.010, เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอ และเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง 0.000-0.009 และศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้ อันเนื่องมาจากพระราชดำริ 0.000-0.008 (ตารางที่ 9)

ตารางที่ 9 ค่าระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) ระหว่างและภายในกลุ่มประชากรของนกยูงไทยหรือนกยูงเขียว *P. muticus* ในแต่ละพื้นที่ศึกษา

พื้นที่ศึกษา	**ค่าระยะห่างทางพันธุกรรม** (genetic distance)			
	HHK	WLO	TPL	HKK
HHK	0.000-0.008			
WLO	0.000-0.009	0.000-0.009		
TPL	0.000-0.010	0.000-0.009	0.000-0.010	
HKK	0.000-0.009	0.000-0.009	0.000-0.009	0.000-0.009
Among populations	0.000-0.009			

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

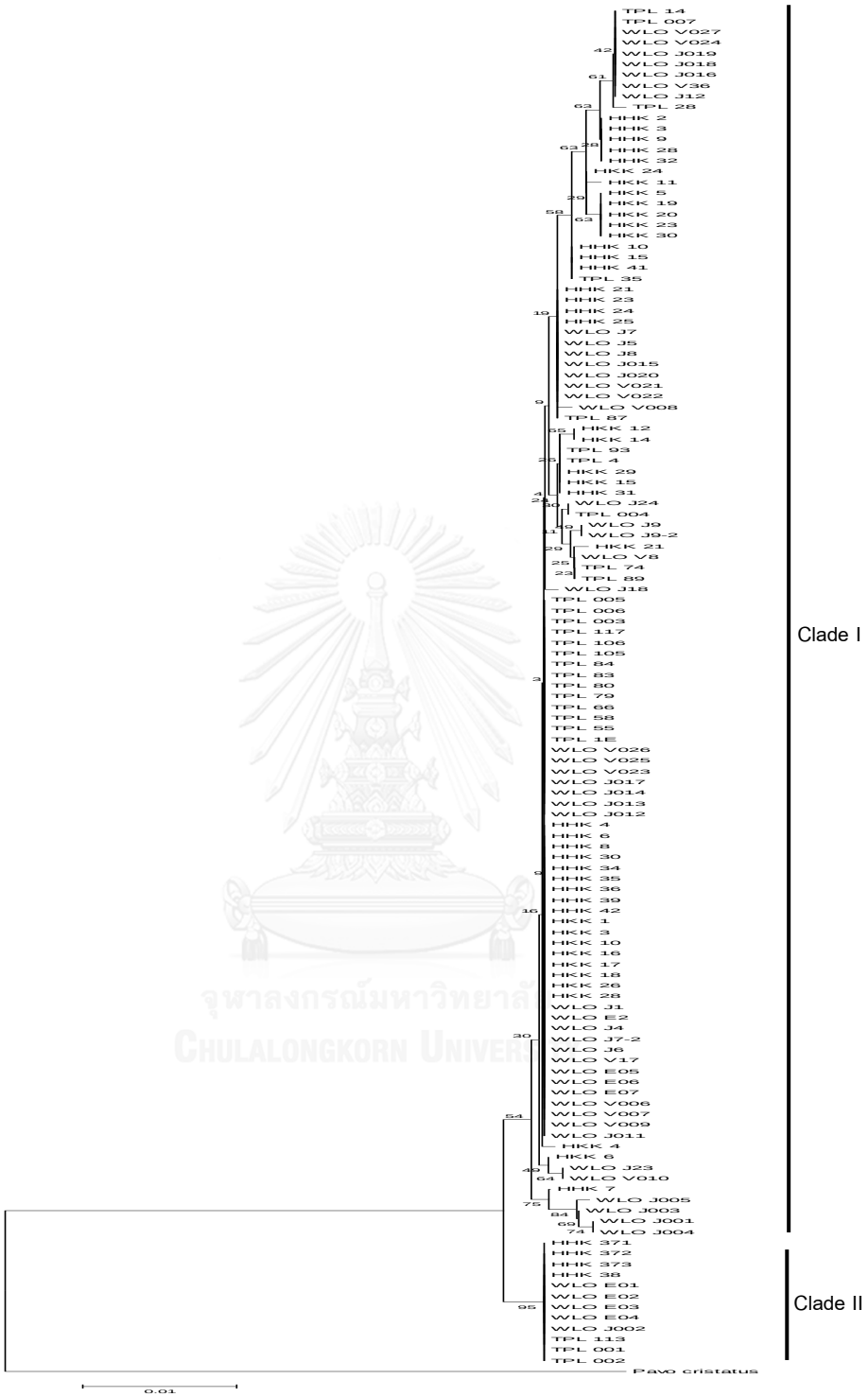
จากการวิเคราะห์ข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรมของลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีลูปในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของนกยูงไทย *P. muticus* จาก 4 พื้นที่ศึกษาในประเทศไทยทั้ง 123 ตัวอย่าง ซึ่งมีความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวน 1,090 คู่เบส พบว่าค่าความหลากหลายของแฮพโพลไทป์ (*hd*) มีค่าค่อนข้างสูง (0.811±0.032) ในทางกลับกันค่าความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์ (π) ของแต่ละประชากรมีค่าค่อนข้างต่ำ (0.00314±0.00080) รวมทั้งค่าระยะห่างทางพันธุกรรมภายในกลุ่มประชากรเดียวกันและระหว่างกลุ่มประชากรมีค่าที่ต่ำ (0.000-0.009) จากผลที่ได้แสดงให้เห็นว่านกยูงจากแต่ละพื้นที่มีความแปรผันทางพันธุกรรมที่ต่ำ โดยในการศึกษาครั้งนี้พบจำนวนของ variable site ทั้งสิ้น 23 (2.11%) ตำแหน่ง ถึงแม้ว่าการศึกษาครั้งนี้จะมีความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มากกว่าการศึกษาก่อนหน้านี้ แต่ผลที่ได้ยังคงพบว่าประชากรนกยูงไทยทางภาคเหนือและภาคตะวันตกมีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมค่อนข้างต่ำ ซึ่งผลที่ได้นี้สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ ((Noonpanichphong, 2011; Plubcharoensook, 2000) ซึ่งผลที่ได้ใกล้เคียงกับงานวิจัยของ Niu และคณะ ในปี ค.ศ. 2001 ซึ่งได้ศึกษาต้นกำเนิดและความหลากหลายทางพันธุกรรมของสายพันธุ์ไก่พื้นเมืองในประเทศจีน ด้วยวิธีการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีลูปในไมโทคอนเดรียล ที่มีความยาว 539 คู่เบส อยู่ระหว่าง domain I และ domain II มี variable site ทั้งหมด 23 (4.27%) ตำแหน่ง ผลการศึกษาที่ได้ พบว่าไก่พื้นเมืองในประเทศจีนมีความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ต่ำ และอาจจะมีต้นกำเนิดมาจากไก่ป่า (red junglefowl) จากประเทศไทย (Niu et al., 2001) และเมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาทางด้านพันธุกรรมของนกยูงไทยในธรรมชาติที่เคยมีรายงานมาก่อนหน้านี้ ได้แก่ การศึกษาของ ภัทรา พลับเจริญสุข ซึ่งได้ศึกษาการแปรผันทางพันธุกรรมของนกยูงไทยในภาคเหนือ โดยวิเคราะห์จากลำดับดีเอ็นเอบางส่วนของดีลูป ที่ความยาวประมาณ 330 คู่เบส บริเวณ domain I พบว่ามี variable site ทั้งหมด 26 (7.88%) ตำแหน่ง (Plubcharoensook, 2000) และการศึกษาของ ณัฐนรี หนุนพาณิชพงศ์ ที่ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับแปรผันทางพันธุกรรมของดีลูปบางส่วนของนกยูงไทยทางภาคเหนือและ ภาคตะวันตกของประเทศไทย โดยลำดับเบสที่ศึกษามีความยาวประมาณ 593 คู่เบส อยู่ระหว่าง domain I และ domain II มี variable site ทั้งหมด 2 (0.34%) จากผลที่ได้พบความแปรผันทางพันธุกรรมน้อยมาก อาจเนื่องมาจากไพร์เมอร์ที่ใช้ครอบคลุมส่วนของ domain II ซึ่งเป็น conserved region (Noonpanichphong, 2011)

นอกจากนี้เมื่อนำผลการศึกษาที่ได้ไปเปรียบเทียบกับผลการศึกษาของ Silva และคณะ ที่ได้ทำการศึกษาการแปรผันทางพันธุกรรมของลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีลูปในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของไก่ป่า *Gallus lafayetti* ที่มีความยาว 675 คู่เบส อยู่ระหว่าง domain I และ domain II พบว่าประชากรไก่ป่ามีค่า *hd* เท่ากับ 0.901 ถึง 0.965 และค่า π เท่ากับ 0.01100 ถึง 0.01300 (Silva et al., 2008) ซึ่งค่าที่ได้นั้นสูงกว่าค่าที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ และเมื่อเปรียบเทียบกับผลการศึกษาของ Oka และคณะ ที่ได้ศึกษาการแปรผันทางพันธุกรรมของลำดับโดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีลูปในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของไก่ป่าพันธุ์พื้นเมืองจากประเทศญี่ปุ่น ที่มีความยาว 1,232 คู่เบส ซึ่งครอบคลุม domain I, II และ III พบว่ามีค่า π เท่ากับ 0.00102 ถึง 0.00162 (Oka et al., 2007) ซึ่งมีค่าน้อยกว่าการศึกษาประชากรนกยูงไทยจากประเทศไทยในครั้งนี้

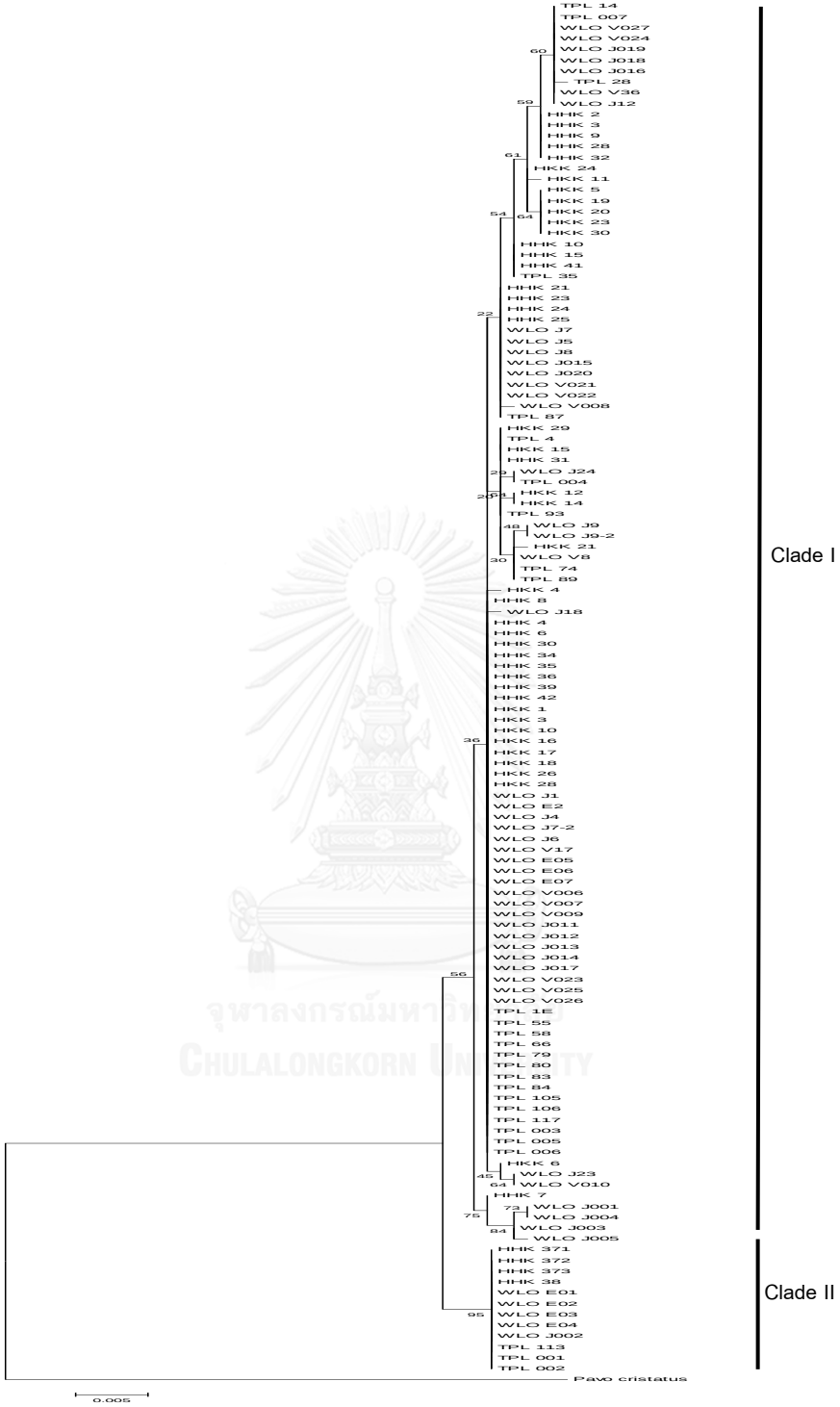
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

4.4.2 ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของนกยูงไทย *P. muticus* ในสภาพธรรมชาติจากพื้นที่ต่างๆ ในประเทศไทย

จากแผนภูมิแสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของนกยูงไทย *P. muticus* ที่สร้างโดยวิธี Neighbor-joining และ Maximum likelihood (ภาพที่ 36 และ 37) และคำนวณค่า bootstrap ทั้งหมด 1,000 ครั้ง โดยวิเคราะห์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีลูปในไมโทคอนเดรียล ดีเอ็นเอที่มีความยาว 1,090 คู่เบส และได้ใช้นกยูงอินเดีย (*Pavo cristatus*) เป็น outgroup ในการศึกษาครั้งนี้ ผลการศึกษาพบว่า phylogenetic tree ที่สร้างโดยทั้ง 2 วิธี แสดงผลที่สอดคล้องกัน และมี tree topology ที่คล้ายคลึงกัน กล่าวคือ พบว่าประชากรนกยูงไทย จากทั้ง 4 พื้นที่คือ ศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้ อันเนื่องมาจากพระราชดำริ, เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอ, เขตห้ามล่าสัตว์ป่าทับพญาลอ และเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง ยังไม่สามารถแยกออกจากกันได้อย่างชัดเจนตามพื้นที่ของการกระจายตัว หรืออาจกล่าวได้ว่าประชากรนกยูงในประเทศไทย ยังมีความแตกต่างทางพันธุกรรมของดีลูปในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอไม่มากพอที่จะแยกออกจากกันเป็นกลุ่มย่อยตามพื้นที่การกระจายตัว จาก phylogenetic tree ที่ได้ สามารถแบ่งออกเป็น 2 เคลด (clade) ใหญ่ๆ ด้วยกัน ได้แก่ clade ที่ 1 ประกอบด้วยนกยูงไทยจากเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้งทั้งหมด (จำนวน 22 ตัวอย่าง) และนกยูงจากศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้ อันเนื่องมาจากพระราชดำริ, เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอ และเขตห้ามล่าสัตว์ป่าทับพญาลอ จำนวน 23, 42 และ 24 ตัวอย่าง ตามลำดับ สำหรับ clade ที่ 2 ประกอบด้วยนกยูงไทยจากสามพื้นที่ศึกษาทางภาคเหนือของประเทศไทยเท่านั้นคือ ศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้ อันเนื่องมาจากพระราชดำริ, เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอ และเขตห้ามล่าสัตว์ป่าทับพญาลอ จำนวน 4, 5 และ 3 ตัวอย่าง ตามลำดับ



ภาพที่ 36 ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของนกยูงไทย โดยวิเคราะห์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความยาว 1,090 คู่เบส ที่สร้างโดยวิธี Neighbor-joining ที่ bootstrap probabilities 1,000 ซ้ำ โดยมี *P. cristatus* (นกยูงอินเดีย) เป็น outgroup



ภาพที่ 37 ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของนกยูงไทย โดยวิเคราะห์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความยาว 1,090 คู่เบส ที่สร้างโดยวิธี Maximum likelihood ที่ bootstrap probabilities 1,000 ซ้ำ โดยมี *P. cristatus* (นกยูงอินเดีย) เป็น outgroup

4.4.3 ผลการวิเคราะห์ mtDNA haplotype network ของนกยูงไทย *P. muticus* ในสภาพธรรมชาติจากพื้นที่ต่างๆ ในประเทศไทย

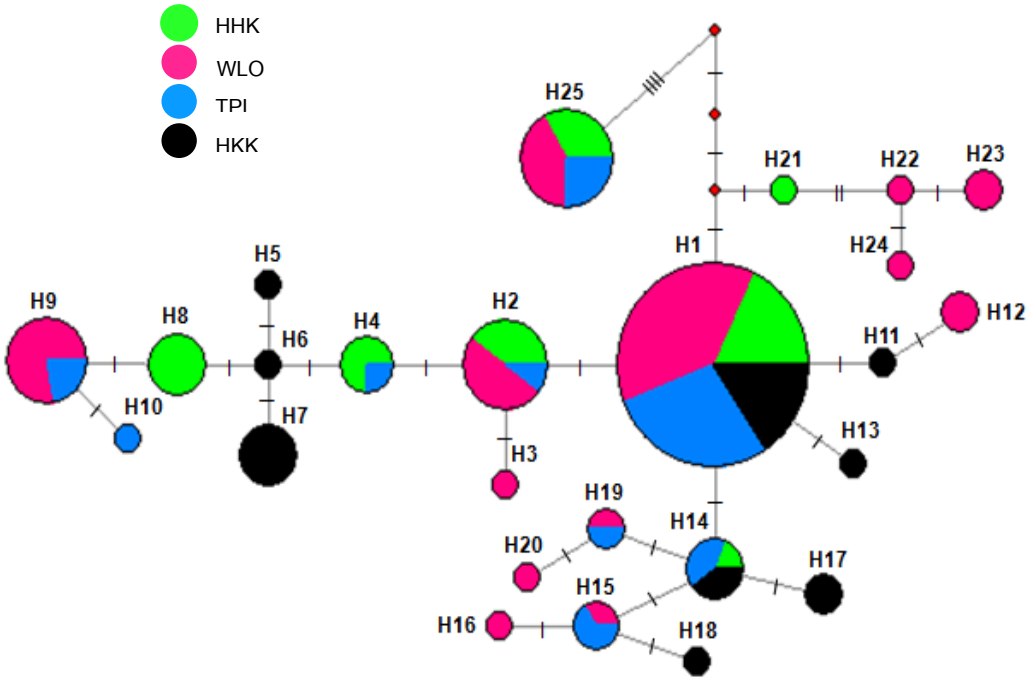
เนื่องจากประชากรนกยูงไทยในประเทศไทยมีความใกล้ชิดกันมาก และมีความแปรผันทางพันธุกรรมที่ต่ำ ทำให้การวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ โดยการสร้าง phylogenetic tree นั้น ให้ผลการวิเคราะห์ที่ไม่ชัดเจนมากพอ ดังนั้นเพื่อให้ได้ผลที่เห็นภาพละเอียดชัดเจนยิ่งขึ้น ผู้วิจัยจึงทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของแต่ละแฮพโพลไทป์ โดยการสร้าง reduce median mtDNA haplotype network (ภาพที่ 38) ผลการศึกษาพบจำนวนแฮพโพลไทป์ที่แตกต่างกัน 25 แฮพโพลไทป์ คือ H1-H25 (ตารางที่ 10) ซึ่ง H1 และ H25 มีความแตกต่างกันมากที่สุดจำนวน 7 เบส H1 เป็นแฮพโพลไทป์ที่มีความถี่ (haplotype frequency) มากที่สุดถึง 40.65% ซึ่งประกอบไปด้วยนกยูงไทยจำนวน 50 ตัวอย่างจาก 123 ตัวอย่าง (ตารางที่ 11) ที่มาจากทุกพื้นที่การศึกษา ดังนั้นจึงจัดว่า H1 เป็น common haplotype รองลงมาคือ H25 (9.76%) และ H2 (8.13%) ประกอบไปด้วยจำนวนตัวอย่าง 12 และ 10 ตัวอย่าง ที่มาจากสามพื้นที่ศึกษาทางภาคเหนือเท่านั้น

นอกจากนี้ยังพบว่ามีแฮพโพลไทป์จำนวน 3 แฮพโพลไทป์ที่สามารถพบได้ในสามพื้นที่ศึกษา (shared haplotype) คือ H2, H14 และ H25 โดยที่ H2 และ H25 เป็นแฮพโพลไทป์ที่พบได้เฉพาะในพื้นที่ศึกษาทางภาคเหนือเท่านั้น ได้แก่ ศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้อันเนื่องมาจากพระราชดำริ, เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอ และเขตห้ามล่าสัตว์ป่าทับพญาลอ ส่วน H14 เป็นแฮพโพลไทป์ที่พบได้ทั้งในพื้นที่ศึกษาทางภาคเหนือและภาคตะวันตก ได้แก่ ศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้ อันเนื่องมาจากพระราชดำริ, เขตห้ามล่าสัตว์ป่าทับพญาลอ และเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง นอกจากนี้ยังพบว่ามีแฮพโพลไทป์จำนวน 4 แฮพโพลไทป์ ที่สามารถพบได้ในสองพื้นที่ศึกษาทางภาคเหนือ คือ H4, H9, H15 และ H19 โดยที่ H4 เป็นแฮพโพลไทป์ที่พบในพื้นที่ของศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้ อันเนื่องมาจากพระราชดำริ และเขตห้ามล่าสัตว์ป่าทับพญาลอ ส่วน H9, H15 และ H19 เป็นแฮพโพลไทป์ที่พบในพื้นที่ของเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอ และเขตห้ามล่าสัตว์ป่าทับพญาลอ โดยทั้งสองพื้นที่ดังกล่าวมีบริเวณที่เกือบติดต่อกัน ซึ่งมีระยะทางห่างกันประมาณ 1.5 กิโลเมตร

นอกจาก shared haplotype ที่พบได้มากกว่า 1 พื้นที่ศึกษาแล้ว ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยยังพบแฮพโพลไทป์ที่พบได้เฉพาะในพื้นที่นั้นๆ โดยที่จะไม่พบในพื้นที่อื่นๆ (unique haplotype) จำนวน 17 แฮพโพลไทป์ ได้แก่ ในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอ จำนวน 7 แฮพโพลไทป์ (H3, H12, H16, H20, H22, H23, H24) เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง จำนวน 7 แฮพโพลไทป์

(H5, H6, H7, H11, H13, H17, H18) ในศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้ อันเนื่องมาจากพระราชดำริ จำนวน 2 แฮพโพลไทป์ (H8 และ H21) และในเขตห้ามล่าสัตว์ป่าทับพญาลอ จำนวน 1 แฮพโพลไทป์ (H10) ทั้งนี้เมื่อพิจารณาผลการศึกษาทั้งหมดจะเห็นได้ว่าในพื้นที่ศึกษาทางภาคเหนือจะพบ shared haplotype มากกว่าพื้นที่ทางภาคตะวันตก ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่าประชากรนกยูงทางภาคตะวันตกเริ่มมีความแปรผันทางพันธุกรรมที่แตกต่างจากประชากรนกยูงทางภาคเหนือ แต่ความแตกต่างดังกล่าวยังไม่มากพอที่จะแยกประชากรจากทั้งสองภูมิภาคออกจากกันเป็นสองประชากรย่อย คือประชากรย่อยทางภาคเหนือและประชากรย่อยทางภาคตะวันตกได้ เนื่องจากพบว่า H1 และ H14 เป็น shared haplotype ที่พบได้ในพื้นที่ทางภาคเหนือและภาคตะวันตก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



ภาพที่ 38 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างแฮพโพลไทป์ของนกยูงไทย *P. muticus* จาก 4 พื้นที่ศึกษาในประเทศไทย โดยการสร้าง reduce median mtDNA haplotype network โดยวงกลมแต่ละวงแสดงถึงแฮพโพลไทป์ที่แตกต่างกัน ขนาดของวงกลม แสดงถึงจำนวนตัวอย่างที่พบในแฮพโพลไทป์นั้นๆ สีทั้งสี่สี ได้แก่ สีเขียว หมายถึง ตัวอย่างจากศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้ อันเนื่องมาจากพระราชดำริ (HHK) สีชมพู หมายถึง ตัวอย่างจากเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอ (WLO) สีฟ้า หมายถึง ตัวอย่างจากเขตห้ามล่าสัตว์ป่าทับพญาลอ (TPL) และสีดำ หมายถึง ตัวอย่างจากเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง (HKK) เส้นขีดบนเส้นเชื่อมระหว่างแฮพโพลไทป์ คือ จำนวนการเกิด mutation

ตารางที่ 10 ข้อมูลต่างๆ ของแฮพโพลไทป์จำนวน 25 แฮพโพลไทป์ (H1-H25) ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ ได้แก่ จำนวนตัวอย่างที่พบแฮพโพลไทป์ในแต่ละพื้นที่ศึกษา และความถี่ของแต่ละแฮพโพลไทป์จากจำนวนตัวอย่างในแต่ละแฮพโพลไทป์นั้นๆ เทียบกับจำนวนตัวอย่างทั้งหมด 123 ตัวอย่าง

Haplotype	จำนวนตัวอย่าง				Frequency
	HHK	WLO	TPL	HKK	
H1	9	19	14	8	0.4065
H2	4	5	1	-	0.0813
H3	-	1	-	-	0.0081
H4	3	-	1	-	0.0325
H5	-	-	-	1	0.0081
H6	-	-	-	1	0.0081
H7	-	-	-	5	0.0407
H8	5	-	-	-	0.0407
H9	-	7	2	-	0.0732
H10	-	-	1	-	0.0081
H11	-	-	-	1	0.0081
H12	-	2	-	-	0.0163
H13	-	-	-	1	0.0081
H14	1	-	2	2	0.0407
H15	-	1	2	-	0.0244
H16	-	1	-	-	0.0081
H17	-	-	-	2	0.0163
H18	-	-	-	1	0.0081
H19	-	1	1	-	0.0163
H20	-	1	-	-	0.0081
H21	1	-	-	-	0.0081
H22	-	1	-	-	0.0081
H23	-	2	-	-	0.0163
H24	-	1	-	-	0.0081
H25	4	5	3	-	0.0976
รวม	27	47	27	22	1.000

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 11 จำนวนตัวอย่างและรายชื่อตัวอย่างของนกยูงไทย *P. muticus* ในสภาพตามธรรมชาติของประเทศไทยที่พบในแต่ละแฮพโพลไทป์ จากจำนวนตัวอย่างที่ศึกษาทั้งหมด 123 ตัวอย่าง

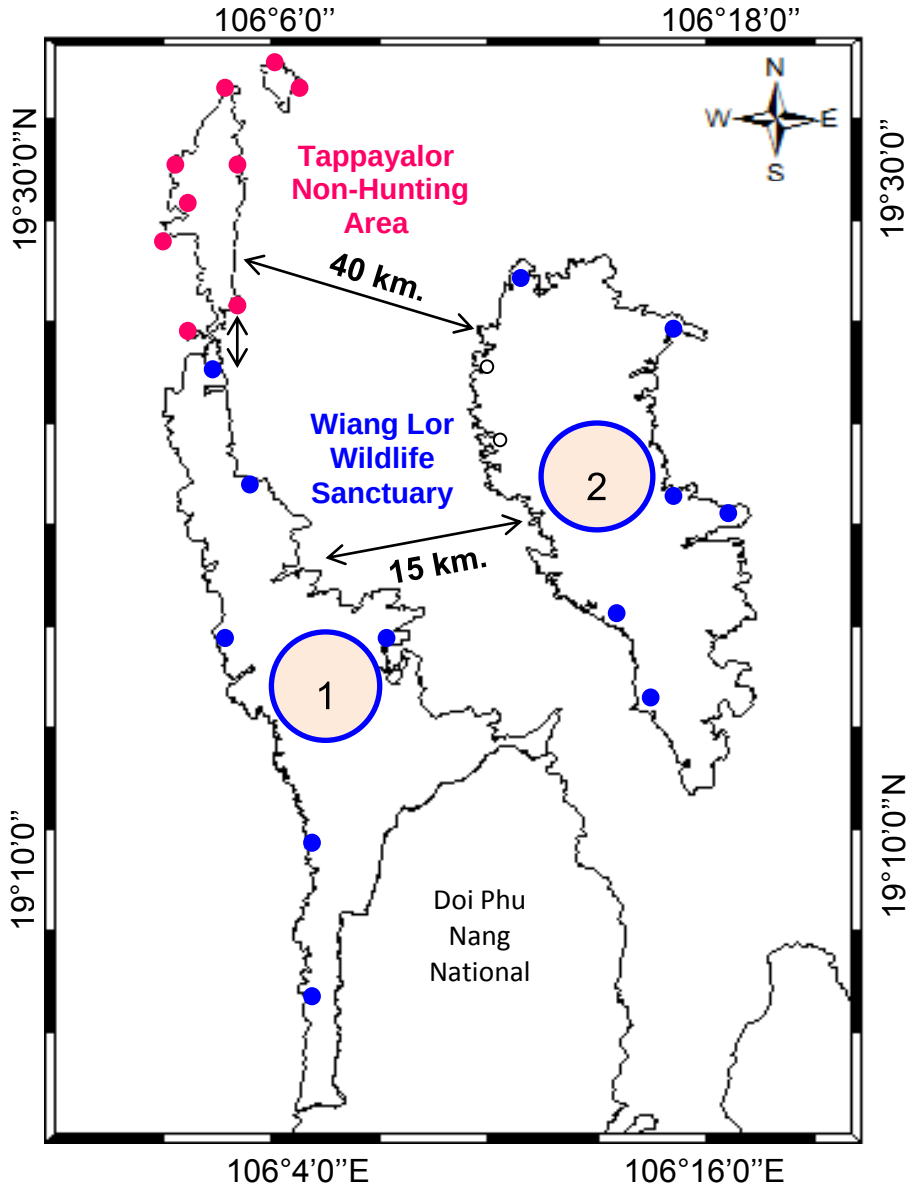
Haplotype	จำนวนตัวอย่าง	ชื่อของตัวอย่าง
H1	50	HHK4, HHK6, HHK8, HHK30, HHK34, HHK35, HHK36, HHK39, HHK42, WLOJ1, WLOE2, WLOJ4, WLOJ6, WLOE05, WLOE06, WLOE07, WLOJ011, WLOJ012, WLOJ013, WLOJ014, WLOJ017, WLOV17, WLOV006, WLOV007, WLOV009, WLOV023, WLOV025, WLOV026, TPL1E, TPL55, TPL58, TPL66, TPL79, TPL80, TPL83, TPL84, TPL105, TPL106, TPL117, TPL003, TPL005, TPL006, HKK1, HKK3, HKK10, HKK16, HKK17, HKK18, HKK26, HKK28
H2	10	HHK21, HHK23, HHK24, HHK25, WLOJ5, WLOJ015, WLOJ020, WLOV021, WLOV022, TPL87
H3	1	WLOV008
H4	4	HHK10, HHK15, HHK41, TPL35
H5	1	HKK11
H6	1	HKK24
H7	5	HKK5, Hkk19, HKK20, HKK23, HKK30
H8	5	HHK2, HHK3, HHK9, HHK28, HHK32
H9	9	WLOJ12, WLOJ016, WLOJ18, WLOJ19, WLOV36, WLOV24, WLOV27, TPL14, TPL007
H10	1	TPL28
H11	1	HKK6
H12	2	WLOJ23, WLOV010
H13	1	HKK4
H14	5	HHK31, TPL4, TPL93, HKK15, HKK29
H15	3	WLOV8, TPL74, TPL89
H16	1	WLOJ18
H17	2	HKK12, HKK14
H18	1	HKK21
H19	2	WLOJ24, TPL004
H20	1	WLOJ9
H21	1	HHK7
H22	1	WLOJ003
H23	2	WLOJ001, WLOJ004
H24	1	WLOJ005
H25	12	HHK371, HHK372, HHK373, HHK38, WLOE01, WLOE02, WLOE03, WLOE04, WLOJ002, TPL113, TPL001, TPL002

4.4.4 ผลการวิเคราะห์ mtDNA haplotype network ของนกยูงไทย *P. muticus* ในพื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอ และเขตห้ามล่าสัตว์ป่าทับพญาลอ

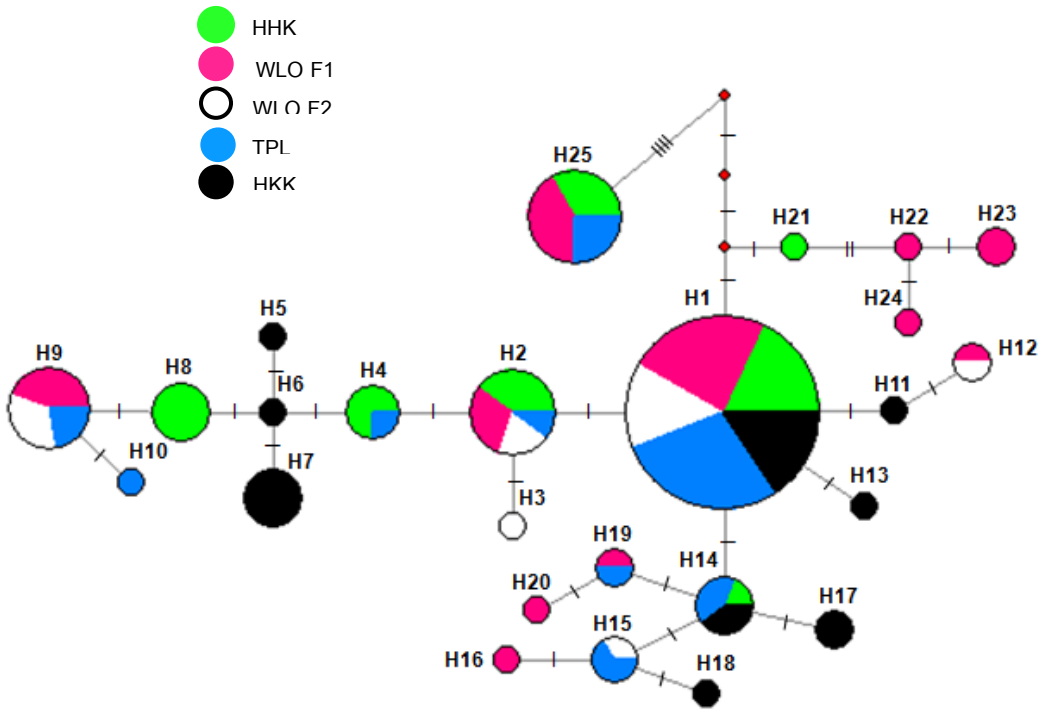
เนื่องจากพื้นที่ของเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอนั้นแบ่งออกเป็น 2 fragment ที่แยกออกจากกัน โดย fragment ที่ 1 มีอาณาเขตเกือบติดต่อกับพื้นที่ของเขตห้ามล่าสัตว์ป่าทับพญาลอ ซึ่งห่างกันประมาณ 1.5 กิโลเมตร และห่างจาก fragment ที่ 2 ประมาณ 15 กิโลเมตร โดย fragment ที่ 2 ห่างจากเขตห้ามล่าสัตว์ป่าทับพญาลอประมาณ 40 กิโลเมตร (ภาพที่ 39) จากลักษณะทางภูมิศาสตร์ดังกล่าว ผู้วิจัยจึงได้ตั้งสมมติฐานว่าประชากรนกยูงไทยจากทั้ง 2 fragment ในพื้นที่ของเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอไม่สามารถที่จะ migrate ถึงกันได้ เนื่องจากห่างกันค่อนข้างมาก และนอกจากนี้ยังมี barrier ที่เป็นชุมชนหรือถนนมากั้นและไม่ได้เป็นพื้นที่ป่าติดต่อกัน ดังนั้นในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอ fragment ที่ 2 น่าจะพบ unique haplotype มากกว่า fragment ที่ 1 เนื่องจาก fragment ที่ 1 มีพื้นที่เกือบติดต่อกับเขตห้ามล่าสัตว์ป่าทับพญาลอ ดังนั้นนกยูงเขียวจากทั้งสองพื้นที่น่าจะสามารถ migrate ถึงกันได้ ดังนั้นเพื่อทดสอบสมมติฐานดังกล่าว ผู้วิจัยจึงได้ทำการวิเคราะห์ผลของ mtDNA haplotype network เพิ่มเติมโดยได้แบ่งพื้นที่ของเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอออกเป็น 2 fragment ผลการศึกษาพบว่า นกยูงจากทั้งสอง fragment มีแฮพโพลไทป์ร่วมกัน จำนวน 4 แฮพโพลไทป์ คือ H1, H2, H9 และ H12 เมื่อทำการเปรียบเทียบต่างพื้นที่กัน คือ เขตห้ามล่าสัตว์ป่าทับพญาลอและเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอ fragment ที่ 1 มีแฮพโพลไทป์ร่วมกัน จำนวน 5 แฮพโพลไทป์ คือ H1, H2, H9, H19และ H25 แต่อย่างไรก็ดีพบว่าเขตห้ามล่าสัตว์ป่าทับพญาลอและเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอ fragment ที่ 2 มีแฮพโพลไทป์ร่วมกัน จำนวน 4 แฮพโพลไทป์เท่านั้น คือ H1, H2, H9 และ H15 (ภาพที่ 40) ทั้งนี้ผลการศึกษาที่ได้สอดคล้องกับสมมติฐานที่ตั้งไว้ กล่าวคือผลที่ได้จาก haplotype distribution (ภาพที่ 41) พบว่าเมื่อทำการเปรียบเทียบต่างพื้นที่กัน ประชากรนกยูงจากเขตห้ามล่าสัตว์ป่าทับพญาลอและเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอ fragment ที่ 1 มีแฮพโพลไทป์ร่วมกันมากกว่าพื้นที่ของเขตห้ามล่าสัตว์ป่าทับพญาลอและเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอ fragment ที่ 2 ซึ่งโดยภาพรวมนั้นพบว่านกยูงส่วนใหญ่จากทั้งสามพื้นที่มียังแฮพโพลไทป์ร่วมกัน ซึ่งจากผลการศึกษาที่ได้อาจจะอธิบายได้ 2 สาเหตุ คือ ประเด็นที่หนึ่งนกยูงจากทั้งสามพื้นที่สามารถ migrate ถึงกันได้ จึงสามารถพบแฮพโพลไทป์ที่ shared ร่วมกัน ส่วนประเด็นที่สอง คือ นกยูงจากทั้งสามพื้นที่อาจได้ไม่ migrate ระหว่างพื้นที่ แต่เป็นนกยูงที่มาจากกลุ่มประชากรเดียวกันในอดีต ที่ยังสามารถรักษาหรือคงไว้ซึ่ง (keep) แฮพโพลไทป์ดั้งเดิมของบรรพบุรุษไว้ได้ โดยที่ในขั้นตอนของการเก็บตัวอย่างนั้น หากตำแหน่งใดเก็บตัวอย่างเส้นขนนกยูงได้มาก พบว่า

สามารถพบแฮพโพลไทป์ได้มากเช่นกัน ดังเช่นในการเก็บตัวอย่างครั้งที่ 1 ได้เก็บตัวอย่างเส้นขนในแต่ละตำแหน่งเป็นจำนวนมาก เมื่อทำการตรวจสอบความแตกต่างของแฮพโพลไทป์เพิ่มเติมก็สามารถพบแฮพโพลไทป์ที่แตกต่างจากหลักเกณฑ์ทั้งการจำแนกและการระบุจำนวนของตัวอย่างในการศึกษาครั้งนี้

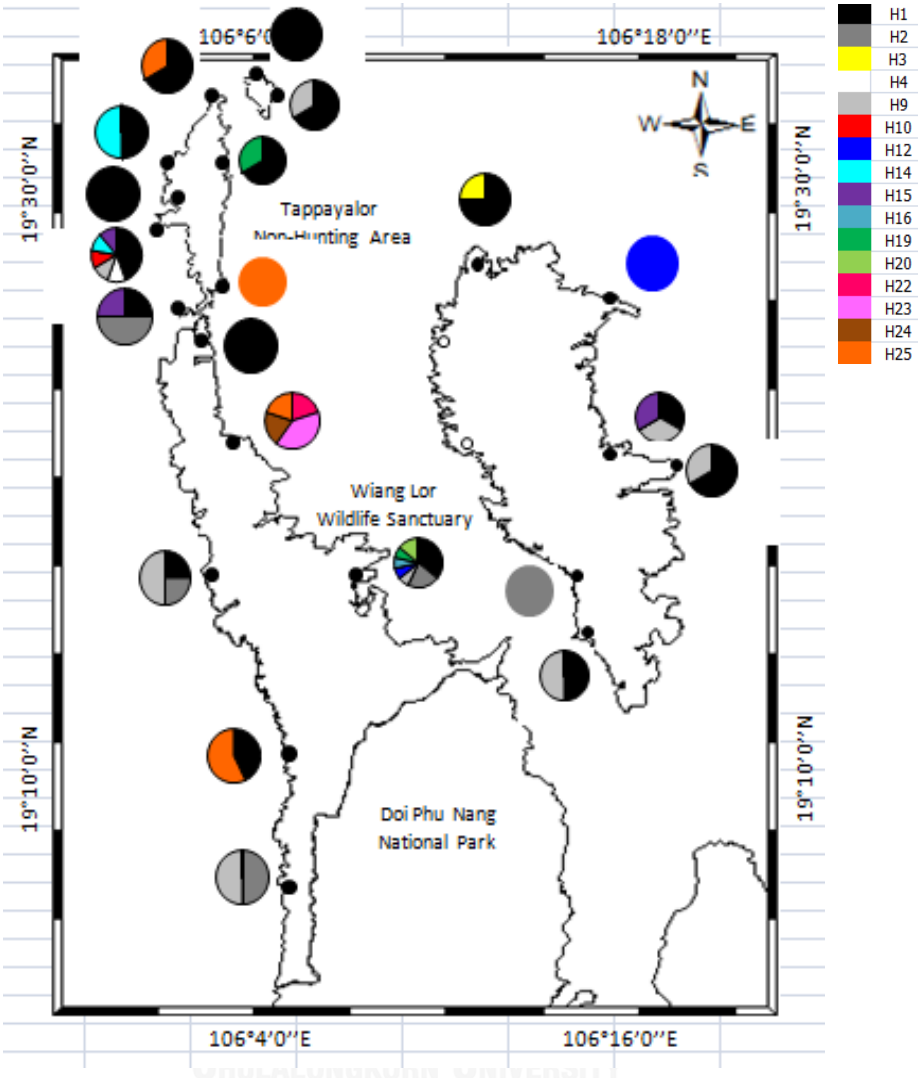
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



ภาพที่ 39 แผนที่อาณาเขตระหว่างเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอ fragment ที่ 1 และ 2 กับเขตห้ามล่าสัตว์ป่าทับพญาลอ



ภาพที่ 40 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างแฮพโพลไทป์ของนกยูงไทย *P. muticus* จากเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอ fragment ที่ 1, 2 และเขตห้ามล่าสัตว์ป่าทับพญาลอ โดยการสร้าง reduce median mtDNA haplotype network โดยวงกลมแต่ละวงแสดงถึงแฮพโพลไทป์ที่แตกต่างกัน ขนาดของวงกลม แสดงถึงจำนวนตัวอย่างที่พบในแฮพโพลไทป์นั้นๆ สีทั้งห้าสี ได้แก่ สีเขียว หมายถึง ตัวอย่างจากศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้ อันเนื่องมาจากพระราชดำริ (HHK) สีชมพู หมายถึง ตัวอย่างจากเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอ fragment ที่ 1 (WLOF1) สีขาว หมายถึง ตัวอย่างจากเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอ fragment ที่ 2 (WLOF2) สีฟ้า หมายถึง ตัวอย่างจากเขตห้ามล่าสัตว์ป่าทับพญาลอ (TPL) และสีดำ หมายถึง ตัวอย่างจากเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง (HKK) เส้นขีดบนเส้นเชื่อมระหว่างแฮพโพลไทป์ คือ จำนวนการเกิด mutation



ภาพที่ 41 ภาพ haplotype distribution ของพื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอ fragment ที่ 1, 2 และเขตห้ามล่าสัตว์ป่าทับพญาลอ

4.4.5 ผลการวิเคราะห์ population genetics โดยค่าทางสถิติ AMOVA (analysis of molecular variance) ของนกยูงไทย *P. muticus* จากประชากรกลุ่มภูมิภาคเหนือกับประชากรกลุ่มภูมิภาคตะวันตก

สำหรับการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติที่เกี่ยวกับ population structure และ population genetics ของประชากรนกยูงทั้งสองกลุ่มประชากร เพื่อตรวจสอบเปรียบเทียบว่าประชากรกลุ่มภูมิภาคเหนือกับประชากรกลุ่มภูมิภาคตะวันตก มีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมมากน้อยเพียงใด และอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติหรือไม่ โดยใช้โปรแกรม Arlequin นั้น ในการศึกษาได้แบ่งกลุ่มประชากรนกยูงออกเป็นสองภูมิภาค ได้แก่ กลุ่มภูมิภาคเหนือ ซึ่งประกอบไปด้วยนกยูงจากศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้ อันเนื่องมาจากพระราชดำริ เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอ และเขตห้ามล่าสัตว์ป่าทับพญาลอ และกลุ่มภูมิภาคตะวันตก ประกอบไปด้วยนกยูงจากเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้งเพียงแห่งเดียวเท่านั้น ผลที่ได้พบว่าระหว่างกลุ่มภูมิภาคเหนือกับกลุ่มภูมิภาคตะวันตก (among groups) มีความแตกต่างกันทางพันธุกรรม 5.20% ซึ่งหมายความว่าพบความแตกต่างกันน้อยมากในระหว่างสองกลุ่มภูมิภาคนี้ และเมื่อพิจารณาความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรนกยูงภายในภูมิภาคเดียวกัน ทั้งภายในกลุ่มภูมิภาคเหนือ และภายในกลุ่มภูมิภาคตะวันตก (among populations within group) พบว่าไม่มีความแตกต่างกัน แต่จากการเปรียบเทียบความแตกต่างทางพันธุกรรมภายในกลุ่มประชากรในแต่ละพื้นที่ศึกษา (within population) พบว่ามีความแตกต่างทางพันธุกรรมสูงถึง 94.79% (ตารางที่ 12)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 12 ผลการวิเคราะห์ค่าทางสถิติ AMOVA (analysis of molecular variance) ของประชากรนกยูงจาก 4 พื้นที่ศึกษา โดยได้แบ่งออกเป็นสองกลุ่มภูมิภาค ได้แก่ กลุ่มภูมิภาคเหนือประกอบไปด้วยสามพื้นที่จากศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้ อันเนื่องมาจากพระราชดำริ เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอ และเขตห้ามล่าสัตว์ป่าทับพญาลอ และกลุ่มภูมิภาคตะวันตก ประกอบไปด้วยหนึ่งพื้นที่จากเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง

Source of variation	d.f.	Sum of square deviation	*p*-value	Percentage of variation
Among groups	1	5.063	0.063^{ns}	5.20
Among populations within group	2	3.397	0.447^{ns}	0.00
Within population	119	201.905	0.252^{ns}	94.79
Total	122	210.365		

NS = Not significant at *p*-value < 0.05 หมายถึง ยอมรับสมมติฐานที่ว่าประชากรนกยูงกลุ่มภูมิภาคเหนือกับประชากรกลุ่มภูมิภาคตะวันตกไม่มีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

4.4.6 ผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบความแตกต่างทางพันธุกรรมด้วยค่าทางสถิติ F_{st} ระหว่างกลุ่มประชากรนกยูงไทยจากแต่ละพื้นที่ศึกษา

ทำการเปรียบเทียบความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่มประชากรในพื้นที่ศึกษา โดยใช้ค่าทางสถิติ F_{st} จากโปรแกรม Arlequin ซึ่งหากค่า F_{st} มีค่าเข้าใกล้ศูนย์ แสดงว่ากลุ่มประชากรของนกยูงระหว่างทั้งสองพื้นที่ศึกษาไม่ได้แยกออกจากกัน หรือไม่มีความแตกต่างทางพันธุกรรม ในทางตรงกันข้ามหากค่า F_{st} มีค่าเข้าใกล้หนึ่ง แสดงว่ากลุ่มประชากรของนกยูงระหว่างทั้งสองพื้นที่ศึกษาแยกออกจากกัน หรือมีความแตกต่างทางพันธุกรรม จากผลการคำนวณระหว่างกลุ่มประชากรในพื้นที่ศึกษาพบว่านกยูงจากศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้ อันเนื่องมาจากพระราชดำริและเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้งมีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมมากที่สุด (F_{st} = 0.074) ซึ่งเป็นตัวแทนของกลุ่มประชากรนกยูงจากภาคเหนือและภาคตะวันตก และเมื่อพิจารณาเปรียบเทียบค่า F_{st} ในภาพรวมระหว่างพื้นที่ศึกษาทั้งสี่ พบว่าค่า F_{st} ระหว่างกลุ่มประชากรนกยูงในพื้นที่ศึกษาทางภาคเหนือกับภาคตะวันตกมีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมมากกว่าค่า F_{st} ระหว่างพื้นที่ศึกษาของกลุ่มประชากรทางภาคเหนือด้วยกัน ซึ่งพบว่าแทบจะไม่มีความแตกต่างกันเลย และเมื่อพิจารณาค่า F_{st} โดยรวมพบว่ามีค่าที่ต่ำอีกทั้งยังเข้าใกล้ศูนย์ แสดงว่าประชากรนกยูงในประเทศไทยไม่มีความแตกต่างทางพันธุกรรม (ตารางที่ 13) หรือบอกเป็นนัยได้ว่ากลุ่มประชากรนกยูงทั้งสองภูมิภาคนี้ไม่ได้แยกกลุ่มออกจากกัน นอกจากนี้เมื่อพิจารณาค่า *p*-value ระหว่างกลุ่มประชากรในพื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้งกับศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้ อันเนื่องมาจากพระราชดำริ และระหว่างกลุ่มประชากรในพื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้งกับเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอ มีค่า *p*-value เท่ากับ 0.021 และ 0.018 ตามลำดับ ซึ่งมีค่าน้อยกว่า 0.05 แสดงว่ากลุ่มประชากรระหว่างทั้งสองพื้นที่เริ่มมีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมเล็กน้อย แต่ความแตกต่างดังกล่าวยังมีไม่มากพอที่จะส่งผลให้ประชากรนกยูงแยกออกเป็นสองกลุ่มประชากรย่อย

ตารางที่ 13 การวิเคราะห์เปรียบเทียบความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่มประชากรนกยูงไทยจาก 4 พื้นที่ศึกษา โดยค่าทางสถิติ F_{st} (พื้นที่สีขาว) และค่า *p*-value (พื้นที่สีเทา)

พื้นที่ศึกษา	HHK	WLO	TPL	HKK
HHK	-	0.368^{ns}	0.216^{ns}	0.021*
WLO	0.000	-	0.650^{ns}	0.018*
TPL	0.014	-0.011	-	0.087^{ns}
HKK	0.074	0.056	0.038	-

NS = Not significant at *p*-value < 0.05 หมายถึง หมายถึง ยอมรับสมมติฐานที่ว่ากลุ่มประชากรของนกยูงระหว่างทั้งสองพื้นที่ศึกษาไม่ได้แยกออกจากกัน หรือไม่มีความแตกต่างทางพันธุกรรม

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

4.4.7 Mismatch distribution

ในการศึกษา mismatch distribution ของนกยูงไทยในแต่ละพื้นที่ศึกษาครั้งนี้ จะแสดงผลเป็นกราฟที่แสดงถึงการกระจายของจำนวนเบสที่แตกต่างกันระหว่างแฮพโพลไทป์แต่ละคู่ ซึ่งหากประชากรมีการเพิ่มขนาดอย่างรวดเร็วเพียงครั้งเดียวกราฟการกระจายจะเป็นรูประฆังคว่ำ (unimodal) ในทางตรงกันข้ามหากกราฟเป็นแบบไม่สม่ำเสมอ (multimodal) ขนาดประชากรคงที่เป็นระยะเวลายาวนาน โดยการศึกษาครั้งนี้มี null hypothesis ที่ว่าขนาดประชากรคงที่เป็นระยะเวลายาวนาน ไม่มีการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของประชากรในอดีต จากกราฟแกน X แสดงถึงจำนวนเบสที่แตกต่างกันระหว่างคู่ (numbers of pairwise mismatch among DNA sequences) และแกน Y แสดงถึงความถี่ของ pairwise mismatch (frequency of pairwise mismatch) (ภาพที่ 42, 43 และ 44; ตารางที่ 14) ผลการวิเคราะห์ พบว่าศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้อันเนื่องมาจากพระราชดำริเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอ และเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง ลักษณะของกราฟที่ได้มีการกระจายแบบไม่สม่ำเสมอ (multimodal) แสดงว่าขนาดประชากรนกยูงจากทั้งสามพื้นที่นี้ น่าจะคงที่มาเป็นระยะเวลานาน (stationary population) แต่สำหรับในพื้นที่ของเขตห้ามล่าสัตว์ป่าทับพญาลอ เนื่องจากไม่พบจำนวนเบสที่แตกต่างกันระหว่างคู่ จึงไม่สามารถคำนวณกราฟการกระจายได้

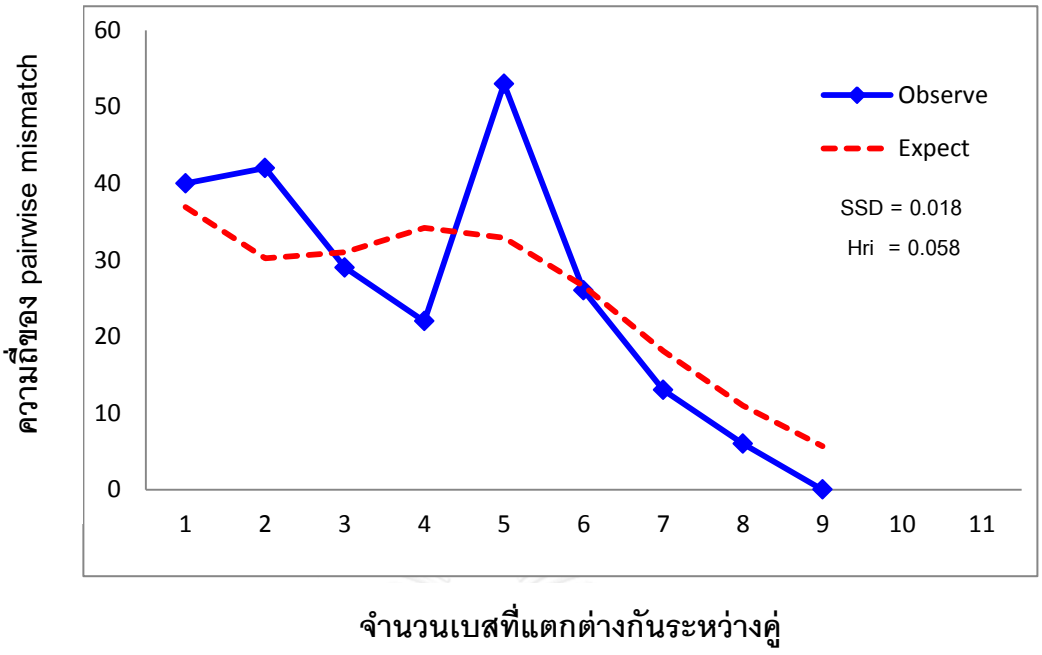
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 14 การวิเคราะห์ Mismatch distribution หรือ distribution of pairwise differences ของนกยูงไทยในแต่ละพื้นที่ศึกษา

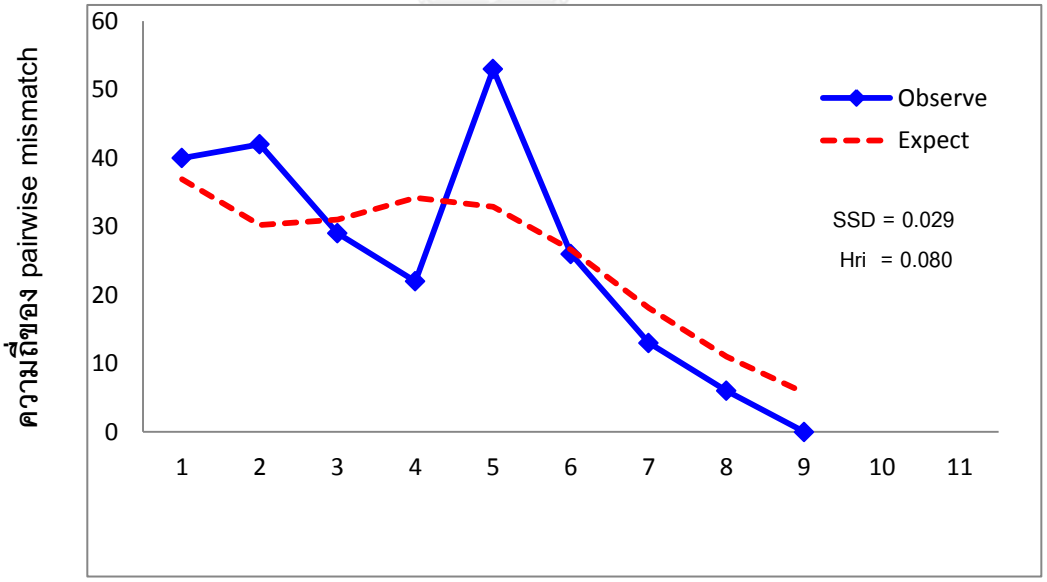
พื้นที่ศึกษา	Sum of square deviation (SSD)	*p*-value of SSD	Harpending's Raggedness Index (Hri)	*p*-value of Hri	Mismatch pattern
HHK	0.018	0.691 ^{ns}	0.058	0.563 ^{ns}	multimodal
WLO	0.029	0.335 ^{ns}	0.080	0.205 ^{ns}	multimodal
TPL	-	-	-	-	-
HKK	0.015	0.596 ^{ns}	0.041	0.690 ^{ns}	multimodal
All populations	-	-	-	-	-

NS = Not significant at *p*-value < 0.05 หมายถึง หมายถึง ยอมรับสมมติฐานที่ว่าขนาดประชากรคงที่เป็นระยะเวลายาวนาน หรือไม่มีการเพิ่มขึ้นจำนวนของประชากร (population expansion)

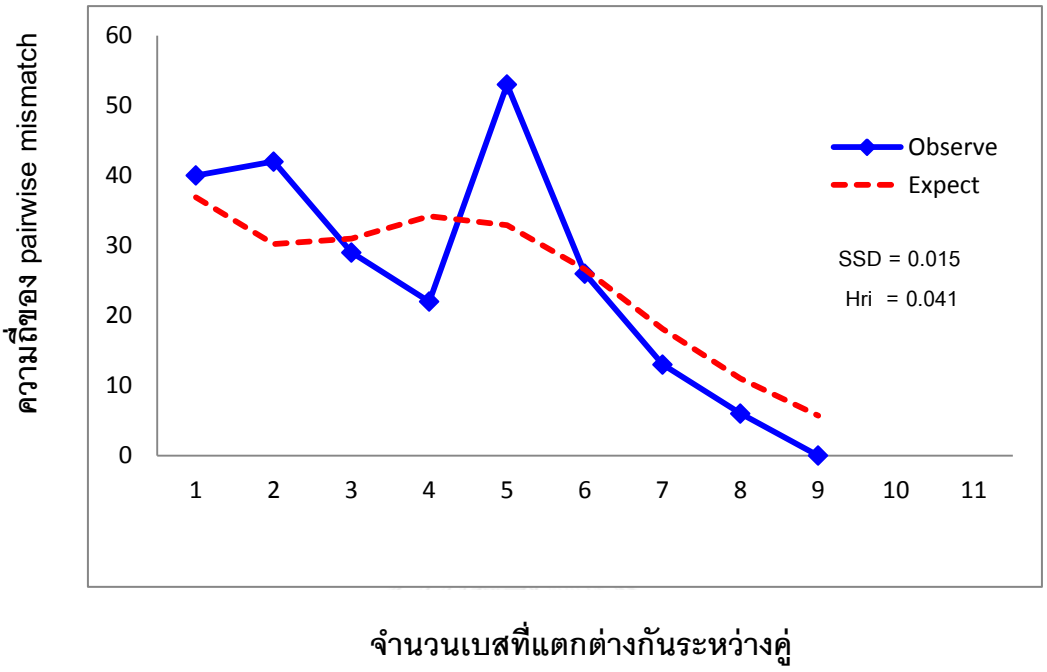
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



ภาพที่ 42 ภาพ mismatch distribution ของนกยูงไทยจำนวน 27 ตัวอย่างจากพื้นที่ศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้ อันเนื่องมาจากพระราชดำริ



ภาพที่ 43 ภาพ mismatch distribution ของนกยูงไทยจำนวน 47 ตัวอย่างจากพื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอ



ภาพที่ 44 ภาพ mismatch distribution ของนกยูงไทยจำนวน 22 ตัวอย่าง จากพื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

4.4.8 Neutrality test

ในการทดสอบว่าประชากรนกยูงในแต่ละพื้นที่ศึกษาอยู่ในสภาพสมดุลของ mutation-drift หรือ mutation-selection หรือไม่นั้น สามารถทดสอบได้จาก neutrality test of equilibrium โดยใช้โปรแกรม Arlequin ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้พบว่าค่า Tajima's *D*และ Fu's F_S ของประชากรนกยูงจาก ศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้ อันเนื่องมาจากพระราชดำริมีค่าเป็นบวก แสดงว่าขนาดประชากรมีแนวโน้มที่จะลดลงในอนาคตหรือแสดงถึงการเกิด balancing selection ในกลุ่มประชากรในพื้นที่นี้ สำหรับในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอ เขตห้ามล่าสัตว์ป่าทับพญาลอ และเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้งพบว่าทั้งค่าTajima's *D*และ Fu's F_S มีค่าเป็นลบ (ตารางที่ 15) นั่นแสดงว่าขนาดประชากรมีแนวโน้มที่จะเพิ่มขึ้นในอนาคต หรือผลที่ได้นี้อาจบ่งบอกถึงการเกิด directional selection หรือ purifying selection ในประชากรนกยูงไทยในพื้นที่ทั้งสองก็ได้ ทั้งนี้หากต้องการประเมินถึงแนวโน้มของประชากรนกยูงในพื้นที่ทั้งสี่ว่าจะมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นหรือลดลงในอนาคตนั้น จำเป็นต้องอาศัยข้อมูลอื่นๆ มาร่วมประกอบด้วย เช่น ขนาดประชากร life history ของนกยูงในแต่ละพื้นที่ ข้อมูลทางด้านนิเวศวิทยา แหล่งที่อยู่อาศัยและอาหาร เป็นต้น

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 15 การวิเคราะห์ neutrality test of equilibrium ซึ่งเป็นการทดสอบขนาดของประชากรนกยูงในแต่ละพื้นที่ศึกษาว่าอยู่ในสภาพสมดุลของ mutation-drift หรือ mutation-selection โดยใช้ค่า Tajima's *D* และ Fu's F_S ในการทดสอบประชากรนกยูงจาก 4 พื้นที่ศึกษา

พื้นที่ศึกษา	ผลค่าทางสถิติ					
	Theta (S)	Theta (π)	Tajima's *D*	*p*-values	Fu's F_S	*p*-values
HHK	3.077	3.483	0.236	0.638 ^{ns}	1.009	0.700 ^{ns}
WLO	4.299	3.811	-0.031	0.525 ^{ns}	-1.819	0.191 ^{ns}
TPL	3.455	3.111	-0.332	0.418 ^{ns}	-1.377	0.295 ^{ns}
HKK	2.743	2.703	-0.302	0.429 ^{ns}	-0.848	0.343 ^{ns}
ค่าเฉลี่ย	3.394	3.277	-0.107	0.503 ^{ns}	-0.759	0.382 ^{ns}

NS = Not significant at *p*-value < 0.05 หมายถึง หมายถึง ยอมรับสมมติฐานที่ว่าประชากรนกยูงในแต่ละพื้นที่ศึกษาไม่ได้อยู่ในสภาพสมดุลของ mutation-drift หรือ mutation-selection

ทั้งนี้การวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการและ mtDNA haplotype network พบว่านกยูงไทยหรือนกยูงเขียวจากทั้งสองภูมิภาคยังไม่แยกออกจากกันเป็น 2 กลุ่มประชากรย่อย (population subdivision) ทางภาคเหนือและภาคตะวันตก ซึ่งผลดังกล่าวสอดคล้องกับผลของ AMOVA ที่พบว่านกยูงจากทั้งสองภูมิภาคมีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมน้อยมากเพียง 5.20% ประกอบกับค่า F_{st} ที่ได้โดยรวมมีค่าเข้าใกล้ศูนย์อีกด้วย จากผลการศึกษาที่ได้ อาจมีสาเหตุมาจากนกยูงไทยหรือนกยูงเขียวจากทั้งสองภูมิภาคเพิ่งแยกออกจากกันทางภูมิศาสตร์ด้วยระยะเวลาไม่นานมาก หรืออาจเพราะนกยูงจากทั้งสองภูมิภาคเป็นประชากรเดียวกันมาก่อนในอดีต ซึ่งยังสามารถรักษาหรือคงไว้ซึ่ง (keep) ลักษณะของแฮพโพลไทป์เดิมอยู่ ดังจะสังเกตได้จากการพบ shared haplotype ระหว่างพื้นที่ทางภาคเหนือและภาคตะวันตก (H1 และ H14) แต่อย่างไรก็ตาม การพบ shared haplotype ภายในกลุ่มพื้นที่ภาคเหนือด้วยกันเองมากกว่าทางภาคตะวันตก แสดงว่าประชากรนกยูงทางภาคตะวันตกเริ่มมีความแปรผันทางพันธุกรรมที่แตกต่างจากภาคเหนือ ซึ่งแสดงให้เห็นถึงแนวโน้มที่นกยูงจากทั้งสองพื้นที่อาจจะแยกออกจากกันในอนาคต ถ้าหากนกยูงจากทั้งสองภูมิภาคไม่ได้มีการ migrate ระหว่างกัน

บทที่ 5
สรุปผลการศึกษา

จากการศึกษาการแปรผันทางพันธุกรรมของดีลูปในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอในประชากรธรรมชาติของนกยูงไทย จาก 4 พื้นที่ของประเทศไทยทั้งหมด 123 ตัวอย่าง โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มีความยาว 1,090 คู่เบส พบจำนวน variable site ทั้งสิ้น 23 (2.11%) ตำแหน่ง มีจำนวนของแฮพโพลไทป์ที่แตกต่างกัน 25 แฮพโพลไทป์ มีค่าเฉลี่ยของ *hd* เท่ากับ 0.811 ± 0.032 ค่าของ π เท่ากับ 0.00314 ± 0.0008 มีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมอยู่ระหว่าง 0.000-0.009 แสดงให้เห็นว่าประชากรนกยูงไทยในประเทศไทยมีความแปรผัน ทางพันธุกรรมต่ำ จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการและ mtDNA haplotype network พบว่าประชากรนกยูงทางภาคเหนือและภาคตะวันตก ยังไม่แยกออกจากกันเป็นกลุ่มย่อยตามพื้นที่การกระจายตัว ซึ่งผลดังกล่าวสอดคล้องกับผลของ AMOVA ที่พบว่านกยูงจาก ทั้งสองภูมิภาคมีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมน้อยมากเพียง 5.20% ประกอบกับค่า F_{st} ที่ได้โดยรวมมีค่าเข้าใกล้ศูนย์อีกด้วย แสดงว่าประชากรนกยูงเขียวในสภาพธรรมชาติของประเทศไทยยังไม่แยกออกจากกันเป็นกลุ่มประชากรย่อย ทั้งนี้ข้อมูลจากงานวิจัยครั้งนี้สามารถใช้เป็นฐานข้อมูลในการบอกลักษณะโครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรนกยูงในพื้นที่ภาคเหนือและภาคตะวันตกได้ นอกจากนี้ยังสามารถใช้เป็นฐานข้อมูลเพื่อการวางแผนทางการอนุรักษ์ การขยายพันธุ์ และยังเป็นข้อมูลที่สำคัญสำหรับการต่อยอดเพื่อนำไปเปรียบเทียบกับนกยูงในกรงเลี้ยงว่ามีความแตกต่างหรือคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมมากน้อยเพียงใดได้อีกด้วย

ข้อเสนอแนะ

แนวทางการอนุรักษ์นกยูงไทย

นกยูงไทยนั้นมีคุณค่าต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อมทั้งทางตรงและทางอ้อม ทั้งคุณประโยชน์ทางด้านชีววิทยา (biological values) ซึ่งเป็นประโยชน์ที่มีความสำคัญต่อมนุษย์มาก เช่น ช่วยแพร่ขยายชนิดพันธุ์ไม้ต่างๆ กำจัดแมลงและสัตว์ที่เป็นศัตรูพืช ซึ่งเป็นห่วงโซ่สำคัญในการควบคุมสมดุลของระบบนิเวศเพราะแมลงและสัตว์ที่นกกินเข้าไปมักเป็นศัตรูพืช ถ้าหากมีจำนวนมากเกินไปอาจจะทำให้เกิดความเสียหายจนขาดสมดุลทางธรรมชาติ นอกจากนี้มูลของนกยูงสามารถเป็นปุ๋ยได้เป็นอย่างดี ซึ่งในพื้นที่ของเขตห้ามล่าสัตว์ป่าทับพญาลอนั้น มีนโยบายในเรื่องการดูแลรักษา อนุรักษ์ทรัพยากรธรรมชาติ และสัตว์ป่า โดยจัดตั้งเป็นชมรมอนุรักษ์นกยูงไทยหรือนกยูงเขียว นอกจากนี้ยังได้จัดทำแหล่งอาหารให้นกยูงบริเวณหลังวัดศรีสุดาราม ให้นกยูงลงหากินโดยใช้ชื่อว่า “ข่วงนกยูงเพื่อแม่” ซึ่งข่วงนกยูงเป็นแหล่งอนุรักษ์ธรรมชาติ สัตว์ป่า ศึกษาพฤติกรรมของนกยูง ดังนั้นจึงจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องมีการป้องกันและแก้ไขไม่ให้นกยูงไทยหรือนกยูงเขียวลดจำนวนลงหรือสูญพันธุ์ ดังนั้นจึงต้องวางแผนการอนุรักษ์ดังต่อไปนี้

1. การอนุรักษ์พื้นที่สำหรับนกยูงไทยที่ลดจำนวนลงในปัจจุบัน เนื่องมาจากถิ่นที่อยู่อาศัยและแหล่งอาหารถูกทำลายลงอย่างมาก ดังนั้นในการจัดหาแหล่งที่อยู่อาศัยที่ปลอดภัยสำหรับนกยูง จึงเป็นเรื่องสำคัญและจำเป็นอย่างมากโดยวิธีการอนุรักษ์พื้นที่หรือถิ่นที่อยู่อาศัยทำได้โดยประกาศเป็นพื้นที่อนุรักษ์ ดังต่อไปนี้ เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่า เขตห้ามล่าสัตว์ป่า และอุทยานสัตว์ป่า

2. ควรมีการส่งเสริมการอนุรักษ์นกยูงไทยในทางวิชาการเชิงลึกให้ครอบคลุมทุกด้าน ไม่ว่าจะเป็นทางด้านพฤติกรรม การสืบพันธุ์ แหล่งที่อยู่อาศัย การหาอาหาร และพันธุกรรม ทั้งนี้เพื่อจะได้นำข้อมูลเหล่านั้นมาใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการจัดการและอนุรักษ์นกยูงไทยอย่างยั่งยืน ควรมีการจัดกิจกรรมเพื่อส่งเสริมให้คนในพื้นมีส่วนร่วมในการอนุรักษ์นกยูงมากขึ้น ควรมีการเพิ่มมาตรการในเรื่องการเข้าไปใช้พื้นที่ของประชาชน เพื่อไม่ให้มีการรบกวนหรือทำลายถิ่นที่อยู่อาศัยของนกยูง นอกจากนี้ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับศัตรูตามธรรมชาติของพืชที่เป็นอาหารของนกยูงในพื้นที่ดังกล่าวด้วย

3. ควรมีการจัดกิจกรรมเพื่อส่งเสริมให้คนในพื้นมีส่วนร่วมในการอนุรักษ์นกยูงมากขึ้น ควรมีการเพิ่มมาตรการในเรื่องการเข้าไปใช้พื้นที่ของประชาชน เพื่อไม่ให้มีการรบกวนหรือทำลายถิ่นที่อยู่อาศัย ของนกยูง นอกจากนี้ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับศัตรูตามธรรมชาติของพืชที่เป็นอาหารของนกยูงในพื้นที่ดังกล่าวด้วย

รายการอ้างอิง

Aksono, H.E.B. and Hermadi, D.H.A. 2014. Molecular genetic analysis based on Java green peacock (*Pavo muticus*) mitochondrial D-loop efforts as a basis for domestication in Probolinggo, East Java Indonesia. Journal of Animal Science Advances 4: 668–674.

Al Farhan, A.H. Al Homablan, A.A. Al Sadoon, M. Arif, I.A. Bahkali, A.H. and Shobrak, M. 2011. DNA marker technology for wildlife conservation. Saudi Journal of Biological Science 18: 219–225.

Arrathrakorn, S. 2001. Breeding ecology and agriculture field utilization of green peafowl *Pavo muticus* Linnaeus, 1766 at Doi Phu Nang national park. Master of Science, Bangkok, Chulalongkorn University.

Bandelt, H.-J. Forster, P. and Rohl, A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. Molecular Biology and Evolution 16: 37–48.

Brickle, N.W. Duckworth, W. Andrew, V.M. Poole, T.R. Timmins, J.K. and McGowan, P. 2008. The status and conservation of Galliformes in Cambodia, Laos and Vietnam. Biodiversity and Conservation 17: 1393–1427.

Calkins, J.D. and Burley, N.T. 2003. Mate choice for multiple ornaments in the California quail, Callipepla california. Animal Behaviour 65: 69–81.

Dakin, R. and Montgomerie, R. 2011. Peahens prefer peacocks displaying more eyespots, but rarely. Animal Behaviour 82: 21–28.

Delacour, J. Harrison, J.C. and Digby, R.D. 1977. The pheasant of the world. Spur.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

Desjardins, P. and Morais, R. 1990. Sequence and gene organization of the chicken mitochondrial genome. A novel gene order in higher vertebrates. Journal of Molecular Biology and Evolution 212: 599–634.

Doublié, S. Tabor, S. Long, A.M. Richardson, C.C. and Ellenberger, T. 1988. Crystal structure of a bacteriophage T7 DNA replication complex at 2.2 A resolution. Nature 391: 251–800.

Dunkeaw, J. 2009. Seasonal distribution and population structure of green peafowl *Pavo muticus* Linnaeus, 1766 in Pa Miang subdistrict, Doi Saket district, Chiang Mai province. Master of Science, Bangkok, Chulalongkorn University.

Dupanloup, I., et al. 2003. A recent shift from polygyny to monogamy in human populations is suggested by the analysis of worldwide Y-chromosome diversity. Journal of Molecular Evolution 57: 85–97.

Excoffier, L. and Lischer, H.E. 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. Molecular Ecology Resources 10: 564–567.

Francisco, L.V. Langston, A.A. Mellersh, C.S. Neal, C.L. and Ostrander, E.A. 1996. A class of highly polymorphic tetranucleotide repeats for canine genetic mapping. Mammalian Genome 7: 359–362.

Fu, Y.X. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. Genetics 147: 915–925.

Fuller, R.A. and Garson, P.J. 2000. Pheasants: status survey and conservation action plan 2000-2004. IUCN and World Pheasant Association Gland, Switzerland and Cambridge, United Kingdom: Reading UK.

Gomes, C.B. Gontard, M.D. Cassey, P. Moller, A.P. Legendre, S. and Clobert, J. 2003. Mating behaviour influences extinction risk: insights from demographic modeling and comparative analysis of avian extinction risk. Annales Zoologini Fennici 4: 231–245.

Gruszczynska, J. and Michalska, E. 2013. Application of chicken microsatellite markersto molecular monitoring of the experimental population of Japanese quail (*Coturnix japonica*). Animal Science Papers and Reports Institute of Genetics and Animal Breeding 31: 73–84.

Han, L. Liu, Y. and Han, B. 2007. The status and distribution of green peafowl *Pavo muticus* in Yunnan Province, China. International Journal of Galliformes Conservation 1: 29–31.

Hasegawa, P.M. and Bressan, R.A. 2000. Plant cellular and molecular responses to high salinity. Plant molecular biology 51: 463–499.

Hernowo, J.B. Mardiastuti, A. Alikodra, H.S. and Kusmana, C. 2011. Behavior ecology of the Java green peafowl (*Pavo muticus muticus* Linnaeus 1758) in Baluran and Alas Purwo National Park, East Java. Journal of Biosciences 18: 164–176.

Holmes, D.A. 1989. Status report on Indonesian Galliformes. Kukila 4: 133–143.

Laowthong, P. and Piriya, J. 1989. Feeding and reproducing of green peafowl (การเพาะเลี้ยงและขยายพันธุ์นกยูงเขียว). Wildlife conservation office, Royal Forest Department.

Leimu, R. and Fischer, M. 2010. Between-population outbreeding affects plant defence. Plos one 5: 1–8.

Liu, Y. Han, L. Xie, Y. Wen, Y. and Zhang, R. 2009. The status and distribution of green peafowl *Pavo muticus* in Yunnan Province, China. International Journal of Galliformes Conservation 1: 29–31.

McGowan, F. and Gillman, M. 1997. Assessment of the conservation status of partrides and pheasants in South East Asia. Biodiversity and Conservation 6: 1321–1337.

Meckvichai, W. 2008. Academic training guide for green peafowl conservation (คู่มือการอบรมทางวิชาการเรื่องการอนุรักษ์นกยูง). Thailand: Departmet of Biology, Faculty of Science, Chulalongkorn University.

Meckvichai, W. Asirapoj, S. Wonghongsa, S. and Pitdamkham, C. 2007. The distribution and abundance of green peafowl *Pavo muticus* in Thailand. 4th International Galliformes Symposium, Beijing, China.

Meckvichai, W. Siripong, A. and Srikawn, A. 2000. Biodiversity and the conservation of pheasants in the upper northern part (ความหลากหลายทางชีวภาพและแนวทางการอนุรักษ์ไก่ฟ้าในภาคเหนือตอนบน). The 3rd Biodiversity Research Training Program, Beljing, China.

Meckvichai, W. Siripong, A. and Srikawn, A. 2001. Biodiversity and the conservation of pheasants in the upper northern part (ความหลากหลายทางชีวภาพและแนวทางการอนุรักษ์ไก่ฟ้าในภาคเหนือตอนบน). The 4th Biodiversity Research Training Program, Beljing, China.

Meckvichai, W. Siripong, A. and Srikwan, S. 2002. The distribution and population of the green peafowl in the Eng and Yom basin, Thailand. 23rd International Ornithological Congress, Beljing, China.

Merila, J. Bjorklund, M. and Baker, A.J. 1997. Historical demography and present day population structure of the greenfinch, *Carduelis chloris* an analysis of mtDNA control-region sequences. Sweden Evolution 51: 946–956.

Mulotwa, M. Louette, M. Dudu, A. Upoki, A. and Fuller, R.A. 2010. Congo Peafowl use both primary and regenerating forest in Salonga National Park Democratic Republic of Congo. Ostrich 81: 1–6.

Niu, D., et al. 2001. The origin and genetic diversity of Chinese native chicken breeds. Biochemical Genetics 40: 163–174.

Noonpanichphong, A. 2011. Genetic variation of green peafowl *Pavo muticus* in northern and western Thailand based on D-loop mitochondrial sequences. Bachelor of Science, Bangkok, Chulalongkorn University.

Oka, T., et al. 2007. Analysis of mtDNA sequences shows Japanese native chickens have multiple origins. International Society for Animal Genetics, Animal Genetics 38: 287–293.

Pinthong, T. 2009. Effect of environmental and human use factor to abundance of green peafowl *Pavo muticus* at Huai Tab Saloa and Huai Song tang, Huai Kha Khaeng wildlife sanctuary, Uthai Thani province. Master of Science, Bangkok, Chulalongkorn University.

Plubcharoensook, P. 2000. Genetic variation of green peafowls *Pavo muticus* in northern Thailand. Master of Science, Bangkok, Chulalongkorn University.

Ponsena, P. 1988. Biological characteristics and breeding behaviors of green peafowl (*Pavo muticus*) in Huai Kha Khaeng wildlife sanctuary. Master of Science, Bangkok, Kasetsart University.

Ponyeam, S. 1993. Study of distribution and population structure of green peafowl at Huai Kha Khaeng wildlife sanctuary, Uthai Thani and Tak province (การศึกษาขอบเขตการแพร่กระจาย และประชากรอย่างต่ำของนกยูงเขียวในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง จ.อุทัยธานี และ จ.ตาก พ.ศ. 2529-2530). Special problem, Bangkok, Kasetsart University.

Ptak, S. and Lachmann, M. 2010. On the evolution of polygamy: A theoretical examination of the polygamy threshold model. International Journal of Poultry Science 9: 1100–1106.

Ramesh, K. and McGowan, P. 2009. On the current status of Indian Peafowl *Pavo cristatus* (Aves: Galliformes: Phasianidae): keeping the common species common. Journal of Threatened Taxa 1: 106–108.

Rojanadilog, P. Bhumpkkapun, N. Kutintara, U. Naksatit, N. Prayurasiddhi, T. and Sukmasuang, R. 1985. Distribution range and some behavioural characteristics of green peafowl in Huai Kha Khaeng wildlife sanctuary. Master of Science, Bangkok, Kasetsart University.

Rojanadilog, P. Pumipakpan, N. kuait, A. Naksatit, N. Payunsit, N. and Sukmasuang, R. 1986. Distribution range and some behavioural characteristics of green peafowl in Huai Kha Khaeng Wildlife Sanctuary. Department of Forest Biology Faculty of Forest Kasetsart University., Bangkok.

Roques, S. and Negro, J.J. 2005. MtDNA genetic diversity and population history of a dwindling raptorial bird, the red kite (*Milvus milvus*). Biological Conservation 126: 41–50.

Rothuizen, J. and Wolferen, M.V. 1994. Random amplified DNA polymorphisms in dogs are reproducible and display Mendelian transmission. Animal genetic 25: 13–18.

Rozas, J. Librado, P. Sánchez-Del Barrio, J.C. Messeguer, X. and Rozas, R. 2010. DnaSP Version 5.10 HelpContents. Bioinformatics 25: 1451–1453.

Rudresh, R.B.H. Murthy, H.N.N. Jayashankar, M.R. Nagaraj, C.S. Kotresh, A.M. and Byregowda, S.M. 2015. Microsatellite based genetic diversity study in indigenous chicken ecotypes of Karnataka. Veterinary World 8: 970–976.

Saridniran, G. 2015. Seasonal distribution and habitat of green peafowl Pavo muticus Linnaeus, 1766 in Wiang Lor wildlife sanctuary, Chun district, Phayao province. Master of Science, Bangkok, Chulalongkorn University.

Silapasuwan, N. 1999. Distribution range and minimum population of green peafowl *Pavo muticus* Linnaeus, 1766 in breeding season at Doi Phu Nang national park. Bachelor of Science, Bangkok, Chulalongkorn University.

Silva, P., et al. 2008. Mitochondrial DNA-based analysis of genetic variation and relatedness among Sri Lankan indigenous chickens and the Ceylon junglefowl (*Gallus lafayetti*). International Society for Animal Genetics 40: 1–9.

Sriwatcharakan, R. 2009. Comparison morphological characteristics in green peafowl *Pavo muticus* and Indian peafowl *Pavo cristatus*. Bachelor of Science, Bangkok, Chulalongkorn University.

Sugimoto, T., et al. 2015. Genetic structure of the endangered red-crowned cranes in Hokkaido, Japan and conservation implication. Conservation Genetics 16: 1395–1401.

Tamura, K. Peterson, D. Peterson, N. Stecher, G. Nei, M. and Kumar, S. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Molecular Biology and Evolution 28: 2731–2739.

Thompson, J.D. Higgins, D.G. and Gibson, T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research 22: 4673– 4680.

Van Balen, S. Prawiradilaga, D.M. and Indrawan, M. 1995. The distribution and status of Green Peafowl in Java. Biological Conservation 71: 289–297.

Van de walle, M.J. Olivo, P.D. Laipis, P.J. and Hauswirth, W.W. 1983. Nucleotide sequence evidence for rapid genotypic shifts in the bovine mitochondrial DNA D-loop. Nature 306: 400–402.

Viboonarong, C. 2002. Thai peafowl (นกยูงไทย ฤาจะให้ถูกกลืนกินเผ่าพันธุ์). National park, wildlife and plant conservation department.

Vongkhamheng, C. Phiapalath, P. Vongkhamheng, C. and Ounmany, S. 2012. Participatory Survey, Assessment and Conservation of Green Peafowl (*Pavo muticus*) in Dong Khanthung Provincial Protected Area, the far south-western Lao PDR. Lao Wildlife Conservation Association.

Watershaderesearchunit. 2007. The structure of forest at Huai Hong Khrai royal development study center (การศึกษาลักษณะโครงสร้างของป่าในบริเวณพื้นที่โครงการศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้ อันเนื่องมาจากพระราชดำริ ประจำปี 2550). Huai Hong Khrai royal development study center (Report).

Wenink, P.W. Baker, J. and Tilanus, M.G.J. 1994. Mitochondrial control-region sequences in two shorebird species, the turnstone and the dunlin, and their utility in population genetic studies. Molecular Biology and Evolution 11: 22–31.

Wiwegweaw, A. and Meckvichai, W. 2011. Genetic variation of captive green peafowl *Pavo muticus* in Thailand based on D-loop sequences. International Journal of Galliformes Conservation 2: 38–42.

Zajc, I. Mellersh, C.S. and Samson, J. 1997. Variability of canine microsatellites within and between different dog breeds. Mammalian Genome 8: 182–185.

ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

วัสดุ อุปกรณ์และสารเคมี

วัสดุและอุปกรณ์

- กรรไกรผ่าตัด
- กล้องถ่ายรูป Nikon COOLPIX L6
- ตู้เย็น (Mitsubishi Electric, Japan)
- ถุงมือยาง
- ปากคีบ
- ไมโครเวฟ (Samsung, Korea)
- หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ (microcentrifuge tube) ขนาด 0.2, 0.5 และ 1.5 มิลลิลิตร (Treff®, Switzerland)
- AccBlock™ digital dry bath, model D110 (Labnet international, Inc., USA.)
- Automatic micropipette ขนาด P2, P10, P20, P200 และ P1000 (Harikul Science Co., Ltd., Thailand)
- Centrifuge models 5418 (Eppendorf, Germany)
- Cubee mini-centrifuge (GeneReach Biotechnology Crop., Taiwan)
- DNA thermal cycle model T100™ (Bio-Rad, Laboratories, Inc., USA.)
- Electrophoresis chamber and power supply (Cosmo Bio Co., Ltd., USA)
- Electronic clock timer model CT-30 (Canon co., Ltd., Japan)
- Garmin eTrex GPS
- IsoTherm benchtop cooler cooling system (Eppendorf, Germany)
- Safe imager transilluminator (Invitrogen™ Corp., USA)
- Vortex mixer model: VM-300 (Gemmy Industrial Corp., Taiwan)
- Whatman® laboratory sealing film (Fisher Scientific Co., Ltd., UK)
- -20°C Freezer (Sharp, Japan)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารเคมี

- น้ำกลั่น
- 99% เอทานอล
- Agarose powder (Promega Corp., USA)
- FavorPrep™ Tissue Genomic DNA Extraction Mini Kit (Favorgen Biotech Corp., Taiwan)
- MilliQ water
- 0.5X TBE buffer
- 2X premix EmeraldAmp® GT PCR Master Mix (Takara Bio, Japan)
- 10 µM PMDFU-F (forward primer)
- 10 µM PMDFU-R (reverse primer)
- 100 bp + 1.5 Kb DNA ladder
- 10,000X SYBR® Safe DNA gel stain (Invitrogen™, Molecular Probes©)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอ (Total DNA) จากโคนขนนกยูงที่เก็บมาได้ โดยใช้ชุดสารเคมีสำเร็จรูปสำหรับสกัดดีเอ็นเอ คือ FavorPrep™ Tissue Genomic DNA Extraction Mini Kit (Favorgen Biotech Corp., Taiwan) โดยทำการสกัดตามคู่มือการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเนื้อเยื่อ ดังขั้นตอนต่อไปนี้

1. ล้างโคนขนนกยูงด้วยน้ำกลั่น เช็ดให้แห้งสะอาดด้วยกระดาษทิชชู่ จากนั้นใช้กรรไกรที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วตัดบริเวณโคนขนของนกยูงให้มีความยาวประมาณ 1 เซนติเมตร แล้วทำการตัดย่อยให้ได้ชิ้นขนาดเล็กประมาณ 2-5 มิลลิเมตร ใส่ลงในหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ (microcentrifuge tube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

2. เติมสารละลายบัฟเฟอร์ FATG 1 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงในหลอดที่มีขนนกยูงที่ทำการตัดย่อยแล้ว เพื่อทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ และเพื่อให้ดีเอ็นเอออกมา

3. เติมเอนไซม์ proteinase K ความเข้มข้น 11 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 9 ไมโครลิตร เพื่อย่อยเยื่อหุ้มเซลล์ และโปรตีนต่างๆ ในเซลล์ จากนั้นผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องวอร์เทค (vortex mixer) เป็นเวลา 10 วินาที แล้วนำไปบ่ม (incubate) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง โดยวอร์เทคทุกๆ 30 นาที

4. เติมสารละลายบัฟเฟอร์ FATG 2 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงไปในหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตรหลอดเดิม จากนั้นนำไปวอร์เทคเพื่อให้สารต่างๆ ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน เป็นเวลา 10 วินาที แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

5. เติมสารละลาย 99% เอทานอลปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงไปในหลอดเดิม จากนั้นนำหลอดตัวอย่างไปแยกตะกอน โดยการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ (centrifuge) ที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อทำให้เนื้อเยื่อที่ไม่ผ่านการย่อยสลายตกตะกอนอยู่ที่ก้นหลอด

6. ประกอบมินิคอลัมน์ (FATG mini column) โดยใส่ลงในหลอดคอลเลคชั่น (collection tube) จากนั้นดูดตัวอย่างที่ผ่านการแยกตะกอนแล้ว โดยใช้เฉพาะส่วนที่เป็นสารละลายส่วนใส ปริมาตร 560 ไมโครลิตร ใส่ลงในมินิคอลัมน์ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอจับกับแผ่นเมมเบรนในหลอดมินิคอลัมน์

7. ทิ้งส่วนที่เป็นน้ำออกจากหลอดคอลเลคชั่น ซับด้วยกระดาษทิชชู่ให้แห้ง แล้วนำมินิคอลัมน์สวมลงในหลอดคอลเลคชั่นดังเดิม จากนั้นเติมสารละลายบัฟเฟอร์ W1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงไปในมินิคอลัมน์หลอดเดิม เพื่อทำให้ดีเอ็นเอที่เกาะติดกับแผ่นเมมเบรนมีความบริสุทธิ์มากยิ่งขึ้น แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ที่ 14,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเทสารละลายที่ลงมาในหลอดคอลเลคชั่นทิ้ง

8. เติมสารละลาย Wash Buffer ปริมาตร 750 ไมโครลิตรลงไปในมินิคอลัมน์หลอดเดิม จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ที่ 14,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาที แล้วเทสารละลายที่ลงมาในหลอดคอลเลคชั่นทิ้ง ขั้นตอนนี้เพื่อทำให้ดีเอ็นเอที่เกาะติดกับแผ่นเมมเบรนมีความบริสุทธิ์มากยิ่งขึ้น

9. นำมินิคอลัมน์ไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์อีกรอบที่ 14,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 3 นาที เพื่อให้สารละลายที่เหลือตกลงมาในหลอดคอลเลคชั่นทั้งหมด แล้วเทสารละลายและหลอดคอลเลคชั่นทิ้งไป

10. นำมินิคอลัมน์ใส่ลงในหลอดไมโครเซนทริฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตรหลอดใหม่ จากนั้นเติมสารละลาย Elution Buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 10 นาทีที่อุณหภูมิห้อง เพื่อที่จะชะ DNA ที่ติดที่แผ่น membrane ออกมา จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เพื่อทำให้ Total DNA ลงมาอยู่ในหลอดไมโครเซนทริฟิวส์

11. เก็บรักษา Total DNA ที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

การตรวจสอบขนาดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis

1. ชั่งผง agarose 0.8 กรัม แล้วเทใส่ในขวดรูปชมพู่ โดยเทลงตรงกลางขวด พยายามอย่าให้ผง agarose ติดกับข้างขวดมากเกินไป จากนั้นเติม 0.5X TBE buffer ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ลงไป

2. นำไปต้มในไมโครเวฟเพื่อทำให้ผง agarose ละลายเป็นเนื้อเดียวกันกับ buffer เมื่อเริ่มเดือดนำออกมาเขย่าให้เข้ากัน ถ้ายังไม่ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ให้ต้มในไมโครเวฟต่อ เมื่อละลายเข้ากันแล้ว ให้ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาประมาณ 5 นาที เพื่อให้ agarose gel solution เย็นลง

3. เติมสารละลาย 10,000X SYBR® Safe DNA gel stain ปริมาตร 3 ไมโครลิตรลงไป เขย่าให้เข้ากันโดยจะเห็นสารละลายเป็นสีส้มอ่อนๆ โดย SYBR® Safe คือสีย้อมที่มีคุณสมบัติคล้ายกับ ethidium bromide เมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสงอัลตราไวโอเลตจะทำให้แถบดีเอ็นเอเรืองแสงขึ้น

4. เท agarose gel solution ลงใน tray ที่เสียบ comb ไว้เรียบร้อยแล้ว โดยให้มีความสูงประมาณ 5 มิลลิเมตร ตั้งพักไว้จนกระทั่งเจลแข็งตัว ตรวจสอบการแข็งตัวของเจลโดยการกดสัมผัสบริเวณด้านปลายข้างใดข้างหนึ่งของเจล

5. เมื่อ agarose gel แข็งตัวพร้อมนำไปใช้งานได้ เติม 0.5X TBE buffer ลงไปให้ท่วมทั่วทั้งเจล เพื่อที่จะดึง comb ออกได้ง่ายขึ้น จากนั้นเช็ดเศษเจลที่ติดอยู่บน tray ออกให้หมด แล้วนำ tray ใส่ลงไปใน electrophoresis chamber ที่เติม 0.5X TBE buffer ไว้แล้ว

6. หยอดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ลงไปในช่องของ agarose gel ปริมาตร 5 ไมโครลิตร และ 100 bp + 1.5 Kb DNA ladder ปริมาตร 1 ไมโครลิตร เพื่อใช้เป็น DNA marker ในการบอกขนาดของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของตัวอย่าง

7. กดปุ่มเพื่อเริ่มการทำงานของเครื่อง electrophoresis โดยใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ 135 โวลต์ เป็นเวลา 20 นาที โดยสังเกตฟองอากาศที่เกิดขึ้นด้านท้ายของเครื่อง ถ้าพบว่ามีฟองอากาศเกิดขึ้น แสดงว่าเครื่อง electrophoresis ทำงานได้ตามปกติ

8. ตรวจสอบขนาดของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้โดยนำ agarose gel ไปส่องภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง UV transilluminator โดยเห็นผลิตภัณฑ์พีซีอาร์เรืองแสงขึ้น จากนั้นถ่ายภาพเจลที่ได้ด้วยกล้องถ่ายรูป

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวธนาพร แสวงธรรม เกิดเมื่อวันที่ 18 พฤศจิกายน พ.ศ. 2531 สถานที่เกิด จังหวัดกรุงเทพมหานคร สถานที่อยู่ปัจจุบัน 54 ซอยศุภวรรณ 1 ถนนเลียบคลองภาษีเจริญฝั่งเหนือ แขวงหนองแขม เขตหนองแขม กรุงเทพมหานคร 10160 สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เกียรตินิยมอันดับ 1) จากสาขาวิชาสัตวศาสตร์ ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ปีการศึกษา 2554 จากนั้นได้เข้าศึกษาต่อระดับปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต ในสาขาวิชาสัตววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2555

ผลงาน

เข้าร่วมการนำเสนอผลงานทางวิชาการ The JSPS Core-to-Core Program: the 5th International Symposium on Asian Vertebrate Species Diversity (AVIS2015). ในหัวเรื่อง D-loop sequence variation in natural populations of Green Peafowls, Pavo muticus Linnaeus, 1766 in Thailand ระหว่างวันที่ 15-18 ธันวาคม 2558

เข้าร่วมการนำเสนอและตีพิมพ์ผลงานทางวิชาการ The 10th Conference on Science and Technology for Youths: 2015 ในหัวเรื่อง Genetic variation of green peafowl Pavo muticus in northern and western Thailand based on mitochondrial D-loop sequences หน้าที่ 23-31 ระหว่างวันที่ 19-20 มิถุนายน 2558

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University