



รายงานการวิจัย

ทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินปี 2561

โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ  
สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี

เรื่อง

การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกกระเรียนพันธุ์ไทย  
(*Grus antigone sharpii*) ในพื้นที่สวนสัตว์เปิดเขาเขียวด้วยวิธีไมโครแซทเทลไลท์  
Genetic diversity analysis of captive eastern sarus crane  
(*Grus antigone sharpii*) in Khao Khew Open Zoo using microsatellite markers

อาจารย์ ดร.อัมพร วิเวกแก้ว (หัวหน้าโครงการ)

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ณัฐพจน์ วาฤทธิ (ผู้ร่วมวิจัย)

นางสาวรังสิณี สันคม (ผู้ร่วมวิจัย)

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2561

### กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2561 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี ขอขอบพระคุณ คุณสุรียา แสงพงศ์ อดีตผู้อำนวยการสวน สัตว์เปิดเขาเขียว และเจ้าหน้าที่ทุกท่านจากสวนสัตว์เปิดเขาเขียวที่ได้ให้ความช่วยเหลือในการเข้าไปเก็บ ตัวอย่าง และให้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์กับการศึกษา และขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้การสนับสนุนและอำนวยความสะดวกในทุกๆ ด้าน

## บทคัดย่อ

นกกระเรียนพันธุ์ไทย (*Grus antigone sharpii*) ได้สูญพันธุ์ไปจากธรรมชาติของประเทศไทย โดยมีสาเหตุหลักมาจากการสูญเสียแหล่งที่อยู่อาศัยบริเวณพื้นที่ชุ่มน้ำ ต่อมาได้มีการขอรับบริจาค นกกระเรียนพันธุ์ไทยจากประเทศกัมพูชามาเพาะเลี้ยงและขยายพันธุ์ในสภาพกรงเลี้ยง ซึ่งการเพาะเลี้ยงและขยายพันธุ์ไม่ต้องการเพิ่มจำนวนและอัตราความอยู่รอดของประชากรในสภาพกรงเลี้ยงเท่านั้น แต่ยังคงคำนึงถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากร ดังนั้นผู้วิจัยจึงใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ ตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกกระเรียนพันธุ์ไทยจากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว ( $n = 11$ ) โดยนำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากโคนขน มาเพิ่มปริมาณไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอด้วย polymorphic primer ที่ออกแบบมาจากจีโนมของ whooping crane *G. Americana* จำนวน 10 คู่ และ blue crane *Anthropoides paradise* จำนวน 4 คู่ ผลการศึกษาพบการเบี่ยงเบนออกจากสมดุล Hardy-Weinberg ที่โลคัส Gram8 ซึ่งเป็นผลมาจาก null allele และพบการปรากฏของ linkage disequilibrium ที่โลคัส Gpa12, Gpa34 และ Gpa35 จากการวิเคราะห์ค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์จำนวน 10 โลไซ พบว่าจำนวนอัลลีลต่อโลคัสมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 4.2 ค่า expected และ observed heterozygosity มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.59 และ 0.61 ตามลำดับ ค่า inbreeding coefficient มีค่าเท่ากับ -0.03 จากผลที่ได้แสดงว่านกกระเรียนพันธุ์ไทยมีความหลากหลายทางพันธุกรรมค่อนข้างสูง และเกิด inbreeding น้อย ดังนั้นจึงเหมาะที่จะใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ในการเพิ่มจำนวนประชากรในกรงเลี้ยงต่อไปในอนาคตได้ เพื่อเป็นตัวแทนประชากรที่จะนำกลับไปปล่อยคืนสู่พื้นที่ชุ่มน้ำในธรรมชาติของประเทศไทยต่อไป

**คำสำคัญ:** ความหลากหลายทางพันธุกรรม นกกระเรียนพันธุ์ไทย โพลีมอร์ฟิซึม ไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ เฮทเทอโรไซโกตี

## Abstract

*Grus antigone sharpii* is the only crane species that was reported in Thailand, though it has become extinct in the wild due to the depletions of its natural habitats and food sources. The Thai government with the Cambodian collaboration has tried to repopulate *G. a. sharpii* using wild Cambodian specimens as an initial breeding stock. Captive breeding can increase the population size and survivorship of the *G. a. sharpii* in Thailand, but the genetic diversity of the crane are also of immense importance as well, since the fixation of unfavorable alleles may drive the reemerging population to become extinct again. In this study, 14 polymorphic microsatellite primers isolated from a related species of *G. a. sharpii*, the whooping crane *G. americana* and the blue crane *Anthropoides paradisea*, were used to genotype and investigate genetic diversity of *G. a. sharpii* individuals collected from Khao Kheow open zoo (n = 11). Our results showed that deviations from Hardy-Weinberg equilibrium was only observed at locus Gram8, resulting from the presence of null allele. Three loci (Gpa12, Gpa34 and Gpa35) were in linkage disequilibrium. The averages of expected and observed heterozygosities were 0.59 and 0.61, respectively, indicating high genetic diversity in terms of heterozygosity and low inbreeding ( $F_{IS} = -0.03$ ). Therefore, our findings suggested that the breeding stocks may be suitable for crane captive breeding program for future reintroduction of *G. a. sharpii* in Thailand.

**Keywords:** genetic diversity, eastern sarus crane, polymorphism, microsatellite DNA, heterozygosity

## สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ข
บทคัดย่อภาษาไทย	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
สารบัญ	จ
สารบัญรูปภาพ	ฉ
สารบัญตาราง	ช
บทนำและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	1
วัตถุประสงค์ของโครงการ	5
วิธีการดำเนินงาน	6
ผลการทดลอง	8
วิจารณ์ผลการทดลอง	18
สรุปผลการศึกษา	19
เอกสารอ้างอิง	20

## สารบัญรูปภาพ

## หน้า

ภาพที่ 1 ผล electropherogram ที่แสดงรูปแบบอัลลีลแบบ homozygous allele ที่มีขนาดเท่ากับ 246.5 คู่เบส.....	9
ภาพที่ 2 ผล electropherogram ที่แสดงรูปแบบอัลลีลแบบ heterozygous allele ที่มีขนาดเท่ากับ 234.2 และ 238.3 คู่เบส.....	9

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1	ขนาดของอัลลีลที่ได้ในแต่ละตัวอย่างจากการวิเคราะห์ผล genotyping บริเวณโลคัส Gram6, Gram8, Gram11, Gram17, Gram20 และ Gram22.....	10
ตารางที่ 2	ขนาดของอัลลีลที่ได้ในแต่ละตัวอย่างจากการวิเคราะห์ผล genotyping บริเวณโลคัส Gram24, Gram25, Gram30, Gram31, Gram32a และ Gram41.....	11
ตารางที่ 3	ขนาดของอัลลีลที่ได้ในแต่ละตัวอย่างจากการวิเคราะห์ผล genotyping บริเวณโลคัส Gram42, Gram45, Gpa12, Gpa33, Gpa34 และ Gpa35.....	12
ตารางที่ 4	ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ซ้ำกัน จำนวนชุดซ้ำของนิวคลีโอไทด์ที่มากที่สุด ขนาดของอัลลีลและรูปแบบไพรเมอร์ของทั้ง 14 โลไซ.....	14
ตารางที่ 5	ค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ในการวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรมของประชากร นกกระเรียนพันธุ์ไทยในพื้นที่ของสวนสัตว์เปิดเขาเขียว ด้วย polymorphic loci จำนวน 10 โลไซ.....	17

การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกกระเรียนพันธุ์ไทย  
 (*Grus antigone sharpii*) ในพื้นที่สวนสัตว์เปิดเขาเขียวด้วยวิธีไมโครแซทเทลไลท์  
 Genetic diversity analysis of captive eastern sarus crane  
 (*Grus antigone sharpii*) in Khao Khew Open Zoo using microsatellite markers

อัมพร วิเวกแก้ว, ณัฐพจน์ วาฤทธิ และ รังสิณี สันคม  
 Amporn Wiwegweaw, Natapot Warrit and Rangsinee Sankhom

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
 ถนนพญาไท แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330  
 Department of Biology, Faculty of Science, Chulalongkorn University  
 Phyathai Road, Pathumwan, Bangkok, 10330

### บทนำและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

นกกระเรียน (crane) เป็นนกน้ำที่มีรูปร่างสวยงาม สูงโปร่ง มีคอและขายาว จัดอยู่ในวงศ์ Gruidae พบได้ 15 ชนิดทั่วโลก กระจายตัวอยู่ในเขตเอเชียตะวันออก ออสเตรเลีย อเมริกาเหนือและแอฟริกา (Meine & Archibald, 1996) ในประเทศไทยพบนกกระเรียนเพียงชนิดเดียว คือ *Grus antigone* ซึ่งแบ่งได้เป็น 4 ชนิดพันธุ์ย่อย คือ นกกระเรียนอินเดีย (Indian sarus crane: *Grus antigone antigone*), นกกระเรียนออสเตรเลีย (Australian sarus crane: *Grus antigone gillae*), นกกระเรียนเกาะลูซอน (Philippine sarus crane: *Grus antigone luzonica*) และนกกระเรียนพันธุ์ไทย (eastern sarus crane: *Grus antigone sharpii*) ซึ่งเป็นชนิดพันธุ์ย่อยที่เคยพบในประเทศไทยในอดีต นกกระเรียนพันธุ์ไทยมีแหล่งที่อยู่อาศัยบริเวณพื้นที่ชุ่มน้ำและที่ราบลุ่ม แหล่งอาหารจะมีทั้งพืชและสัตว์ พืชที่เป็นอาหารส่วนใหญ่จะเป็นพวกเมล็ดพืช เมื่อมีการบุกรุกแหล่งเพาะปลูกทางการเกษตรไปเป็นแหล่งที่อยู่อาศัยของมนุษย์และมีการเปลี่ยนแปลงพืชที่ใช้เพาะปลูกทางการเกษตร ทำให้แหล่งที่อยู่อาศัยและแหล่งอาหารของนกกระเรียนพันธุ์ไทยลดลง ส่งผลให้นกกระเรียนพันธุ์ไทยสูญพันธุ์ไปจากธรรมชาติของประเทศไทยในอดีต (Sanguansombat, 2005) จากเหตุการณ์ดังกล่าว ต่อมา ประเทศไทยได้ตระหนักถึงความสำคัญของนกกระเรียนพันธุ์ไทยและได้มีความพยายามของหน่วยงานหรือองค์กรสวนสัตว์ต่างๆ ในการคืนชีวิตให้กับนกกระเรียนพันธุ์ไทยได้กลับมาอาศัยอยู่ในถิ่นธรรมชาติเดิมในประเทศไทย โดยสวนสัตว์นครราชสีมา จังหวัดนครราชสีมา เป็นแหล่งเพาะพันธุ์นกกระเรียนพันธุ์ไทยแห่งแรกของประเทศไทย โดยได้ขอรับบริจาคคนกระเรียนที่มีถิ่นกำเนิดในประเทศกัมพูชา มาศึกษา



วิธีการเพาะเลี้ยงและขยายพันธุ์ในสภาพกรงเลี้ยง (Meine & Archibald, 1996) ต่อมาสวนสัตว์เปิดเขาเขียว และสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ จังหวัดชลบุรี สามารถเพาะเลี้ยงและขยายพันธุ์นกกกระเรียนพันธุ์ไทยในสภาพกรงเลี้ยงได้เช่นกัน ซึ่งการเพาะเลี้ยงและขยายพันธุ์นกกกระเรียนไม่ได้ต้องการเพียงแต่เพิ่มปริมาณประชากรในกรงเลี้ยงเพื่อนำไปปล่อยคืนสู่ธรรมชาติเท่านั้น แต่ยังต้องคำนึงถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากรในสภาพกรงเลี้ยงด้วย เพื่อความอยู่รอดของนกในสภาพแวดล้อมธรรมชาติที่อาจมีการเปลี่ยนแปลงอย่างฉับพลันหรือมีการแพร่ระบาดของเชื้อโรค การมีความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ต่ำ (เช่น เกิดการผสมพันธุ์กันภายในเครือญาติ) จะทำให้นกกกระเรียนพันธุ์ไทยมีสุขภาพที่ไม่แข็งแรง เจ็บป่วย ติดเชื้อโรคได้ง่าย และไม่สามารถทนทานต่อการคัดเลือกโดยธรรมชาติได้ จนสุดท้ายแล้วประชากรของนกกกระเรียนก็อาจจะสูญพันธุ์ไปจากธรรมชาติอีกครั้ง ดังนั้นการประเมินค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรนกกกระเรียนพันธุ์ไทยในสภาพกรงเลี้ยงก่อนทำการปล่อยคืนสู่ธรรมชาติจึงถือเป็นขั้นตอนสำคัญในการคืนชีวิตให้กับนกกกระเรียนพันธุ์ไทยอย่างยั่งยืน ทั้งนี้หากประชากรนกกสามารถดำรงชีวิตอยู่ในธรรมชาติได้สำเร็จ สถานภาพทางการอนุรักษ์ของนกกกระเรียนพันธุ์ไทยอาจยกระดับจากสถานภาพสูญพันธุ์แล้วจากธรรมชาติ (extinct in the wild) ของประเทศไทยเป็นสถานภาพของสิ่งมีชีวิตที่มีความเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ (critically endangered species) นอกจากนี้ยังเป็นการบ่งบอกความอุดมสมบูรณ์ของแหล่งพื้นที่ชุ่มน้ำและความเหมาะสมที่จะใช้พื้นที่เหล่านั้นเป็นแหล่งที่อยู่อาศัยของนก (ภูวดล โกมลนทีธร, 2555) ทั้งยังเป็นการเชื่อมเส้นทางการอยู่อาศัยของนกกกระเรียนพันธุ์ไทยในเขตภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ได้อีกด้วย (นุชจรี พีชคุณ, 2556)

การพิจารณาค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมสามารถดูได้จากค่า heterozygosity ซึ่งจะบอกสัดส่วนของอัลลีลแบบ heterozygous ของประชากร (Nei & Roychoudhury, 1974) ความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรนกกกระเรียนพันธุ์ไทยในสภาพกรงเลี้ยงจะมีค่าสูงถ้าหากมีการคัดเลือกพันธุ์ของประชากรตั้งต้นที่ดี เพราะฉะนั้นการคัดเลือกพันธุ์นกกกระเรียนพันธุ์ไทยให้มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงจึงเป็นขั้นตอนที่สำคัญก่อนการปล่อยนกกกระเรียนสู่ธรรมชาติ (นุชจรี พีชคุณ, 2556) ในการศึกษาครั้งนี้ได้นำไมโครแซทเทลไลท์ไพโรเมอร์ที่แสดงลักษณะ polymorphism (polymorphic primer) ที่เคยใช้ศึกษาใน whooping crane จำนวน 10 คู่ (Jones et al., 2010a, b) และจาก blue crane (Meares et al., 2008) จำนวน 4 คู่ มาเพิ่มปริมาณไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอและวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรนกกกระเรียนพันธุ์ไทยในพื้นที่สวนสัตว์เปิดเขาเขียว

## เอกสารที่เกี่ยวข้อง

นกกระเรียน (crane) เป็นนกน้ำขนาดใหญ่ รูปร่างสูงโปร่ง คอและขายาว มีลักษณะคล้ายกับนกกระสา (stork) และ นกยาง (heron) ความแตกต่างที่ใช้แยกนกทั้งสามชนิดนี้ คือ นกกระเรียนมีขนาดใหญ่ที่สุด ขณะบินจะเหยียดคอตรง นกกระสามีขนาดเล็กกว่านกกระเรียน ขณะบินจะเหยียดคอตรงเช่นกัน ส่วนนกยางขณะบินคอจะไม่เหยียดตรงแต่จะหดยกเข้าหาอก นกกระเรียนจัดอยู่ในวงศ์ Gruidae พบได้ 15 ชนิดทั่วโลก มีกระจายตัวอยู่ในเขตเอเชียตะวันออก ออสเตรเลีย อเมริกาเหนือและแอฟริกา (Meine & Archibald, 1996) ในประเทศไทยพบนกกระเรียนเพียงชนิดเดียว คือ *Grus antigone* ซึ่งแบ่งได้เป็น 4 ชนิดย่อย คือนกกระเรียนอินเดีย (Indian sarus crane: *Grus antigone antigone*) มีขนาดใหญ่ที่สุดในกลุ่มนกกระเรียน มีปลอกคอสีขาวคั่นอยู่ระหว่างคอตอนบนและคอตอนล่าง และขนตามลำตัวมีสีเทา นกกระเรียนพันธุ์ไทย (Eastern sarus crane: *Grus antigone sharpii*) เป็นชนิดย่อยที่เคยพบในประเทศไทย (Tanee et al., 2009) มีขนาดใหญ่รองลงมา ไม่มีปลอกคอสีขาวอยู่บริเวณคอ และมีขนตามลำตัวสีเทาเข้มกว่านกกระเรียนอินเดีย ปัจจุบันกระจายตัวอยู่ในประเทศจีน พม่า กัมพูชา และเวียดนาม นกกระเรียนออสเตรเลีย (Australian sarus crane: *Grus antigone gillae*) มีหนังเปลือกสีแดงอยู่บริเวณคอแต่จะไม่แผ่ขยายเท่ากับชนิดย่อยอื่นๆ (Archibald et al., 2003) และนกกระเรียนเกาะลูซอน (Philippine sarus crane: *Grus antigone luzonica*) นกกระเรียนชนิดย่อยนี้พบได้ที่ประเทศฟิลิปปินส์เท่านั้นซึ่งขณะนี้ได้สูญพันธุ์แล้ว (Meine & Archibald, 1996)

ลักษณะทางสัณฐานของนกกระเรียนเพศผู้และเพศเมียนั้นไม่มีความแตกต่างกัน แต่สามารถแยกเพศได้จากการดูขนาดตัว โดยนกกระเรียนเพศผู้จะมีขนาดตัวใหญ่กว่าเพศเมียอย่างชัดเจน (นุชจรี พิษุณ, 2556) นกกระเรียนพันธุ์ไทยมีแหล่งที่อยู่อาศัยบริเวณพื้นที่ชุ่มน้ำและที่ราบลุ่ม แหล่งอาหารของนกกระเรียนพันธุ์ไทยจะมีทั้งพืชและสัตว์ พืชที่เป็นอาหารส่วนใหญ่จะเป็นพวกเมล็ดพืช เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงพืชที่ใช้เพาะปลูกทางการเกษตรและเปลี่ยนแปลงแหล่งเพาะปลูกทางการเกษตรไปเป็นแหล่งที่อยู่อาศัยของมนุษย์ ทำให้แหล่งอาหารของนกกระเรียนลดลง สาเหตุหลักที่ทำให้จำนวนของนกกระเรียนพันธุ์ไทยลดลง คือการที่มนุษย์เข้ารุกรานแหล่งพื้นที่ชุ่มน้ำซึ่งเป็นแหล่งที่อยู่อาศัยหลักของนกกระเรียน (ภูวดล โภภณเตียร, 2555; Wood & Krajewski, 1996) จนในปัจจุบัน กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพันธุ์พืช และองค์การสวนสัตว์ในพระบรมราชูปถัมภ์ได้จัดให้นกกระเรียนพันธุ์ไทยอยู่ในบัญชีรายชื่อ 1 ใน 15 ชนิดสัตว์ป่าสงวนของประเทศไทย ตามพระราชบัญญัติสงวนและคุ้มครองสัตว์ป่า พ.ศ. 2535 และสำนักงานโครงการพัฒนาแห่งสหประชาชาติ (UNDP) จัดนกกระเรียนพันธุ์ไทยให้อยู่ในสถานภาพสูญพันธุ์แล้วจากธรรมชาติของประเทศไทย (Sanguansombat, 2005) การคืนชีวิตของนกกระเรียนพันธุ์ไทยให้กลับมาอาศัยอยู่ในถิ่นธรรมชาติเดิมของ

ประเทศไทยได้นั้น ไม่เพียงแต่จะเป็นการยกระดับสถานภาพทางการอนุรักษ์เท่านั้น แต่ยังเป็นการบ่งบอกความอุดมสมบูรณ์ของแหล่งพื้นที่ชุ่มน้ำและความเหมาะสมที่จะใช้พื้นที่เหล่านั้นเป็นแหล่งที่อยู่อาศัยของนกกระเรียนพันธุ์ไทย (ภูวดล โภภณเทียร, 2555) ทั้งยังเป็นการเชื่อมเส้นทางการอยู่อาศัยของนกกระเรียนในเขตภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ได้อีกด้วย (นุชจรี พีชคุณ, 2556)

สวนสัตว์นครราชสีมา จังหวัดนครราชสีมา เป็นแหล่งเพาะพันธุ์นกกระเรียนพันธุ์ไทยแห่งแรกของประเทศไทย โดยได้ขอรับบริจาคนกกระเรียนพันธุ์ไทยที่มีถิ่นกำเนิดในประเทศกัมพูชา มาศึกษาวิธีการเพาะเลี้ยงและขยายพันธุ์ในสภาพกรงเลี้ยง (Meine & Archibald, 1996) ต่อมาสวนสัตว์เปิดเขาเขียวและสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ จังหวัดชลบุรี สามารถเพาะเลี้ยงและขยายพันธุ์นกกระเรียนพันธุ์ไทยในสภาพกรงเลี้ยงได้เช่นกัน การเพาะเลี้ยงและขยายพันธุ์นกกระเรียนพันธุ์ไทยไม่ได้ต้องการเพิ่มปริมาณประชากรในกรงเลี้ยงเพื่อนำไปปล่อยสู่ถิ่นอาศัยเดิมได้เท่านั้น แต่ยังคงคำนึงถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากรในสภาพกรงเลี้ยงด้วย เพื่อความอยู่รอดของนกกระเรียนในสภาพแวดล้อมธรรมชาติที่อาจมีการเปลี่ยนแปลงอย่างฉับพลัน นกกระเรียนเป็นสัตว์หายาก มีพฤติกรรมการจับคู่ยากและเมื่อจับคู่ผสมพันธุ์แล้วจะผสมพันธุ์แบบคู่เดียวตลอดชีวิต เป็นเหตุให้ยากต่อการเพิ่มปริมาณประชากร ทั้งยังมีประชากรในธรรมชาติน้อยจึงเพิ่มโอกาสที่จะเกิดการผสมพันธุ์กันภายในเครือญาติ ทำให้ความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกกระเรียนพันธุ์ไทยต่ำลง (ธวัชชัย ธาณี, 2552) ผลเสียของการมีความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ต่ำจะทำให้นกกระเรียนมีสุขภาพที่ไม่แข็งแรง เจ็บป่วย ติดเชื้อโรคได้ง่าย และไม่สามารถทนทานต่อการคัดเลือกโดยธรรมชาติ จนสุดท้ายแล้วประชากรนกกระเรียนพันธุ์ไทยก็อาจจะสูญพันธุ์ไปจากธรรมชาติอีกครั้ง การพิจารณาค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมดูได้จากค่า heterozygosity ซึ่งจะบอกสัดส่วนของอัลลีลแบบ heterozygous ของประชากร (Nei & Roychoudhury, 1974) ความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรนกกระเรียนพันธุ์ไทยในสภาพกรงเลี้ยงจะมีค่าสูงถ้าหากมีการคัดเลือกพันธุ์ของประชากรตั้งต้นที่ดี เพราะฉะนั้นการคัดเลือกพันธุ์นกกระเรียนให้มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงจึงเป็นขั้นตอนที่สำคัญก่อนการปล่อยนกกระเรียนพันธุ์ไทยสู่ธรรมชาติ (นุชจรี พีชคุณ, 2556)

วิธีไมโครแซทเทลไลท์เป็นวิธีที่ศึกษาในระดับนิวเคลียร์ดีเอ็นเอที่สามารถแยกความแตกต่างทางพันธุกรรม (polymorphism) ได้ดี โดยมีลำดับเบสซ้ำกัน 2-6 เบสเป็นชุดๆ กระจายอยู่ทั่วจีโนม เช่น (AT)<sub>n</sub>, (CAG)<sub>n</sub> หรือ (GAAA)<sub>n</sub> จำนวนเบสซ้ำของสิ่งมีชีวิตที่แตกต่างกันนั้นทำให้เกิดความหลากหลายของอัลลีลในประชากรและสามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างอัลลีลแบบ homozygous และ heterozygous ได้ ซึ่งการหาค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมในประชากรนกกระเรียนพันธุ์ไทยในสภาพกรงเลี้ยงของประเทศไทยด้วยวิธีไมโครแซทเทลไลท์นั้นยังไม่เคยมีการรายงานมาก่อน จึงนำมาสู่วัตถุประสงค์ของโครงการคือ การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม (heterozygosity) ของประชากรนกกระเรียนพันธุ์ไทยในพื้นที่สวน

สัตว์เปิดเขาเขียวด้วยวิธีไมโครแซทเทลไลท์ โดยจะนำ polymorphic primer ที่ได้คัดเลือกไว้แล้วจากการศึกษาก่อนหน้านี้ (อัมพร วิเวกแก้วและคณะ, 2560) ด้วยวิธี cross-species amplification มาใช้วิเคราะห์ค่า heterozygosity ของประชากรนกระเรียนพันธุ์ไทย โดยผลการศึกษาที่ได้จะทำให้ทราบถึงโครงสร้างทางพันธุกรรมของนกระเรียนในสภาพกรงเลี้ยงในพื้นที่สวนสัตว์เปิดเขาเขียว ซึ่งข้อมูลที่ได้สามารถใช้เป็นแนวทางในการเพาะเลี้ยงขยายพันธุ์และอนุรักษ์นกระเรียนพันธุ์ไทยในสภาพกรงเลี้ยงก่อนปล่อยสู่ธรรมชาติ อีกทั้งยังเป็นประโยชน์ต่อโครงการปล่อยนกระเรียนพันธุ์ไทยคืนถิ่นให้ได้นกกระเรียนไทยที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง และสามารถปรับตัวในสิ่งแวดล้อมที่เปลี่ยนไปได้

#### วัตถุประสงค์ของโครงการ

เพื่อตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกระเรียนพันธุ์ไทยในสภาพกรงเลี้ยงในพื้นที่สวนสัตว์เปิดเขาเขียวด้วยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ

## วิธีการดำเนินงาน

### 2. วิธีการดำเนินงาน

#### 2.1 สถานที่ศึกษา

ในการศึกษาครั้งนี้ไม่ได้เก็บตัวอย่างขนนกกระเรียนพันธุ์ไทยใหม่ แต่ใช้ตัวอย่างเดิมที่ได้เก็บจากการศึกษาก่อนหน้า (อัมพร วิเวกแว่วและคณะ, 2560) จากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว ตำบลบางพระ อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี จำนวน 11 ตัวอย่าง ได้แก่ รุ่นพ่อแม่พันธุ์ตั้งต้น 9 ตัว และ รุ่นลูก 2 ตัว (ตัวอย่างหมายเลข 8-16, 34 และ 36 ตามลำดับ) มาสกัดดีเอ็นเอ

#### 2.2 การเพิ่มปริมาณไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส (Polymerase Chain Reaction: PCR)

นำ total DNA ที่สกัดได้จากโคนขนของนกกระเรียนพันธุ์ไทยมาเพิ่มปริมาณไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส (Polymerase Chain Reaction: PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ที่แสดง polymorphism (polymorphic primer) ที่ได้มาจากการคัดเลือกเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอด้วยวิธี cross-species amplification จากการศึกษา ก่อนหน้าจำนวน 14 คู่ (อัมพร วิเวกแว่วและคณะ, 2560) ได้แก่ polymorphic primer ที่ออกแบบมาจาก genomic library ของ whooping crane จำนวน 10 คู่ ได้แก่ Gram6, Gram8, Gram11, Gram17, Gram20, Gram22, Gram30, Gram32a, Gram42 และ Gram45 (Jones et al., 2010) และ polymorphic primer ที่ออกแบบมาจาก genomic library ของ blue crane จำนวน 4 คู่ ได้แก่ Gpa12, Gpa33, Gpa34 และ Gpa35

โดยในขั้นแรกทำการติดสีเรืองแสงให้กับ polymorphic primer ต่างๆ โดยสีเรืองแสงที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้คือ 6-FAM ซึ่งจะติดอยู่ที่ปลาย 5' ของ reverse primer จากนั้นนำ reverse primer ที่ติดสีเรืองแสงด้วย 6-FAM แทน reverse primer ธรรมดาในการเพิ่มปริมาณไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส (อัมพร วิเวกแว่วและคณะ, 2560) จากนั้นส่ง PCR product ที่ติดสีเรืองแสงไปวิเคราะห์หาขนาดของอัลลีลที่แน่ชัด (genotyping) ด้วยวิธี GeneScan ที่บริษัท MacroGen ประเทศสาธารณรัฐเกาหลี โดยทางบริษัทจะส่งผลที่ได้ในรูปแบบของ electropherogram ที่จะแสดง peak ของอัลลีลแบบ homozygous หรือ heterozygous พร้อมบอกค่าขนาดของอัลลีลที่แน่ชัดของแต่ละตัวอย่างให้ทราบอีกด้วย ทำให้สามารถนำค่าเหล่านี้ไปใช้คำนวณหาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ต่อไปได้

## 2.3 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ไมโครแซทเทลไลท์ (microsatellite products)

การเตรียมตัวอย่างที่ใช้สำหรับการหาลำดับนิวคลีโอไทด์นั้นมีขั้นตอนและ temperature profile ในการทำ PCR เหมือนกับการเพิ่มปริมาณไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ (อัมพร วิเวกแก้วและคณะ, 2560) แต่เพิ่มปริมาตรสุดท้ายจาก 10  $\mu$ l เป็น 30  $\mu$ l จากนั้นส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์ผลที่บริษัท Bioneer ประเทศสาธารณรัฐเกาหลี โดยจะได้ข้อมูลเป็นไฟล์ .abi กลับมา นำข้อมูลเหล่านี้มาตรวจดูลำดับการซ้ำและชุดการซ้ำของนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม MEGA เวอร์ชัน 5.2. (Tamura et al., 2013)

## 2.4 การวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรม

นำขนาดอัลลีลที่ได้ของแต่ละตัวอย่างในแต่ละโลคัส มาวิเคราะห์หาค่าความหลากหลายทางพันธุกรรม ด้วยโปรแกรมต่างๆ 3 โปรแกรม ได้แก่

**2.4.1 โปรแกรม Genepop เวอร์ชัน 4.3 (Raymond and Rousset, 1995; Raymond and Rousset, 2003)** ใช้วิเคราะห์ค่าต่างๆ ดังนี้

- ค่าจำนวนของอัลลีลต่อโลคัส ( $N_A$ )
- ค่าการเบี่ยงเบนออกจากสมดุล Hardy-Weinberg (HWE  $p$ -value)
- ค่า expected heterozygosity ( $H_E$ )
- ค่า observed heterozygosity ( $H_O$ )
- ค่า inbreeding coefficient ( $F_{IS}$ ) ซึ่งเป็นค่าที่แสดงการเกิดการผสมพันธุ์ในเครือญาติของประชากร

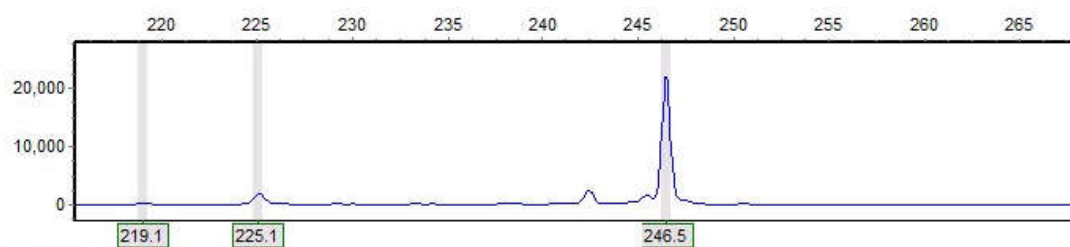
**2.4.2 โปรแกรม ML-NullFreq (Kalinowski and Taper, 2006)** ใช้หาค่า null allele frequency (NAF) ซึ่งเป็นค่าที่บ่งบอกว่าโลคัสใดมีโอกาสเกิดความผิดพลาดในการเพิ่มปริมาณไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอในขั้นตอน PCR ได้

**2.4.3. โปรแกรม FSTAT เวอร์ชัน 2.9.3 (Goudet, 2001)** ใช้ในการวิเคราะห์ค่า linkage disequilibrium (LD) ที่เกิดจากการแยกกันอย่างไม่เป็นอิสระของอัลลีลที่อยู่ต่างโลไซกัน (non-random association)

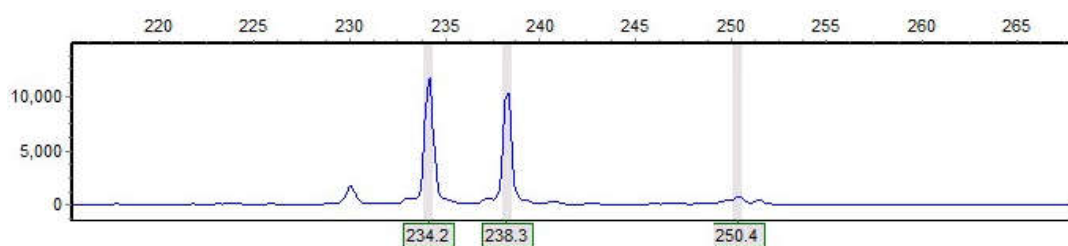
## ผลการทดลอง

### 3.1 ผลการทำ genotyping ด้วยวิธี GeneScan

ผลที่ได้จากการทำ genotyping ด้วยวิธี GeneScan จะแสดงในรูปแบบของ electropherogram (ภาพที่ 1 และ 2) ซึ่งนอกจากจะบอกขนาดอัลลีลที่แน่ชัดแล้ว ยังบ่งบอกรูปแบบของอัลลีลได้อีกว่าเป็นอัลลีลแบบ homozygous หรือ heterozygous อีกทั้งยังสามารถยืนยันสถานะของไพรเมอร์ที่ได้ว่าเป็น monomorphic primer หรือ polymorphic primer อีกด้วย ซึ่งผลของ genotyping สามารถนำไปเปรียบเทียบกับผลที่ได้จาก gel electrophoresis (อัมพร วิเวกแว่วและคณะ, 2560) ได้ว่ามีรูปแบบอัลลีลและสถานะของไพรเมอร์ตรงกันหรือไม่ โดยตารางที่ 1-3 แสดงขนาดและรูปแบบของอัลลีลที่ได้ของแต่ละตัวอย่างในแต่ละโลคัส ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับผลจาก gel electrophoresis ที่ศึกษาก่อนหน้านี้ กล่าวคือ ไพรเมอร์ทั้ง 14 คู่ ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ได้แก่ Gram6, Gram8, Gram11, Gram17, Gram20, Gram22, Gram30, Gram32a, Gram42, Gram45, Gpa12, Gpa33, Gpa34 และ Gpa35 เป็น polymorphic primer (มีขนาดอัลลีลตั้งแต่ 2 ขนาดขึ้นไป) ที่มีการปรากฏรูปแบบอัลลีลทั้งแบบ homozygous และ heterozygous ในขณะที่ไพรเมอร์จำนวน 4 คู่ ได้แก่ Gram24, Gram25, Gram31 และ Gram41 เป็น monomorphic primer ซึ่งทุกตัวอย่างแสดงอัลลีลแบบ homozygous ที่มีขนาดอัลลีลเพียง 1 ขนาดเท่านั้น (ตารางที่ 1-3)



ภาพที่ 1 ผล electropherogram ที่แสดงรูปแบบอัลลีลแบบ homozygous allele ที่มีขนาดเท่ากับ 246.5 คู่เบส



ภาพที่ 2 ผล electropherogram ที่แสดงรูปแบบอัลลีลแบบ heterozygous allele ที่มีขนาดเท่ากับ 234.2 และ 238.3 คู่เบส

หมายเหตุ แกน X คือ ขนาดของอัลลีล (คู่เบส)

แกน Y คือ ความสูงของ peak (RFU: Relative Fluorescent Units)



ตารางที่ 1 ขนาดของอัลลีลที่ได้ในแต่ละตัวอย่างจากการวิเคราะห์ผล genotyping บริเวณโลคัส Gram6, Gram8, Gram11, Gram17, Gram20 และ Gram22

Individual number	ขนาดอัลลีล (คู่เบส)					
	Gram6	Gram8	Gram11	Gram17	Gram20	Gram22
8	246	424, 428	258	373, 381	380, 392	161
9	234, 238	416	246, 262	369, 373	384, 404	161
10	234	420	246, 262	369, 373	380, 400	165
11	238, 242	428, 432	250, 262	373, 377	376, 384	161, 169
12	234, 242	428	250, 254	373, 377	384, 396	165, 169
13	234, 238	428	254, 262	373, 377	376, 384	161, 169
14	238, 242	416	246, 278	377	384, 404	161
15	234, 246	420, 436	262	373, 377	384, 388	161
16	234, 242	428, 432	250, 254	373, 377	376, 384	161, 169
34	238	428	254, 262	373	384	161, 165
36	234, 238	428	254, 262	373, 377	384	161

ตารางที่ 2 ขนาดของอัลลีลที่ได้ในแต่ละตัวอย่างจากการวิเคราะห์ผล genotyping บริเวณโลคัส Gram24, Gram25, Gram30, Gram31, Gram32a และ Gram41

Individual number	ขนาดอัลลีล (คู่เบส)					
	Gram24	Gam25	Gram30	Gram31	Gram32a	Gram41
8	357	161	177, 185	258	242	264
9	357	161	181, 185	258	238	264
10	357	161	173, 177	258	238, 242	264
11	357	161	169, 181	258	242	264
12	357	161	181, 185	258	238, 242	264
13	357	161	169, 181	258	238, 242	264
14	357	161	169, 177	258	238	264
15	357	161	181, 193	258	238, 242	264
16	357	161	181, 185	258	242	264
34	357	161	169, 185	258	238	264
36	357	161	169, 185	258	238, 242	264

ตารางที่ 3 ขนาดของอัลลีลที่ได้ในแต่ละตัวอย่างจากการวิเคราะห์ผล genotyping บริเวณโลคัส Gram42, Gram45, Gpa12, Gpa33, Gpa34 และ Gpa35

Individual number	ขนาดอัลลีล (คู่เบส)					
	Gram42	Gram45	Gpa12	Gpa33	Gpa34	Gpa35
8	166	262	205	108, 112	238, 268	174, 176
9	160	262	197, 205	100, 112	226, 244	170, 184
10	166	262	209, 213	92, 112	238, 250	170, 172
11	166	262	213	112, 116	225, 250	170
12	166	262	205, 213	112	226, 238	168, 170
13	166	262	205	112	226, 238	168, 170
14	160, 166	262	197, 205	96, 108	232, 244	170
15	160, 166	262	205	100, 108	238, 262	170
16	166	262	205, 213	104, 112	226, 238	170, 172
34	166	262	203, 213	104, 116	226, 238	–
36	166	262	205, 213	104, 116	226, 244	168, 170

### 3.2 ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ไมโครแซทเทลไลท์

ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม MEGA เวอร์ชัน 6.0 ให้ผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ซ้ำกัน และจำนวนชุดซ้ำในตำแหน่งไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ซ้ำกันของทั้ง 14 polymorphic loci มีทั้งลำดับที่เหมือนและแตกต่างกันในแต่ละโลคัส โดยมีลำดับการซ้ำกันตั้งแต่ 2 นิวคลีโอไทด์ ได้แก่  $(TG)_n(TA)_n$  และ  $(GT)_n$ ; 3 นิวคลีโอไทด์ ได้แก่  $(GTT)_n$  และ  $(CTT)_n$ ; 4 นิวคลีโอไทด์ ได้แก่  $(AGAT)_n$ ,  $(AGGT)_n$ ,  $(CTTT)_n$ ,  $(GTTT)_n$ ,  $(AAGG)_n$ ,  $(AAAC)_n$ ,  $(ATTG)_n$ ,  $(GATA)_n$  และ  $(TTTC)_n$ ; 6 นิวคลีโอไทด์ ได้แก่  $(TTTCTC)_n$  และมีลำดับการซ้ำของนิวคลีโอไทด์เป็นชุด ได้แก่  $(TTTC)_n(TC)_n(TTTC)_n$  โดยภายในตำแหน่งเดียวกันจะมีจำนวนชุดการซ้ำที่เหมือนหรือแตกต่างกันออกไป ขึ้นอยู่กับขนาดอัลลีลของแต่ละตัวอย่าง ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ซ้ำกัน จำนวนชุดซ้ำของนิวคลีโอไทด์ที่มากที่สุด ขนาดของอัลลีลและรูปแบบไพรเมอร์ของทั้ง 14 โลไซ

โลคัส	จำนวนชุดซ้ำของนิวคลีโอไทด์	ขนาดอัลลีล (คู่เบส)	Type of primer
Gram6	(AGGT) <sub>8</sub> (AGAT) <sub>10</sub>	234–258	Polymorphism
Gram8	(AGAT) <sub>2</sub> (AGGT) <sub>10</sub> (AGAT) <sub>14</sub>	384–436	Polymorphism
Gram11	(AGAT) <sub>18</sub>	246–286	Polymorphism
Gram17	(CTTT) <sub>13</sub>	365–381	Polymorphism
Gram20	(CTTT) <sub>18</sub>	376–404	Polymorphism
Gram22	(GTTT) <sub>9</sub>	161–169	Polymorphism
Gram24	(GTTT) <sub>5</sub>	357	Monomorphism
Gram25	(GTTT) <sub>3</sub>	161	Monomorphism
Gram30	(AAGG) <sub>18</sub>	161–193	Polymorphism
Gram31	(AAAC) <sub>4</sub>	259	Monomorphism
Gram32a	(ATTG) <sub>7</sub>	238–246	Polymorphism
Gram41	(GTT) <sub>4</sub> ...(GTT) <sub>2</sub>	264	Monomorphism
Gram42	(GTT) <sub>6</sub>	160–166	Polymorphism
Gram45	(CTT) <sub>7</sub>	262–265	Polymorphism
Gpa12	(GATA) <sub>11</sub>	197–217	Polymorphism
Gpa33	(TTTC) <sub>14</sub>	92–116	Polymorphism
Gpa34	(TTTCTC) <sub>16</sub>	225–280	Polymorphism
Gpa35	(TG) <sub>12</sub> (TA) <sub>4</sub>	168–184	Polymorphism

### 3.3 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรม

ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยนำ polymorphic loci จาก whooping crane จำนวน 10 โลไซ และจาก blue crane จำนวน 4 โลไซ มาใช้วิเคราะห์หาค่าพารามิเตอร์ต่างๆ เพื่อประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกกระเรียนพันธุ์ไทยในสภาพกรงเลี้ยงในสวนสัตว์เปิดเขาเขียว โดยค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ที่ได้ มีดังนี้ (ตารางที่ 5)

#### 3.3.1 ค่า linkage disequilibrium (LD)

จากผลการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม FSTAT พบการปรากฏของ LD ในคู่ของโลไซ (pairwise comparison) จำนวน 4 คู่ (พิจารณาจากค่า  $p$ -value < 0.01) ได้แก่ Gram6-Gpa35 ( $p = 0.003$ ), Gram11-Gpa12 ( $p = 0.000$ ), Gram30-Gpa12 ( $p = 0.010$ ) และ Gpa12-Gpa34 ( $p = 0.002$ ) ซึ่งผลที่ได้ยังไม่สามารถระบุได้แน่ชัดว่าที่โลคัสใดเป็นตำแหน่งที่มีการปรากฏ LD ที่แท้จริง ดังนั้นในขั้นตอนต่อไป ผู้วิจัยจึงตัดโลคัส Gpa12, Gpa34 และ Gpa35 (เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ที่ออกแบบมาจากจีโนมของ blue crane) ออก แล้วทำการวิเคราะห์ผลใหม่ ผลการวิเคราะห์ไม่พบการปรากฏค่า  $p$ -value < 0.01 ในทุกคู่โลไซ ที่ทำการเปรียบเทียบ จากผลที่ได้แสดงว่าโลคัส Gpa12, Gpa34 และ Gpa35 เป็นตำแหน่งที่มีการปรากฏ LD ที่แท้จริง หรืออาจกล่าวได้ว่าทั้ง 3 โลไซไม่สามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมต่อไปได้นั่นเอง

#### 3.3.2 ค่าการเบี่ยงเบนออกจากสมดุล Hardy-Weinberg (HWE $p$ -value) และ null allele frequency (NAF)

จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Genepop พบการเบี่ยงเบนออกจากสมดุล Hardy-Weinberg ที่บริเวณโลคัส Gram8 ( $H_0 = 0.36$ ,  $H_E = 0.74$ ; ตารางที่ 5) เพียงโลคัสเดียวเท่านั้น นอกจากนี้ยังพบการปรากฏของ null allele หรือ NAF (0.196) ที่โลคัสนี้อีกด้วย ดังนั้นเพื่อไม่ให้เกิดความผิดพลาดในการแปลผล ผู้วิจัยจำเป็นต้องตัดโลคัส Gram8 ออกจากการวิเคราะห์ผลในขั้นต่อไป

#### 3.3.3 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์จำนวน 10 โลไซ

ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยได้นำ polymorphic loci จำนวน 10 โลไซเท่านั้น ได้แก่ Gram6, Gram11, Gram17, Gram20, Gram22, Gram30, Gram32a, Gram42, Gram45 และ Gpa33 ที่ไม่มีการปรากฏค่า LD และค่า NAF มาเป็นเครื่องหมายทางพันธุกรรมเพื่อใช้วิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรนกกระเรียนพันธุ์ไทยในพื้นที่สวนสัตว์เปิดเขาเขียว จำนวน 11 ตัว ผลการวิเคราะห์พบว่าจำนวนอัลลีลต่อโลคัส ( $N_A$ ) มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 4.2 โดยจำนวนอัลลีลต่อโลคัสที่น้อยที่สุดมีค่าเท่ากับ 1 (Gram45) และจำนวนอัลลีลต่อโลคัสที่สูงที่สุดมีค่าเท่ากับ 8 (Gram20) ค่า expected heterozygosity ( $H_E$ ) มีค่าเฉลี่ย

เท่ากับ 0.59 โดยมีค่าต่ำสุดเท่ากับ 0.00 (Gram45) และค่าสูงสุดเท่ากับ 0.80 (Gram11 และ Gram30) ค่า observed heterozygosity ( $H_O$ ) มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.61 โดยมีค่าต่ำสุดเท่ากับ 0.00 (Gram45) และค่าสูงสุดเท่ากับ 1.00 (Gram30) (ตารางที่ 5) จากค่า heterozygosity ( $H_E$  และ  $H_O$ ) ที่ได้จะเห็นได้ว่านกกระเรียนพันธุ์ไทยในสวนสัตว์เปิดเขาเขียวมีความหลากหลายทางพันธุกรรมค่อนข้างสูง (ค่าเฉลี่ย  $H_E$  และ  $H_O > 0.5$ ) นอกจากนี้ยังพบว่าค่า  $F_{IS}$  มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ -0.030 ซึ่งค่าที่ได้มีค่าเป็นลบและมีค่าใกล้เคียงศูนย์ แสดงว่านกกระเรียนพันธุ์ไทยในสวนสัตว์เปิดเขาเขียวมีการเกิด inbreeding น้อยมาก โดยผลที่ได้ให้การแปรผลที่ตรงข้ามกับการวิเคราะห์เมื่อรวมโลคัส Gram8 เข้าไป ( $F_{IS} = 0.029$ ) (ตารางที่ 5) ดังนั้นหากนำโลคัสที่แสดง null allele ไปใช้เป็นเครื่องหมายทางพันธุกรรมจะทำให้การแปรผลของข้อมูลได้ค่าที่แตกต่างจากความเป็นจริง

ตารางที่ 5 ค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ในการวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรมของประชากรนกกกระเรียนพันธุ์ไทยในพื้นที่ของสวนสัตว์เปิดเขาเขียว ด้วย polymorphic loci จำนวน 10 โลไซ

สวนสัตว์เปิดเขาเขียว							
Locus	N	$N_A$	$H_E$	$H_O$	$F_{IS}$	HWE $p$ -value	NAF
Gram6	11	4	0.75	0.73	0.030	0.675	0.025
<b>Gram8</b>	11	6	0.74	0.36	0.506	0.005*	<b>0.196</b>
Gram11	11	6	0.80	0.82	-0.017	0.227	0.022
Gram17	11	4	0.63	0.82	-0.304	0.428	0.000
Gram20	11	8	0.74	0.82	-0.111	0.500	0.000
Gram22	11	3	0.56	0.45	0.187	0.293	0.047
Gram30	11	6	0.80	1.00	-0.243	0.715	0.000
Gram32a	11	2	0.53	0.45	0.138	1.000	0.030
Gram42	11	2	0.32	0.18	0.429	0.279	0.112
Gram45	11	1	0.00	0.00	NA	NA	0.000
Gpa33	11	6	0.79	0.82	-0.040	0.720	0.000
Average	11	4.4	0.61	0.59	0.029		
Average†	11	4.2	0.59	0.61	-0.030		

หมายเหตุ:

$N_A$  : จำนวนของอัลลีลต่อโลคัส

$H_E$  : ค่า expected heterozygosity

$H_O$  : ค่า observed heterozygosity

$F_{IS}$  : ค่า inbreeding coefficient

HWE  $p$ -value : ค่าความน่าจะเป็นที่จะเข้าสู่สมดุลของ Hardy-Weinberg เมื่อ  $p > 0.05$

NAF : ค่า null allele frequency

\* : พบการเบี่ยงเบนออกจากสมดุล Hardy-Weinberg อย่างมีนัยสำคัญ

ตัวหนา : โลคัสที่พบ NAF

† : การวิเคราะห์ผลโดยไม่รวมโลคัส Gram8



## วิจารณ์ผลการศึกษา

### 4.1 การทำ genotyping ด้วยวิธี GeneScan

จากผลการคัดกรองเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอทั้งจากวิธี gel electrophoresis และ genotyping จะเห็นได้ว่า แม้ว่าปัจจุบัน จะยังไม่มีเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอที่เป็น species-specific marker กับจีโนมของนกกกระเรียนพันธุ์ไทย แต่การนำไพรเมอร์ที่ออกแบบมาจากจีโนมของนกกกระเรียนชนิดอื่นที่มีความใกล้ชิดทางวิวัฒนาการกับนกกกระเรียนพันธุ์ไทย เช่น จาก whooping crane (นกในสกุลเดียวกัน) และจาก blue crane (นกต่างสกุลกัน) มาเพิ่มปริมาณไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอด้วยวิธี cross-species amplification นั้น ก็สามารถนำมาเพิ่มปริมาณไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอและหาค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกกกระเรียนพันธุ์ไทยได้อย่างดี แต่อย่างไรก็ตามจำนวนของ monomorphic primer และ polymorphic primer ที่ได้นั้นอาจจะเหมือนหรือแตกต่างจากการศึกษาก่อนหน้าก็ได้ ที่ผ่านการศึกษาโครงสร้างทางพันธุกรรมของนกกกระเรียนหลายชนิดนิยมนำไพรเมอร์ที่ได้จากวิธี cross-species amplification มาใช้เพื่อเพิ่มความสะดวกและความรวดเร็วในการศึกษา เช่น การศึกษาใน sandhill crane (Henkel et al., 2012; Jones et al., 2005) ใน grey crowned crane และ wattled crane (Meares et al., 2009) และใน red-crowned crane (Zou et al., 2010) เป็นต้น

### 4.2 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ไมโครแซทเทลไลท์

ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของนกกกระเรียนพันธุ์ไทยในทุกโลไซพบว่ามีรูปแบบการซ้ำของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนและแตกต่างกับการศึกษาใน whooping crane (Jones et al., 2010a) และ blue crane (Meares et al., 2008) โดยโลไซที่แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างจากการศึกษาใน whooping crane มี 9 โลไซ ได้แก่ Gram8, Gram20, Gram22, Gram24, Gram31, Gram32a, Gram41, Gram42 และ Gram45 และใน blue crane มี 2 โลไซ ได้แก่ Gpa33 และ Gpa35 ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งไมโครแซทเทลไลท์ของนกแต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน

### 4.3 การวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรม

ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยพบการเบี่ยงเบนออกจากสมดุล Hardy-Weinberg ที่บริเวณโลคัส Gram8 ซึ่งเป็นโลคัสเดียวกันที่เกิดการเบี่ยงเบนออกจากสมดุล Hardy-Weinberg ใน whooping crane และ Florida sandhill crane ด้วย (Jones et al., 2010a) และตรวจพบค่า NAF ที่โลคัส Gram8 อีกด้วย รวมทั้งตรวจพบการปรากฏของ LD ที่โลคัส Gpa12, Gpa33 และ Gpa34 จากข้อมูลดังกล่าว ผู้วิจัยจึงไม่สามารถนำ 4 polymorphic loci เหล่านี้มาใช้วิเคราะห์ค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรนกกกระเรียนพันธุ์ไทยในพื้นที่สวนสัตว์เปิดเขาเขียวได้ เพราะจะทำให้การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม

(heterozygosity) มีความคลาดเคลื่อนกับค่าที่ควรจะเป็นจริง (เช่น ได้ค่า heterozygosity ต่ำกว่าความเป็นจริง หรือเกิดการเพิ่มขึ้นของ homozygous allele มากเกินไป (homozygote excess)) นอกจากนี้ยังพบว่า โลกัสที่ตรวจพบ LD นั้นเป็นเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ที่ออกแบบมาจากจีโนมของ blue crane ทั้งหมด ซึ่งเป็นนกรกระเรียนต่างสกุลกับนกรกระเรียนพันธุ์ไทย

จากการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรนกรกระเรียนพันธุ์ไทยในพื้นที่สวนสัตว์เปิดเขาเขียวด้วยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์จำนวน 10 โลกัส พบว่าจำนวนอัลลีลต่อโลกัสมีค่าค่อนข้างสูง (ค่าเฉลี่ย = 4.2) และประชากรนกรกระเรียนที่ศึกษามีแนวโน้มอยู่ในสมดุลของ Hardy–Weinberg (ค่า HWE  $p$ -value ของทุกโลกัสมีค่ามากกว่า 0.05) ซึ่งทำให้คาดเดาได้ว่าค่า  $H_O$  และ  $H_E$  ของประชากรนี้ต้องมีค่าที่ใกล้เคียงกัน ซึ่งตรงกับผลการศึกษาที่ได้ค่า  $H_O = 0.61$  และ  $H_E = 0.59$  จากค่า  $H_O$  และ  $H_E$  ที่ได้แสดงว่าประชากรนกรกระเรียนจากสวนสัตว์เปิดเขาเขียวมีความหลากหลายทางพันธุกรรม (heterozygosity) ค่อนข้างสูง เมื่อเปรียบเทียบกับค่า  $H_O$  ที่ได้จากการศึกษาในนกรกระเรียนชนิดอื่นๆ เช่น จาก whooping crane ( $H_O$ : 0.04–0.79, ค่าเฉลี่ย = 0.46) (Jones et al., 2010a), sandhill crane ( $H_O$ : 0.22–0.98, ค่าเฉลี่ย = 0.55) (Henkel et al., 2012) และ red-crowned crane ( $H_O$ : 0.21–0.59, ค่าเฉลี่ย = 0.47 island population;  $H_O$ : 0.54–0.96, ค่าเฉลี่ย = 0.70 mainland population) (Hasegawa et al., 2000) แต่มีค่าต่ำกว่าเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับ blue crane ( $H_O$ : 0.50–0.95, ค่าเฉลี่ย = 0.76) (Meares et al., 2008) และ Siberian crane ( $H_O$ : 0.53–0.93, ค่าเฉลี่ย = 0.74) (Mudrik et al., 2014)

### สรุปผลการศึกษา

จากผลการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกรกระเรียนพันธุ์ไทย แสดงให้เห็นว่านอกจากสวนสัตว์เปิดเขาเขียวมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงเนื่องจากค่า heterozygosity ที่วิเคราะห์ได้มีค่ามากกว่า 0.5 มีการเกิด inbreeding ต่ำ เพราะค่า  $F_{IS}$  จากการวิเคราะห์ให้ค่าน้อยกว่าศูนย์ จากผลที่ได้สามารถสรุปได้ว่านกรกระเรียนพ่อแม่พันธุ์ตั้งต้นจากสวนสัตว์เปิดเขาเขียวมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง และเหมาะสมที่จะใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ในการเพิ่มจำนวนประชากรในกรงเลี้ยงต่อไปในอนาคตได้ เพื่อเป็นตัวแทนประชากรที่จะนำกลับไปปล่อยคืนสู่พื้นที่ชุ่มน้ำในธรรมชาติของประเทศไทยต่อไป

### เอกสารอ้างอิง

- ธวัชชัย ธาณี. 2552. ความหลากหลายทางชีวภาพและการจัดการ: กรณีศึกษานกกระเรียนไทย. ก้าวทันโลก วิทยาศาสตร์ 9: 117–119.
- นุชจรี พีชคุณ. 2556. นกกระเรียนพันธุ์ไทย. วารสารธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม 2: 6–15. 108.
- ภูวดล โกมณเทียร. 2555. นกกระเรียนพันธุ์ไทยคืนถิ่น: ข้อกำหนดและตัวชี้วัดสำหรับการประเมินพื้นที่ชุ่มน้ำที่เหมาะสม. วารสารวิทยาศาสตร์ มข.40: 1013–1024.
- ภูวดล โกมณเทียร. 2555. นกกระเรียนพันธุ์ไทยคืนถิ่น: ข้อกำหนดและตัวชี้วัดสำหรับการประเมินพื้นที่ชุ่มน้ำที่เหมาะสม. วารสารวิทยาศาสตร์ มข 40: 1013–1024.
- อัมพร วิเวกแว่ว, ญัฐพจน์ วาฤทธิ และ รังสิณี สันคม. 2560. การคัดเลือกเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอสำหรับนกกระเรียนพันธุ์ไทย (*Grus antigone sharpii*) ในสภาพกรงเลี้ยง. รายงานฉบับสมบูรณ์. โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี สนองพระราชดำริโดยจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (โครงการ อพ.สธ.-จพ.) ประจำปีงบประมาณ 2560.
- Archibald, G. W., Gopi Sundar, K. S. and Barzen, J. 2003. A review of the three subspecies of sarus cranes *Grus antigone*. Journal of Ecological Society 16: 5–15.
- Goudet, J. 2001. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices version 2.9.3. <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>.
- Hasegawa, O., Ishibashi, Y. and Abe, S. 2000. Isolation and characterization of microsatellite loci in the red-crowned crane *Grus japonensis*. Molecular Ecology 9: 1677–1678.
- Henkel, J. R., Jones, K. L., Hereford, S. G., Savoie, M. L., Leibo, S. P. and Howard, J. J. 2012. Integrating microsatellite and pedigree analyses to facilitate the captive management of the endangered Mississippi sandhill crane (*Grus canadensis pulla*). Zoo Biology 31: 322–335.
- Jones, K. L., Barzen, J. A. and Ashley, M. V. 2005. Geographical partitioning of microsatellite variation in the sarus crane. Animal Conservation 8: 1–8.
- Jones, K. L., Henkel, J. R., Howard, J. J., Lance, S. L., Hagen, C. and Glenn, T. C. 2010a. Isolation and characterization of 14 polymorphic microsatellite DNA loci for the endangered whooping crane (*Grus americana*) and their applicability to other crane species. Conservation Genetics Resources 2: 251–254.

- Jones, K. L., Henkel, J. R., Howard, J. J., Lance, S. L., Hagen, C. and Glenn, T. C. 2010b. Erratum to: Isolation and characterization of 14 polymorphic microsatellite DNA loci for the endangered whooping crane (*Grus americana*) and their applicability to other crane species. *Conservation Genetics Resources* 2: 255–255.
- Jones, K. L., Krapu, G. L., Brandt, D. A. and Ashley, M. V. 2005. Population genetic structure in migratory sandhill cranes and the role of Pleistocene glaciations. *Molecular Ecology* 14: 2645–2657.
- Kalinowski, S. T. and Taper, M. L. 2006. Maximum likelihood estimation of the frequency of null alleles at microsatellite loci. *Conservation Genetics* 7: 991–995. 105
- Meares, K., Dawson, D. A., Horsburgh, G. J., Glenn, T. C., Jones, K. L., Braun, M. J., Perrin, M. R. and Taylor, T. D. 2009. Microsatellite loci characterized in three African crane species (Gruidae, Aves). *Molecular Ecology Resources* 9: 308–311.
- Meares, K., Dawson, D. A., Horsburgh, G. J., Perrin, M. R., Burke, T. and Taylor, T. D. 2008. Characterisation of 14 blue crane *Grus paradisea* (Gruidae, AVES) microsatellite loci for use in detecting illegal trade. *Conservation Genetics* 9: 1363–1367.
- Meine, C. and Archibald, G. 1996. *The Cranes: Status Survey and Conservation Action Plan*. Gland, Switzerland: IUCN.
- Mekong wetlands biodiversity programme. 2006. MWBP Working Papers on Eastern Sarus Crane, *Grus antigone sharpii*. MWBP, Vientianne, Lao PDR.
- Mudrik, E., Kashentseva, T., Gamburg, E. and Politov, D. 2014. Genetic passportization and identification of Siberian cranes (*Grus leucogeranus* Pallas) in captivity. *Biology Bulletin* 41: 208–215.
- Nei M. and Roychoudhury A.K. 1974. Sampling variances of heterozygosity and genetic distance. *Genetics*. 76: 379–390.
- Raymond, M. and Rousset, F. 1995. GENEPOP (version 1.2): Population genetics software for exact tests and ecumenism. *Journal of Heredity* 86: 248–249.
- Raymond, M. and Rousset, F. 2003. A population genetic software for exact test and ecumenism: GENEPOP, version 3.4. *Heredity* 68: 248–249.
- Sanguansombat, W. 2005. *Thailand Red Data: Birds*. Bangkok, Thailand: Office of Natural Resources and Environment Policy and Planning.

- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. and Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725–2729.
- Tanee, T., Chaveerach, A., Anuniwat, A., Tanomtong, A., Pinthong, K., Sudmoon, R. and Morkkamul, P. 2009. Molecular analysis for genetic diversity and distance of introduced *Grus antigone sharpii* L. to Thailand. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 12: 163–167.
- Wood T.C. and Krajewski C. 1996. Mitochondrial DNA sequence variation among the subspecies of sarus crane (*Grus antigone*). *The Auk*. 113: 655–663.
- Zou, H., Dong, H., Kong, W., Ma, J. and Liu, J. 2010. Characterization of 18 polymorphic microsatellite loci in the red-crowned crane (*Grus japonensis*), an endangered bird. *Animal Science Journal* 81: 519–522.