

ผลงานที่เป็นผลการดำเนินงานที่ผ่านมา

การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์สัตว์วงศ์กวางเพื่อประโยชน์ในการจำแนกสัตว์ป่าของกลาง
Study on nucleotides sequences of Cervidae for confiscated animals' identification

กณิตา อู่ยถาวร
KANITA OUITAVON

ตำแหน่ง นักวิทยาศาสตร์ ระดับ 5
ขอประเมินเป็นตำแหน่ง นักวิทยาศาสตร์ ระดับ 6ว

สำนักอนุรักษ์สัตว์ป่า
กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช
พ.ศ. 2551

บทคัดย่อ

การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อจำแนกชนิดสัตว์วงศ์กวาง คือ กวางป่า, ละมั่ง พันธุ์พม่า, ละมั่งพันธุ์ไทย, เนื้อทราย, เก้งธรรมดา และเก้งหม้อ โดยศึกษาจากตัวอย่างเลือด นำมาสกัดดีเอ็นเอ แล้วนำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนอินตรอน1 ของยีนโปรตีนไคนเนสซีไอโอต้า (PRKCI) ด้วยวิธีโพลีเมอเรสเชนรีแอคชั่น (Polymerase Chain Reaction ; PCR) โดยใช้คู่ไพรเมอร์ L748 และ U26 ภายใต้สภาพอุณหภูมิที่เหมาะสม คือ ขั้นทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพ (denaturation step) 94°C 20 วินาที ขั้นการเกาะของไพรเมอร์ (annealing step) 53°C 30 วินาที และขั้นเพิ่มความยาวของสายนิวคลีโอไทด์ (extension step) 72°C 1 นาที เป็นจำนวน 35 รอบ ได้ชิ้นส่วนลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนอินตรอน1 ของยีนโปรตีนไคนเนสซีไอโอต้า (PRKCI) ของสัตว์วงศ์กวางแต่ละชนิดมีความยาวประมาณ 514 เบสแพร์ ซึ่งสามารถใช้เป็นฐานข้อมูลพันธุกรรมในฐานข้อมูลของ NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) หรือ GENBANK เพื่อใช้เปรียบเทียบชนิดพันธุ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ สัตว์วงศ์กวางชนิดต่างๆ เพื่อใช้ประโยชน์ในการจำแนกชนิดสัตว์ป่าของกลางได้

คำหลัก : สัตว์วงศ์กวาง, ลำดับนิวคลีโอไทด์, การจำแนกชนิดสัตว์ของกลาง, ยีนโปรตีนไคนเนสซีไอโอต้า

Abstract

Study was conducted on nucleotides sequences for cervid species identification; sambar deer, thamin eld's deer, siamensis eld's deer, hog deer, common barking deer and fea's barking deer. Blood samples of these deer species were collected from captivity for whole genomic DNA extraction. Intron 1 of protein kinase C iota gene (*PRKCI*) (approximately 514 bp) was amplified by polymerase chain reaction (PCR) method using a suite of known primer (L748 and U26) and amplification was done on the thermal cycling consisting of initial denaturation step at 94°C for 4 min, 35 cycles of denaturation step at (94°C, 20s), annealing step at (53°C, 30s) and extension step at (72°C, 1 min) and a final extension step of 5 min at 72°C. The results of these sequences were submitted on GENBANK (NCBI; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) for further uses for confiscated animal species identification.

Keywords: Cervidae, Nucleotides sequences, confiscated animal species identification, Protein kinase iota (*PRKCI*)

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อ.....	(1)
Abstract.....	(2)
สารบัญ.....	(3)
สารบัญตาราง.....	(4)
สารบัญภาพ.....	(5)
บทนำ.....	1
วัตถุประสงค์.....	2
การตรวจเอกสาร.....	2
วิธีการศึกษา.....	13
ผลการศึกษา.....	17
สรุปผลการศึกษา.....	21
ข้อเสนอแนะ.....	21
เอกสารอ้างอิง.....	22

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 การจัดจำแนกอนุกรมวิธานของกวางในวงศ์ย่อย *Cervinae* โดยใช้หลักเกณฑ์
การวิเคราะห์เปรียบเทียบวิธีการต่างๆ.....6

หน้า

ภาพที่ 1	แก้งธรรมดา (<i>Munticus muntjak</i> ; Red muntjac หรือ Barking deer).....	10
ภาพที่ 2	แก้งหม้อ (<i>Muntiacus feae</i> ; Fea's muntjac).....	11
ภาพที่ 3	กวางป่า (<i>Cervus unicolor</i> ; Sambar deer).....	12
ภาพที่ 4	ละอง หรือละมั่ง (<i>Cervus eldii siamensis</i> ; Eld's deer).....	12
ภาพที่ 5	เนื้อทราย (<i>Cervus pornicus</i> ; Hog deer).....	13
ภาพที่ 6	การใส่ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ (PKU8) ในฐานข้อมูลของ NCBI.....	20
ภาพที่ 7	ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ (Blastn) ในฐานข้อมูล NCBI.....	20

บทนำ

สัตว์วงศ์กวาง (Family Cervidae) อยู่ในอันดับ (Order) Artiodactyla, อันดับย่อย (Suborder) Ruminantia, Infraorder Pecora ซึ่งมีลักษณะพิเศษประจำวงศ์ คือ มีเขา (Antlers) ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของกระดูก มีกระดูกเป็นแกนกลาง ซึ่งจะถูกห่อหุ้มด้วยผิวหนังที่มีลักษณะเป็นกำมะหยี่ และมีการผลัดเขาเป็นประจำทุกปี สัตว์วงศ์นี้มีลำตัวยาวสง่างาม คอและขาเรียวยาว หางสั้น และมีดวงตากลมโต โดยมากจะมีต่อมขนาดใหญ่ (lacrimal gland) ที่ขอบด้านในของดวงตาทั้งสองข้าง และมีต่อมกลิ่นอยู่ระหว่างอุ้งกับเท้า สัตว์วงศ์กวางเป็นสัตว์กินพืช (herbivores) โดยกินพืชจำพวกหญ้า เปลือกไม้กิ่งไม้อ่อนและใบไม้อ่อนเป็นอาหาร มีถิ่นอาศัยอยู่บนบกซึ่งมีสภาพทางนิเวศวิทยาได้หลากหลายแบบ ซึ่งกวางแต่ละชนิดมีความสามารถในการปรับตัวเข้ากับสภาพนิเวศวิทยาแบบต่างๆ ได้อย่างกว้างขวาง

การจำแนกสัตว์วงศ์กวางในปัจจุบันจำแนกโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphological traits) เป็นหลัก โดยลักษณะแรกที่ใช้จำแนก คือ การปรากฏเขา หรือไม่ปรากฏเขา (presence or absence of antlers) คือวงศ์ย่อย Hydropotinae (กวางไม่มีเขา) ได้ถูกจำแนกเป็นกวางที่มีสายวิวัฒนาการเริ่มแรก (the antlerless sister group) ลักษณะต่อมาที่ใช้ในการจำแนก คือ กระดูกนิ้วมือ ลักษณะของกระดูกนิ้วมือนี้สามารถจำแนกสัตว์วงศ์กวางได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ 1) The telemetacarpalian คือ พวกที่กระดูกนิ้วที่ 2 และ 5 อยู่ห่างกัน และแผ่ออกไปด้านข้าง ได้แก่ วงศ์ย่อย Odocoileinae และ 2) The plesiommetacarpalian คือ พวกที่กระดูกนิ้วที่ 2 และ 5 อยู่ชิดติดกัน ได้แก่วงศ์ย่อย Cervidae และ Muntiacinae

สัตว์วงศ์กวางในประเทศไทย มีจำนวนทั้งสิ้น 2 สกุล 6 ชนิด คือ 1) สกุล *Muntiacus* ได้แก่ เก้งธรรมดา (*Muntiacus muntjak*) และเก้งหม้อ (*Muntiacus feae*) และ 2) สกุล *Cervus* ได้แก่ กวางป่า (*Cervus unicolor*) , ละอง หรือละมั่ง (*Cervus eldii*) , สมัน (*Cervus schomburgki*) และ เนื้อทราย (*Cervus porcinus*) ในจำนวนนี้มี 4 ชนิดที่ถูกจัดสถานภาพโดย IUCN และอยู่ภายใต้การควบคุมของอนุสัญญาไซเตส คือ เก้งหม้อ ถูกจัดอยู่ในสถานภาพข้อมูลไม่เพียงพอ (Data Deficient - DD), ละอง หรือละมั่ง ถูกจัดอยู่ในสถานภาพมีแนวโน้มจะสูญพันธุ์ (Vulnerable - Vu) และอยู่ใน Appendix I ของอนุสัญญา CITES, สมัน ถูกจัดอยู่ในสถานภาพสูญพันธุ์ (Extinct - Ex) และเนื้อทราย ถูกจัดอยู่ในสถานภาพข้อมูลไม่เพียงพอ และอยู่ใน Appendix I ของอนุสัญญา CITES การสูญพันธุ์ของสัตว์วงศ์กวาง คือสมัน และการเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ของสัตว์วงศ์กวางในประเทศไทย โดยเฉพาะละองหรือละมั่ง และเนื้อทราย ซึ่งได้สูญพันธุ์ไปจากป่าธรรมชาติของประเทศไทยแล้ว นั้น มีสาเหตุเนื่องมาจากการบุกรุกทำลายพื้นที่ป่าไม้ การขยายพื้นที่เกษตรกรรมและพื้นที่อยู่อาศัย

ของมนุษย์ ทำให้ถิ่นที่อยู่อาศัยของสัตว์วงศ์กวางได้ลดน้อยลงอย่างรวดเร็ว และถึงแม้ประเทศไทยยังคงมีแก่งและกวางป่าอาศัยอยู่ในพื้นที่ป่าธรรมชาติอยู่พอสมควร แต่ก็ยังไม่เคยมีการศึกษาวิจัยในระดับโมเลกุลของสัตว์วงศ์กวางในประเทศไทยแต่อย่างใด ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาเพื่อให้ได้ข้อมูลในระดับโมเลกุล หรือในระดับพันธุกรรม ซึ่งข้อมูลในระดับพันธุกรรมนี้จะมีความสำคัญอย่างยิ่งที่จะนำมาใช้ในการจัดการและอนุรักษ์พันธุกรรมของสัตว์วงศ์กวางได้อย่างมีประสิทธิภาพ และทันที่ต่อสถานการณ์ที่สภาพแวดล้อมธรรมชาติถูกทำลายลงอย่างมากในปัจจุบัน โดยเฉพาะการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของสัตว์วงศ์กวางนี้จะสามารถนำไปใช้ตรวจสอบซากสัตว์ป่าวงศ์กวาง ซึ่งในกลุ่มสัตว์วงศ์กวางนี้ โดยมากของกลางที่ยึดได้มักเป็นก้อนชิ้นเนื้อซึ่งไม่ทราบชนิดที่แน่นอน ดังนั้นการที่มีฐานข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ จึงสามารถใช้ตรวจสอบชนิดซากสัตว์วงศ์กวางได้ถูกต้อง เพื่อให้การจัดการสัตว์ป่าของกลางในขั้นต่อไปกระทำได้ง่าย และมีประสิทธิภาพมากขึ้น

วัตถุประสงค์

1. เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของสัตว์วงศ์กวาง คือ แก่งธรรมดา, แก่งหม้อ, กวางป่า, ละมั่ง และเนื้อทราย
2. เพื่อเป็นฐานข้อมูลพันธุกรรม ใช้ในการตรวจสอบชนิดซากสัตว์ป่าของกลางในกลุ่มที่เป็นสัตว์วงศ์กวางได้อย่างถูกต้อง

การตรวจเอกสาร

อนุกรมวิธานของสัตว์วงศ์กวาง

Lekagul และ McNeely (1977) ได้จำแนกสัตว์วงศ์กวาง (Family Cervidae) ออกเป็น 4 วงศ์ย่อย (Subfamily) คือ

- 1) วงศ์ย่อย Moschinae ได้แก่ กวางชะมดเอเชีย (Asian musk deer) 1 สกุล คือ *Moschus*
- 2) วงศ์ย่อย Cervinae ได้แก่ กวางโลกเก่า (Old World deer) 3 สกุล คือ *Cervus*, *Elaphurus* และ *Platyceros*
- 3) วงศ์ย่อย Muntiacinae ได้แก่ แก่งเอเชีย (Asian muntjacs) 2 สกุล คือ *Muntiacus* และ *Elaphodus*
- 4) วงศ์ย่อย Odocoileinae ได้แก่ กวางในทวีปอเมริกาใต้ 5 สกุล, ในเขต Eurasia 2 สกุล และในทวีปอเมริกาเหนือ, ยุโรป และเอเชีย 3 สกุล

กวางในประเทศไทยมีอยู่ 2 วงศ์ย่อย คือ Muntiacinae และ Cervinae โดยในวงศ์ย่อย Muntiacinae มี 2 ชนิด คือ *M. muntiacus* (แก้งธรรมชาติ) และ *M. feae* (แก้งหม้อ) และวงศ์ย่อย Cervinae มีเฉพาะกวางในสกุล *Cervus* ซึ่งสามารถจำแนกได้เป็น 3 สกุลย่อย คือ *Rusa* ได้แก่ *C. unicolor* (กวางป่า), *Rucervus* ได้แก่ *C. schomburgki* (สมัน) และ *C. eldi* (ละอง หรือละมั่ง) และ *Axis* ได้แก่ *C. porcinus* (เนื้อทราย)

Groves และ Grubb (1987), Eisenberg (1981) และ Janis และ Scott (1987) ได้จำแนกสัตว์วงศ์กวาง (Family Cervidae: Order Artiodactyla, Suborder Ruminantia, Infraorder Pecora) ออกเป็น 6 วงศ์ย่อย (Subfamily) คือ

- 1) วงศ์ย่อย Cervinae คือ กวางโลกเก่า (Old World deer)
- 2) วงศ์ย่อย Muntiacinae คือ แก้งเอเชีย (Asian muntjacs) และกวางจุก (Tufted deer)
- 3) วงศ์ย่อย Alcinae คือ กวางมูส (Moose)
- 4) วงศ์ย่อย Rangiferinae คือ กวางคาริบู (Caribou) หรือกวางเรนเดียร์ (Reindeer)
- 5) วงศ์ย่อย Odocoileinae ได้แก่ กวางโอโดคอยลินีโลกใหม่ (New World Odocoileines) และกวางโรเดียร์โลกเก่า (Old World roe deer)
- 6) วงศ์ย่อย Hydropotinae คือ กวางจีนน้ำ (Chinese water deer) ซึ่งเป็นกวางที่ไม่มีเขา

Groves และ Grubb (1987) และ Grubb (1993) ได้จำแนกสัตว์วงศ์กวาง (Family Cervidae) ที่มีเขาคือออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ โดยใช้ลักษณะของกระดูกนิ้วมือเป็นเกณฑ์ในการจำแนก คือ

- 1) กลุ่ม Telemetacarpalian คือ พวกที่มีกระดูกนิ้วที่ 2 และ 5 อยู่ห่างกัน และแผ่ออกไปด้านข้าง ได้แก่ วงศ์ย่อย Alcinae, Rangiferinae และ Odocoileinae
- 2) กลุ่ม Plesimetacarpalian คือ พวกที่มีกระดูกนิ้วที่ 2 และ 5 อยู่ชิดติดกัน ได้แก่ วงศ์ย่อย Muntiacinae และ Cervinae

กวางในวงศ์ย่อย Muntiacinae ประกอบด้วยกวาง 2 สกุล 11 ชนิด คือ

1. สกุล *Muntiacus* ได้แก่ แก้งเอเชีย มีจำนวน 10 ชนิด คือ
 - Indian Muntjac (แก้งธรรมชาติ) : *Muntiacus muntjak*
 - Reeves's Muntjac : *Muntiacus reevesi*
 - Hairy-fronted Muntjac : *Muntiacus crinifrons*
 - Fea's Muntjac (แก้งหม้อ) : *Muntiacus feae*

- Roosevelt's Muntjac : *Muntiacus rooseveltorum*
- Gongshan Muntjac : *Muntiacus gongshanensis*
- Bornean Yellow Muntjac : *Muntiacus atherodes*
- Giant Muntjac : *Muntiacus vuquangensis*
- Truong Son Muntjac : *Muntiacus truongsoneensis*
- Leaf muntjac : *Muntiacus putaoensis*

2. สกุล *Elaphodus* มีจำนวน 1 ชนิด คือ

- Tufted Deer (กวางจุก) : *Elaphodus cephalophus*

ส่วนกวางในวงศ์ย่อย Cervinae ประกอบด้วยกวาง 4 สกุล 16 ชนิด คือ

1. สกุล *Dama* มีจำนวน 1 ชนิด คือ

- Fallow Deer : *Dama dama*

2. สกุล *Axis* มีจำนวน 4 ชนิด คือ

- Chital : *Axis axis*
- Hog Deer (เนื้อทราย) : *Axis porcinus*
- Kuhl's Deer : *Axis kuhlii*
- Calamian Deer : *Axis calamianensis*

3. สกุล *Elaphurus* มีจำนวน 1 ชนิด คือ

- Père David's Deer : *Elaphurus davidianus*

4. สกุล *Cervus* มีจำนวน 10 ชนิด คือ

- Thorold's Deer : *Cervus albirostris*
- Swamp Deer : *Cervus duvaucelii*
- Red Deer (Wapiti, Elk) : *Cervus elaphus*
- Eld's Deer (ละอง หรือละมั่ง) : *Cervus eldii*
- Sika Deer : *Cervus nippon*
- Rusa Deer : *Cervus timorensis*
- Sambar Deer (กวางป่า) : *Cervus unicolor*
- Schomburgk's Deer (เสี้ยน) : *Cervus schomburgki*
- Philippine spotted deer : *Cervus alfredi*
- Philippine brown deer : *Cervus mariannus*

Groves และ Grubb (1987) และ ได้จำแนกกวางสกุล *Cervus* โดยใช้ข้อมูลทางสัณฐานวิทยา (morphological data) ร่วมกับข้อมูลของลักษณะคาริโอไทป์ (karyotypic data) ออกเป็น 4 สกุลย่อย คือ

1. สกุลย่อย *Rusa* ได้แก่ *Cervus alfredi*, *Cervus mariannus*, *Cervus timorensis* และ *Cervus unicolor* (กวางป่า)
2. สกุลย่อย *Rucervus* ได้แก่ *Cervus eldii* (ละอง หรือละมั่ง), *Cervus duvauceli* (กวางบึง หรือกวางบาราซิงห์) และ *Cervus schomburgki* (สมัน)
3. สกุลย่อย *Przewalskium* ได้แก่ *Cervus albirostris*
4. สกุลย่อย *Cervus* ได้แก่ *Cervus nippon* (กวางซิกะ) และ *Cervus elaphus* (เรดเดียร์ หรือวาปิต)

จากข้อมูลและหลักฐานทางบรรพชีวินวิทยาที่ศึกษาโดย Gentry (1994) พบว่ากวางที่มีเขา (antlered deer) ในยุคแรกเท่าที่ค้นพบ ได้แก่ *Dicrocerus* และ *Heteroprox* ซึ่งอยู่ในช่วง Late Orlanian ของยุค Mammalian Neogene หรือประมาณ 17 ล้านปีก่อน และ *Euprox* ซึ่งมีชีวิตอยู่ในช่วง Early Astaracian ของยุค Mammalian Neogene หรือประมาณ 16 ล้านปีก่อน Azanza (1993) ได้จำแนกให้ *Euprox* อยู่ในวงศ์ย่อย Muntiacinae ซึ่งจัดว่าเป็นวงศ์ย่อยที่เป็นบรรพบุรุษ (the primitive stem-group) ของสัตว์วงศ์กวางในวงศ์ย่อยอื่นๆ Muntiacinae ในยุคโบราณมีชีวิตอยู่ในทวีปยุโรปจนถึงปลายยุค Mammalian Neogene จากนั้นได้สูญพันธุ์จากทวีปยุโรปไป และถูกแทนที่ด้วย *Eustyllocerus pierensis* ซึ่งจัดว่าเป็นกวางในวงศ์ย่อย Cervinae ในยุคแรก ซึ่งการเปลี่ยนแปลงนี้สอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงสภาพอากาศในทวีปยุโรปจากภูมิอากาศแบบกึ่งร้อน (Subtropical zone) มาเป็นภูมิอากาศแบบอบอุ่น (Temperate zone) ฟอสซิลของสัตว์วงศ์กวางที่แสดงถึงจุดเริ่มต้นของการแบ่งแยกวงศ์ย่อย Muntiacinae และวงศ์ย่อย Cervinae ที่เก่าแก่ที่สุด ถูกขุดค้นพบได้ที่เมือง Lufeng ประเทศจีน อยู่ในยุค Miocene หรือประมาณ 7 ล้านปีก่อน (Han, 1985) และจากการศึกษาของ Di stefano และ Petronio (2002) ได้จำแนกให้ *Cervocerus novorossiae* ซึ่งมีชีวิตอยู่ในช่วง Late Miocene เป็นกวางในวงศ์ย่อย Cervinae ที่เก่าแก่ที่สุด นอกจากนี้ยังรายงานว่ากวาง *Rusa elegans* ซึ่งมีชีวิตอยู่ในช่วง Middle Pliocene หรือประมาณ 4 ล้านปีก่อน ที่ขุดค้นพบได้ที่เมือง Shaanxi ประเทศจีน มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับกวาง *Rusa (Cervus) unicolor* ที่มีชีวิตอยู่ในปัจจุบันอย่างมาก

Groves และ Grubb (1987) และ Scott และ Janis (1987) ได้จำแนกสัตว์วงศ์กวางโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphological traits) โดยใช้ลักษณะแรก คือการปรากฏเขาหรือไม่ปรากฏเขา (presence or absence of antlers) จำแนกให้กวางวงศ์ย่อย Hydropotinae เป็นกวาง

ที่มีสายวิวัฒนาการเริ่มแรกของวงศ์ Cervidae ลักษณะต่อมาที่ใช้ในการจำแนกก็คือ กระดูกนิ้วมือสามารถจำแนกวางออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่ม Telemetacarpalian และกลุ่ม Plesiometacarpalian ดังที่ได้กล่าวมาแล้ว อย่างไรก็ตาม ลักษณะของกระดูกศีรษะ และเขาของสัตว์วงศ์กวางได้มีการวิวัฒนาการปรับเปลี่ยนรูปร่างที่เป็นอิสระจากลักษณะอื่นๆ ซึ่งพบว่าการวิวัฒนาการเปลี่ยนแปลงอย่างน้อยถึง 3 ครั้งในกวางชั้นสูง (higher ruminants) (Janis และ Scott, 1987)

ในกวางกลุ่ม Plesiometacarpalian ซึ่งประกอบด้วยวงศ์ย่อย Muntiacinae และ Cervidae Groves และ Grubb (1987) ได้ใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาจำแนกให้วงศ์ย่อย Muntiacinae เป็นกวางที่มีสายวิวัฒนาการเริ่มแรกของกลุ่ม ส่วนในวงศ์ย่อย Cervinae พบว่ากวางสกุล *Axis* และ *Dama* เป็น sister lineages หรือแตกสายวิวัฒนาการก่อนกวางในสกุล *Elaphurus* และ *Cervus* ซึ่งปัจจุบันยังคงจำแนกให้กวางแพร์เดวิดส์ (*Elaphurus davidianus*) เป็นชนิดที่อยู่ในระดับสกุล (Grubb, 1993) แม้ว่าข้อมูลในระดับโมเลกุลจะเสนอให้สกุล *Elaphurus* ควรรวมเข้ากับสกุล *Cervus* ก็ตาม (Emerson และ Tate, 1993 ; Cronin *et al.*, 1996) ในขณะที่ Randi *et al.* (2001) เสนอให้สกุล *Elaphurus* ควรจะรวมเข้ากลุ่มเดียวกับสกุลย่อย *Rucervus* เนื่องจากมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *C. eldi* ซึ่งสามารถสรุปการจัดจำแนกวางในวงศ์ย่อย Cervinae ได้ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 การจัดจำแนกอนุกรมวิธานของกวางในวงศ์ย่อย Cervinae โดยใช้หลักเกณฑ์การวิเคราะห์เปรียบเทียบวิธีการต่างๆ

วิธีการที่ใช้ศึกษาและจำแนก	สรุปผลการจำแนก	อ้างอิงจาก :
Morphological data	จำแนกวงศ์ย่อย Cervinae ออกเป็น 3 สกุล คือ <i>Cervus</i> , <i>Elaphurus</i> และ <i>Platyceros</i> (European South West Asian Fallow deer) โดยจำแนกวางสกุล <i>Cervus</i> ในประเทศไทยได้ 3 สกุลย่อย คือ <i>Rusa</i> (ได้แก่ <i>C. unicolor</i> - กวางป่า), <i>Rucervus</i> (ประกอบด้วย <i>C. schomburgki</i> - สมัน และ <i>C. eldi</i> - ละอง หรือละมั่ง) และ <i>Axis</i> (ได้แก่ <i>C. porcinus</i> - เนื้อทราย)	Lekagul และ McNeely (1977)

ตารางที่ 1 (ต่อ)

วิธีการที่ใช้ศึกษาและจำแนก	สรุปผลการจำแนก	อ้างอิงจาก :
Morphological & karyotypic data	จำแนกวงศ์ย่อย <i>Cervinae</i> ออกเป็น 4 สกุล คือ <i>Axis</i> , <i>Dama</i> , <i>Elaphurus</i> และ <i>Cervus</i> โดยจำแนกสกุล <i>Cervus</i> ได้ 4 สกุลย่อย คือ <i>Rusa</i> , <i>Rucervus</i> , <i>Przewalskium</i> และ <i>Cervus</i> และจำแนกสกุล <i>Axis</i> ได้ 2 สกุลย่อย คือ สกุลย่อย <i>Hyelaphus</i> (ประกอบด้วย <i>A. porcinus</i> , <i>A. calamianensis</i> และ <i>A. kuhli</i>) และสกุลย่อย <i>Axis</i> (ได้แก่ <i>A. axis</i>) ซึ่งสกุล <i>Axis</i> ยังคงมีลักษณะเป็น monophyletic	Groves และ Grubb (1987)
Electrophoretic patterns of 22 proteins	จำแนกสกุล <i>Cervus</i> เป็น 2 Clade คือ 1) <i>C. elaphus</i> และ <i>C. nippon</i> clade และ 2) <i>C. unicolor</i> และ <i>C. timorensis</i> clade โดยพบว่าสกุล <i>Elaphurus</i> มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ <i>C. elaphus</i> และ <i>C. nippon</i> clade ในขณะที่ <i>C. unicolor</i> และ <i>C. timorensis</i> clade มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับสกุล <i>Dama</i> และสกุล <i>Axis</i> มากกว่า	Emerson และ Tate (1993)
(K)-casein DNA sequences	สนับสนุนผลการจำแนกของ Emerson และ Tate (1993) และพบว่า <i>C. duvauceli</i> อยู่ร่วม clade เดียวกับ <i>C. unicolor</i> โดยมีลักษณะเป็น monophyletic clade	Cronin <i>et al.</i> (1996)
Complete mtDNA control region	สกุล <i>Elaphurus</i> ควรจะรวมเข้ากลุ่มเดียวกับสกุลย่อย <i>Rucervus</i> เนื่องจากมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ <i>C. eldi</i> ในขณะที่ <i>C. unicolor</i> และ <i>C. timorensis</i> ไม่ควรรวมอยู่ในสกุลย่อย (<i>Rusa</i>) เช่นเดียวกันกับ <i>C. alfredi</i> ซึ่งแสดงว่าสกุลย่อย <i>Rusa</i>	Randi <i>et al.</i> (2001)

ตารางที่ 1 (ต่อ)

วิธีการที่ใช้ศึกษาและจำแนก	สรุปผลการจำแนก	อ้างอิงจาก :
	ไม่มีลักษณะเป็น Monophyletic	
The cytochrome <i>b</i> gene	สนับสนุนผลการจำแนกของ Randi <i>et al.</i> (2001) และพบว่า <i>C. unicolor</i> จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับ <i>A. porcinus</i> ในขณะที่ <i>C. albirostris</i> จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับ <i>C. elaphus</i> และ <i>C. nippon</i>	Liu <i>et al.</i> (2003)
The cytochrome <i>b</i> gene	สนับสนุนผลการจำแนกของ Liu <i>et al.</i> (2003) และพบว่า <i>C. eldi</i> มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับกวางสกุล <i>Elaphurus</i> ในขณะที่ <i>C. duvauceli</i> และ <i>C. schomburgki</i> ไม่ได้อยู่ในกลุ่มเดียวกับ <i>C. eldi</i> แต่อยู่รวมในกลุ่มเดียวกันกับ <i>A. axis</i> โดยเป็น sister lineages หรือแตกสายวิวัฒนาการก่อนกวางในสกุล <i>Elaphurus</i> และ <i>C. eldi</i>	Pitra <i>et al.</i> (2004)

จากข้อมูลในตารางที่ 1 จะเห็นว่าการจัดจำแนกอนุกรมวิธานของกวางในวงศ์ย่อย Cervinae โดยใช้ข้อมูลทางสัณฐานวิทยา และข้อมูลในระดับโมเลกุลยังไม่มีความสอดคล้องกันเท่าที่ควร โดยเฉพาะกวางในประเทศไทย คือ *C. porcinus* (เนื้อทราย) และ *C. unicolor* (กวางป่า) ยังไม่มีความชัดเจนในการจำแนกว่าควรอยู่ในสกุลที่แตกต่างกันหรือไม่ ซึ่งการจัดจำแนกในปัจจุบันได้จำแนกให้เนื้อทรายอยู่ในสกุล *Axis* (*A. porcinus*) ในขณะที่ข้อมูลในระดับโมเลกุลพบว่ากวางทั้ง 2 ชนิดมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน ในขณะที่ *C. eldi* และ *C. schomburgki* ก็ยังไม่มีความชัดเจนในการจำแนกว่าควรอยู่ในสกุลที่แตกต่างกันหรือไม่เช่นเดียวกันเกี่ยวกับปัญหาในการจัดจำแนกนี้ Groves และ Grubb (1987) ให้ความเห็นว่าการจำแนกแบบดั้งเดิม (formal classification) ซึ่งใช้ข้อมูลจากการศึกษาทางสัณฐานวิทยาและพฤติกรรมเป็นหลักยังไม่เพียงพอ และขาดความแน่นอน เนื่องจากจำเป็นต้องใช้ตัวอย่างซ้ำๆ จากชนิดเดียวกัน ซึ่งก็ยังคงพบว่ามี ความแตกต่างกันซึ่งบางครั้งก็ไม่สามารถอธิบายได้ ดังนั้นการนำข้อมูลทางด้านพันธุกรรมมาใช้ใน

การศึกษาการจำแนกชนิดพันธุ์จะช่วยให้ได้ข้อมูลที่ชัดเจนมากขึ้น โดยเฉพาะในสัตว์วงศ์กวาง ซึ่งพบว่ามัลักษณะการวิวัฒนาการเป็นแบบ Convergence หรือมีการปรับเปลี่ยนลักษณะรูปร่างให้เข้ากับถิ่นอาศัยที่มีสภาพทางนิเวศวิทยาที่แตกต่างกัน (ecological adaptations) จนมีลักษณะที่เป็นเอกลักษณ์เฉพาะตามสภาพทางนิเวศวิทยาที่แตกต่างกัน (different ecomorphs)

คำจำกัดความของชนิดพันธุ์

คำจำกัดความของคำว่าชนิด หรือ Species concept (Hey, 2001) จากอดีตจนถึงปัจจุบันมีนักวิทยาศาสตร์ได้นำเสนอคำจำกัดความไว้เป็นจำนวนมาก ซึ่งอยู่บนหลักการสำคัญประการใดประการหนึ่งดังนี้

หลักการที่ 1 การสืบเชื้อสายมาจากต้นตระกูลเดียวกัน (common descent) หลักการนี้สมาชิกของสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันจะต้องสืบเชื้อสาย หรือมีต้นกำเนิดมาจากประชากรที่เป็นบรรพบุรุษร่วมเดียวกัน (แต่ไม่จำเป็นต้องสืบเชื้อสายมาจากพ่อแม่คู่เดียวกัน)

หลักการที่ 2 กลุ่มที่เล็กที่สุดที่สามารถแบ่งแยกได้ (smallest distinct grouping) สมาชิกของสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันต้องมีลักษณะที่เป็นเอกลักษณ์ของกลุ่มร่วมกัน

หลักการที่ 3 การเป็นกลุ่มสังคมที่มีการผสมพันธุ์กันได้ภายในกลุ่ม (reproductive community) หลักการนี้สามารถใช้จำแนกได้เฉพาะสิ่งมีชีวิตที่สืบพันธุ์แบบอาศัยเพศได้เท่านั้น โดยสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกัน จะสามารถผสมพันธุ์กันได้เฉพาะกับสมาชิกภายในชนิดเดียวกันเท่านั้น และจะไม่ผสมพันธุ์กับสมาชิกของสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น

คำจำกัดความของคำว่าชนิด หรือ Species ของนักวิทยาศาสตร์บางท่านที่ใช้เป็นแนวทางพิจารณาสถานะความเป็นชนิดในการศึกษาวิจัยครั้ง

The morphological species concept ได้ให้คำจำกัดความของคำว่า Species ไว้ว่า Species คือ กลุ่มของสิ่งมีชีวิตที่มีลักษณะภายนอกเหมือนกันหรือคล้ายกัน (A species is a group of individuals or populations with the same or similar morphological characters) ข้อมูลที่ใช้ในการจัดจำแนกคือลักษณะภายนอกของสิ่งมีชีวิต ซึ่งต้องมีลักษณะภายนอกที่ปรากฏเป็นเอกลักษณ์ร่วมกันเฉพาะกลุ่ม และลักษณะนั้นจะต้องแตกต่างจากลักษณะที่เป็นเอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิตอื่น คำจำกัดความนี้ คือความรู้พื้นฐานที่ Carl Linnaeus ใช้ในการพัฒนาความรู้ทางด้าน Systematic ของสิ่งมีชีวิต (Mayr, 1964)

The genetic species concept ได้ให้คำจำกัดความของคำว่า Species ไว้ว่า Species คือ กลุ่มของสิ่งมีชีวิตที่มีพันธุกรรมคล้ายคลึงกัน (A species is a group of similarity individuals) ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมสามารถแปลความหมายได้จากคำ genetic divergence คือระยะห่าง

ทางพันธุกรรมมากแสดงว่ามีความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมน้อย ในทางตรงกันข้าม หากค่าระยะห่างทางพันธุกรรมน้อย ก็แสดงว่ามีความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมมาก (Mayr, 1964)

ชนิดกวางที่จะศึกษา

1. เก้งธรรมดา (*Munticus muntjak* ; Red muntjac หรือ Barking deer)

ลักษณะ มีขนาดเล็ก ความยาวจากหัวถึงลำตัวประมาณ 80-98 เซนติเมตร ความยาวหาง 17-19 เซนติเมตร มีเขาขนาดเล็กตั้งอยู่บนก้านเขาขนานยาว ลำตัวสีน้ำตาลถึงน้ำตาลแดง หน้าอกสีน้ำตาล คาง คอหอย ท้อง และด้านล่างของหางเป็นสีขาว ขาสีออกน้ำตาล (ภาพที่ 1)

พฤติกรรม โดยทั่วไปออกหากินในเวลากลางคืน บางครั้งพบช่วงบ่าย และช่วงเช้า ปกติจะอยู่ตามลำพัง หรืออยู่เป็นคู่ ชอบกินใบไม้มากกว่ากินหญ้า

ถิ่นอาศัย พบในป่าทุกประเภท มักพบบริเวณชายป่า และบริเวณที่โล่ง ในประเทศไทยพบได้ในป่าทั่วประเทศ ยกเว้นบริเวณที่ราบภาคกลาง (พาร์, 2546)



ภาพที่ 1 เก้งธรรมดา (*Munticus muntjak* ; Red muntjac หรือ Barking deer)

2. เก้งหม้อ (*Muntiacus feae* ; Fea's muntjac)

ลักษณะ ขนาดเล็กกว่าเก้งธรรมดาเล็กน้อย ความยาวจากหัวถึงลำตัวประมาณ 70-90 เซนติเมตร ความยาวหางประมาณ 16-18 เซนติเมตร มีสีน้ำตาลเข้ม มีจุดละเอียดสีเหลืองทั่วตัว

แตกต่างจากกึ่งธรรมดาตรงที่ด้านบนของหางมีสีดำ แข็งมีสีเข้มจนถึงดำ ขาหลังมีแถบสีขาวพาดบริเวณด้านหน้าของต้นขา (ภาพที่ 2)

พฤติกรรม โดยทั่วไปหากินตามลำพังในช่วงพลบค่ำ และเช้ามืด บางครั้งพบเป็นคู่
ถิ่นอาศัย ป่าดงดิบเขา และป่าเบญจพรรณในเขตเทือกเขาตะนาวศรี (พาร์, 2546)
สถานภาพ ข้อมูลไม่เพียงพอ (Data Deficient; DD) (IUCN, 2000)



ภาพที่ 2 เก้งหม้อ (*Muntiacus feae* ; Fea's muntjac)

3. กวางป่า (*Cervus unicolor* ; Sambar deer)

ลักษณะ เป็นกวางขนาดใหญ่มาก ความยาวจากหัวถึงลำตัว 180-200 เซนติเมตร ความยาวหางประมาณ 25-28 เซนติเมตร มีสีน้ำตาลเข้ม เขามีขนาดใหญ่ แต่ละข้างมี 3 กิ่ง หางด้านล่างมีสีขาว ใช้สำหรับส่งสัญญาณสื่อสารกับกวางตัวอื่นๆ (ภาพที่ 3)

พฤติกรรม อาศัยอยู่เป็นฝูง (Herd) ปกติจะหากินในเวลากลางคืน บางครั้งพบหากินตอนเช้าและบ่าย ผสมพันธุ์ในช่วงเดือนพฤศจิกายนจนถึงเดือนมกราคม ในฤดูแล้งชอบนอนแช่น้ำและปลักโคลน

ถิ่นอาศัย พบได้ในถิ่นอาศัยหลายประเภททั้งป่าดงดิบ ป่าเบญจพรรณ และป่าที่มีทุ่งหญ้า ในประเทศไทยพบในป่าภาคเหนือ ภาคอีสานตอนบน บางส่วนของภาคตะวันออก ภาคตะวันตก บริเวณเทือกเขาตะนาวศรี และภาคใต้ (พาร์, 2546)



ภาพที่ 3 กวางป่า (*Cervus unicolor*; Sambar deer)

4. ละอง หรือละมั่ง (*Cervus eldii siamensis* ; Eld's deer)

ลักษณะ เป็นกวางขนาดกลาง มีความยาวจากหัวถึงลำตัวประมาณ 150-180 เซนติเมตร ความยาวหางประมาณ 22-25 เซนติเมตร ลำตัวด้านบนสีแดงออกน้ำตาล ลำตัวด้านล่างสีออกขาว เขามีรูปร่างเป็นเอกลักษณ์ คือมีกิ่งรับหมาที่โค้งต่อเนื่องกับลำเขาจนมีลักษณะคล้ายคันธนู ตัวไม่เต็มวัยมีลายจุดตามลำตัว (ภาพที่ 4)

พฤติกรรม อาศัยอยู่เป็นฝูง (Herd) ฤดูผสมพันธุ์เริ่มตั้งแต่เดือนกุมภาพันธ์ จนถึงเดือนเมษายน

ถิ่นอาศัย เคยพบอยู่ในป่าที่ราบต่ำทางภาคเหนือ ภาคกลาง และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ปัจจุบันสูญพันธุ์ไปจากป่าธรรมชาติของประเทศไทยแล้ว แต่ยังพบในป่าธรรมชาติของประเทศพม่า และกัมพูชา ในประเทศไทยสามารถเพาะพันธุ์ได้ในสวนสัตว์ (พาร์, 2546)

สถานภาพ มีแนวโน้มจะสูญพันธุ์ (Vulnerable; Vu) และเป็น Appendix I ภายใต้อาณัติความควบคุมของอนุสัญญา CITES (IUCN, 2000)



ภาพที่ 4 ละอง หรือละมั่ง (*Cervus eldii siamensis*; Eld's deer)

5. เนื้อทราย (*Cervus pornicus* ; Hog deer)

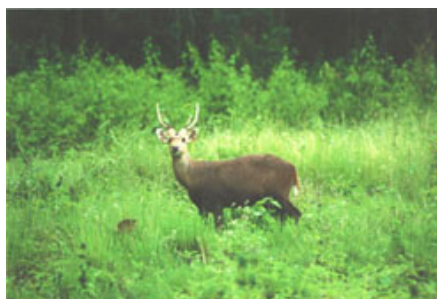
ลักษณะ เป็นกวางขนาดเล็ก มีความยาวจากหัวถึงลำตัวประมาณ 140-150 เซนติเมตร มีความยาวหางประมาณ 17-21 เซนติเมตร มีขนสั้นละเอียด ในฤดูแล้งขนมีสีน้ำตาล แต่ในฤดูฝนขนจะออกสีเทา ท้องมีสีจางกว่าหลัง เขามีรูปทรงคล้ายเขากวางป่า แต่มีขนาดเล็กกว่ามาก ตัวผู้บริเวณเหนือเข้ามีสีเข้ม ลูกอ่อนมักมีลายจุด แต่บางตัวอาจมีลายจุดเหลืออยู่จนถึงโตเต็มวัย (ภาพที่ 5)

พฤติกรรม อาศัยอยู่ในบริเวณที่มีหญ้าสูง และบริเวณหนองน้ำ กินหญ้า ยอดไม้ และใบไม้ เป็นอาหาร สามารถวิ่งฝ่าพื้นที่ป่ารกทึบได้อย่างรวดเร็ว

ถิ่นอาศัย พบตามป่าที่ราบต่ำ โดยเฉพาะบริเวณพื้นที่ราบภาคกลาง ปัจจุบันสูญพันธุ์ไปจากป่าธรรมชาติของประเทศไทยแล้ว แต่ยังสามารถเพาะขยายพันธุ์ได้จำนวนมากในสวนสัตว์ (พาร์, 2546)

สถานภาพ ข้อมูลไม่เพียงพอ (Data Deficient; DD) และเป็น Appendix I ภายใต้อาณัติของอนุสัญญา CITES (IUCN, 2000)

หมายเหตุ จากการจัดจำแนกของ Groves และ Grubb (1987) ได้จำแนกให้เนื้อทรายอยู่ในสกุล *Axis* ในวงศ์ย่อย Cervinae มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Axis porcinus*



ภาพที่ 5 เนื้อทราย (*Cervus pornicus*; Hog deer)

วิธีการศึกษา

อุปกรณ์สำหรับเก็บตัวอย่าง

1. ตัวอย่างเลือดของกวางที่จะศึกษา
2. หลอดเก็บตัวอย่างเลือด (Blood Vacutainer 2.0 ml Plus EDTA)

3. อุปกรณ์เก็บตัวอย่างในภาคสนาม ได้แก่ กรรไกร, ปากกิบ, เข็มฉีดยา, ถุงมือ, กระดาษทิชชู, สำลี และถุงพลาสติก
4. อุปกรณ์รักษาตัวอย่างในภาคสนาม ได้แก่ tube ขนาด 1.5 ml, ขวดแก้วมีฝาปิด, น้ำแข็ง และกระติกน้ำแข็ง
5. หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave)
6. ตู้อบไอร้อน (Incubator)
7. ตู้แช่แข็ง (Freezer)

อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ

1. QIAamp Tissue Kit (Qiagen)
2. QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen)
3. สารเคมีสำหรับย่อยสลายเนื้อเยื่อและสกัดดีเอ็นเอ ได้แก่ Dithiothreitol (DTT), EDTA, Proteinase K และ Tris-HCl
4. สารเคมีที่ใช้สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ได้แก่ 10X Buffer, $MgCl_2$, dNTP (dATP, dCTP, dGTP และ dTTP), *Taq* DNA polymerase (Recombinant), คู่ Primer (Intron1 ของยีน *PRKCI*; L748 และ U26) และ น้ำกลั่นที่ปราศจากไอออน (Distilled water)
5. สารเคมีที่ใช้สำหรับการแยก และตรวจสอบดีเอ็นเอ ได้แก่ 1% Agarose gel, buffer TAE, 6X loading dye, น้ำกลั่นที่ปราศจากไอออน (Distilled water) Tris-base และ glacial acetic acid
6. ไมโครปิเปต (Micropipette) และไมโครปิเปตทิพ (Micropipette tip)
7. เครื่องแก้วขนาดต่างๆ ได้แก่ กระบอกตวง (Cylinder), ถ้วยตวง (Beaker) และขวดรูปชมพู่ (Flask)
8. เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง (Ultracentrifuge)
9. เครื่องพีซีอาร์ (Thermal cycler)
10. ตู้แช่แข็ง (Freezer)
11. อุปกรณ์อื่นๆ ที่ใช้ประจำในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ ถุงมือ, เครื่องชั่ง (Balance), นาฬิกาตั้งเวลา (Laboratory timer), เครื่องคิดเลข (Calculator) และเครื่องผสมสาร (Vortex mixers)
12. สมุดบันทึกข้อมูล (Lab notebook)

วิธีการ

1. การเก็บตัวอย่าง (Samples Collection)

- เก็บตัวอย่างสัตว์วงศ์กวางที่เลือกศึกษา ประมาณชนิดละ 3-5 ตัวอย่าง โดยเก็บตัวอย่างเลือด บรรจุลงใน Blood Vacutainer 2.0 ml Plus EDTA นำไปเก็บรักษาไว้ในตู้เย็น 4 °C

2. คู่ไพรเมอร์ (Primer)

- ใช้คู่ไพรเมอร์เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วน Intron1 ของยีน โปรตีนไคนเนสซีไอโอต้า (PRKCI) (L748 และ U26) ตาม Ropiquet and Hassanin (2005) มีลำดับเบสดังนี้

L748 (Forward) = CTGTACCCAGTCAATATCCT ; Tm = 58.35 °C

U26 (Reward) = TATGCTAAAGTACTGTTGGT ; Tm = 54.25 °C

3. การสกัดดีเอ็นเอ (DNA Isolation)

- นำตัวอย่างเลือดที่เลือกศึกษามาสกัดดีเอ็นเอ โดยใช้ชุด Aquapure genomic blood kit แชนด์เอ็นเอที่สกัดได้ในตู้เย็น 4 °C หรือ -20 °C

4. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในชิ้นส่วนที่ต้องการ (DNA Amplification)

- ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในชิ้นส่วนลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ต้องการด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) ในปฏิกิริยานี้จะใช้ Taq DNA Polymerase, 10X KCl Taq Buffer, MgCl₂, dNTP และ คู่ Primer (L748 และ U26) โดยมีปริมาตรทั้งหมด / Reaction 50 µl ประกอบด้วย :-

Taq DNA polymerase (Fermentas)	0.25	µl
10X KCl Taq buffer (Fermentas)	5	µl
25 mM MgCl ₂ (Fermentas)	4	µl
2.0 mM dNTP mixture (Fermentas)	4	µl
Each of 5 pmol/µl U26 and L748 primers	2.5	µl
Sterile deionized water	27.75	µl
DNA template solution	4	µl

- การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องพีซีอาร์ใช้อุณหภูมิซึ่งมี Condition ดังนี้:-

Initial denaturation step	94°C, 4 นาที	} 35 รอบ
Denaturation step	94°C, 20 วินาที	
Annealing step	53°C, 30 วินาที	
Extension step	72°C, 1 นาที	
Final extension step	72°C, 5 นาที	

5. การตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ต้องการ (Gel Electrophoresis Check)

- ตรวจสอบ PCR Product ด้วยการ load ตัวอย่างลงใน Agarose gel และ run gel ด้วยวิธี Electrophoresis คัดเลือก PCR Product ที่มีแถบ Band ปรากฏชัดเจน และได้เมื่อเทียบกับ DNA Ladder Marker แล้วได้ขนาดที่ถูกต้อง เพื่อนำไปแยกสกัดให้บริสุทธิ์

6. การแยกสกัดดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ (DNA Purification)

- นำ PCR Product (ที่คัดเลือกไว้ในข้อ 5) มาแยกสกัดดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ โดยใช้ QIAquick PCR Purification kit บรรจุตัวอย่างที่แยกสกัดบริสุทธิ์แล้วลงใน Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml ผึ่งฝา tube ด้วย Parafilm เพื่อเตรียมตัวอย่างส่งทำ DNA Sequencing

7. การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA Sequencing)

- ส่งตัวอย่างที่ purified แล้วที่หน่วยบริการชีวภาพ (Bioservice Unit: BSU)

8. การเปรียบเทียบตัวอย่างในฐานข้อมูล (DNA Blast)

- นำลำดับนิวคลีโอไทด์ (ที่ได้จากข้อ 7) ทดสอบความถูกต้องว่าเป็นชิ้นส่วนนิวคลีโอไทด์ที่ต้องการหรือไม่ โดยการนำไป Blast ในฐานข้อมูลของ NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

9. การส่งข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล NCBI (DNA Sequences Submit)

- ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ถูกต้อง (DNA Sequences) จะถูก Submitted ในฐานข้อมูลของ NCBI ซึ่งสามารถใช้เปรียบเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของสัตว์ป่าของกลางเพื่อใช้จำแนกชนิดที่ถูกต้องได้

สถานที่ดำเนินการวิจัย

1. สถานที่เก็บตัวอย่าง

- สถานีเพาะเลี้ยงสัตว์ป่า ในสังกัดกรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช
- สถานีวิจัยสัตว์ป่า ในสังกัดกรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช
- สวนสัตว์ ในองค์การสวนสัตว์ในพระบรมราชูปถัมภ์

2. ห้องปฏิบัติการทางเทคโนโลยีชีวภาพ

กลุ่มงานวิจัยอนุรักษ์พันธุกรรมไม้ป่า และเทคโนโลยีชีวภาพ

สำนักวิจัยการอนุรักษ์ป่าไม้ และพันธุ์พืช กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช

ผลการศึกษา

1. สามารถหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน Intron1 ของยีน *PRKCI* ของสัตว์วงศ์กวาง คือ กวางป่า, ละมั่งพันธุ์พม่า, ละมั่งพันธุ์ไทย, เนื้อทราย, เก้งธรรมดา และเก้งหม้อได้ โดยมีความยาวของลำดับเบสประมาณ 514 bp ดังนี้

กวางป่า; *Cervus unicolor* (Sample name = PKU8)

>PKU8

```
TTTATGCTTAAGTACTGTTGGTGCGATTGAAAAAACAGATCGTATTTATGCAATGAAAGT
TGTGAAAAACGAGCTTGTCAATGATGATGAGGTAAGCACAAATATGATGTTTTATTACCTC
TAAACTATTACATTGGCTTAAGTGTATGATATCAGAAAAAATGTCAATGTTTGTGCCTTATT
GTTTCTGTCTGCTTTTCTAAATACATGCTTCAGACTGCTTAATATATAAGGTATATTTAAAG
TTGTCTGATGATTATTAGATTTTTAAAAAATAAACATCAAACCATATTATTATCAAGGGAAA
CTACTTGAGCTTTGTAAAAGTTTGCTAAGACTCTAATAATATTGACAGATTTGCTGGGTAG
TAGTTTCTCTTTGTATTTAAATTATTATTTTCATGATTATCAATGCTTTTGATGTTTAGCCTAG
TTAGTCAATAATTGCATTTATGGTAATGGAATTGCAAAGAACAATTTGTCATAGTTTTGAT
ACTGTCATTCTAGTTTGACATAAATTTCTTTCATATTTTAAAAATAGGATATTGACTGGGTAC
AGAA
```

ละมั่งพันธุ์พม่า; *C. eldi thamin* (Sample name = PKT1)

>PKT1

```
TTTTATGCCTAAGTACTGTTGGTGCGATTGAAAAAACAGATCGTATTTATGCAATGAAAG
TTGTGAAAAAGAGCTTGTCAATGATGATGAGTGTCAAGCACAAATATGATGTTTTATTACC
TCTAAACTATTACATTGGCTTAAGTGTATGATATCAGAAAAAATGTCAATGTTTGTGCCTT
ATTGTTTCTGTCTGCTTTTCTAAATACATGCTTCAGACTGCTTAATATATAAGGTATATTTA
AAGTTGTCTGATGATTATTAGATTTTTAAAAAATAAACATCAAACCATATTATTATCAAGGG
AACTACTTGAGCTTTGTAAAAGTTTGCTAGACTCTAATAATATTGACAGATTTGCTGGGT
AGTAGTTTCTCTTTGTATATAAATTATTATTTTCATGATTATCAATGCTTTTGATGTTTAGCCT
AGTTAGTCAATAATTGCATTTATGGTAATGGAATTACTAAGAACAATTTGTCATAGCTTG
AACTGAAATTCTAGTTTGACATAAATTTCTTTCATATTTTAAAAATAGGATATTGACTGGGT
ACCGGAA
```

ละมั่งพันธุ์ไทย ; *C. eldi siamensis* (Sample name = PKS1)

>PKS1

TTTATGCCTAAAGTACTGTTGGTGCGATTGAAAAAACAGATCGTATTTATGCAATGAAA
GTTGTGAAAAAGAGCTTGTCAATGATGATGAGGTAAGCACAATATGATGTTTTATTACC
TCTAAACTATTACATTGGCTTAAGTGTATGATATCAGAAAAATGTCAATGTTTGTGCCTT
ATTGTTTCTGTCTGCTTTTCTAAATACATGCTTCAGACTGCTTAATATATAAGGTATATTTA
AAGTTGTCTGATGATTATTAGATTTTTAAAAATAAACATCAAACCATATTATTATCAAGGG
AACTACTTGAGCTTTGTAAAAATTTGCTAGACTCTAATAATATTGACAGATTTGCTGGGT
AGTAGTTTCTCTTTGTATATAAATTATTATTTTCATGATTATCAATGCTTTTGTGTTAGCCT
AGTTAGTCAATAATTGCATTTATGGTAATGGAATTAAGAACAAATTTGTCATAGTTTTG
AACTGAAATTCTAGTTTGCATAAATTTCTTTTCATATTTTAAATAGGATATTGACTGGGT
ACAGGAA

เนื้อทราย ; *C. porcinus or Axis porcinus* (Sample name = PKP1)

>PKP1

TTTTATGCCCAAAGTACTGTTGGTGCGATTGAAAAAACAGATCGTATTTATGCAATGAA
AGTTGTGAAAAAGAGCTTGTCAATGATGATGAGGTAAGCACAATATGATGTTTTATTAC
CTCTAAACTATTACATTGGCTTAAGTGTATGATATCAGAAAAATTTCAAGTGTGTGCC
TTATTGTTTCTGTCTGCTTTTCTAAATACATGCTTCAGACTGCTTAATATATAAGGTATATT
TAAAGTTGTCTGATGATTATTAGATTTTTAAAAATAAACATCAAACCATATTATTATCAAG
GGAACTACTTGAGCTTTGTAAAAGTTTGTAGACTCTAATAATATTGACAGATTTGCTGG
GTAGTAGTTTCTCTTAGTATATAAATTATTATTTTCATGATTATCAATGCTTTTGTGTTAG
CCTAGTTAGTCAATAATTGCATTTATGGTAATGGAATTAAGAACAAATTTGTCACAGC
TTTGATACTGTCATTCTAGTTTGCATAAATTTCTTTTCATATTTTAAATAGGATATTGACT
GGGTACAGGAA

เก้งธรรมดา ; *Muntiacus muntjak* (Sample name = PKM2)

>PKM2

CTTTTATGCTAAAGTACTGTTGGTGCGATTGAAAAAACAGATCGTATTTACGCAATGAA
AGTTGTGAAAAAGAGCTTGTCAATGATGATGAGGTAAGCACAATGATGTTTTATTACCT
CTAAACTATTACATTGGCTTAAGTGTATGATATCAGAAAAATGTCAGTGTGTGCCTTA
TTGTTTCTGTCTGCTTTTCTAAATACATGCTTCAGACTGCTTAATATATAAGGTATATTTAA
AGTTGTTTGTGATGATTACTAGATTTTTAAAAATAAACATCAAACCATATTATTATCAAGGGA
AACTACTTGAGCTTTGTAAAAGTTTGTAGACTCTAATAATATTGACAGATAAGCTGGGTA
GTAGTTTCTCTTTGTATATAAATTATTATTTTCATGATTATCAATGCTTTTGTGTTAGCCTA
GTCAGTCACTAATTGCATTTATGGTGATGGAATTAAGAACAAATTTGTCATAGTTTTG
ATACTGTCGTTCTGGTTTGCATAAATTTCTTTTCATATTTTAAACATAGGATATTGACTGGGTA
CAGAA

แก้งหม้อ ; *Muntiacus feae* (Sample name = PKF1)

>PKF1

```
CTTTATGCTAAAGTACTGTTGGTGCGATTGAAAAAACAGATCGTATTTACGCAATGAAA
GTTGTGAAAAAAGAGCTTGTCAATGATGATGAGGTAAGCACAATGATGTTTTATTACCTC
TAAACGTATTACATTGGCTTAAGTGTATGATATCAGAAAAATGTCAGTGTGTGTCCTTA
TTGTTTCTGTCTGCTTTTCTAAATACATGCTTCAGACTGCTTAATATATAAGGTATATTTAA
AGTTGTCTGATGATTACTAAGATTTTTAAAAAATAAACATCAAACCACTATTATTATGAAGG
GAACTACTTGAGCTTTGTAAAAGTTTGCTAGACTCTAATAATATTGACAGATTTGCTGGG
TAGTAGTTTCTCTTTGTATATAAATTATTATTTTCATGATTATCAGTGCTTTTGTGTTAGC
CTAGTCAGTCACTAATTGCATTTATGGTGTGGAATTACTAAGAACAATTTGTCATAAGT
TTTGATACTGTCGTTCTGGTTTGACAAAAATTTCTTTCATATTTAACATAGGATATTGACT
GGGTACAGAAA
```

2. การเปรียบเทียบตัวอย่างในฐานข้อมูล (DNA Blast) โดยการนำไป Blast ในฐานข้อมูลของ NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) ผลปรากฏว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากตัวอย่างที่ศึกษาสามารถเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลที่มีอยู่ได้เป็นสัตว์วงศ์กวางในชิ้นส่วนของ intron 1 ของยีน Protein kinase C iota (PRKCJ) ได้อย่างถูกต้องทุกตัวอย่าง แต่ในฐานข้อมูลที่มีอยู่พบว่ายังไม่มีการ Submitted ตัวอย่างที่เป็นชนิดพันธุ์เดียวกันกับตัวอย่างที่ศึกษา คือ

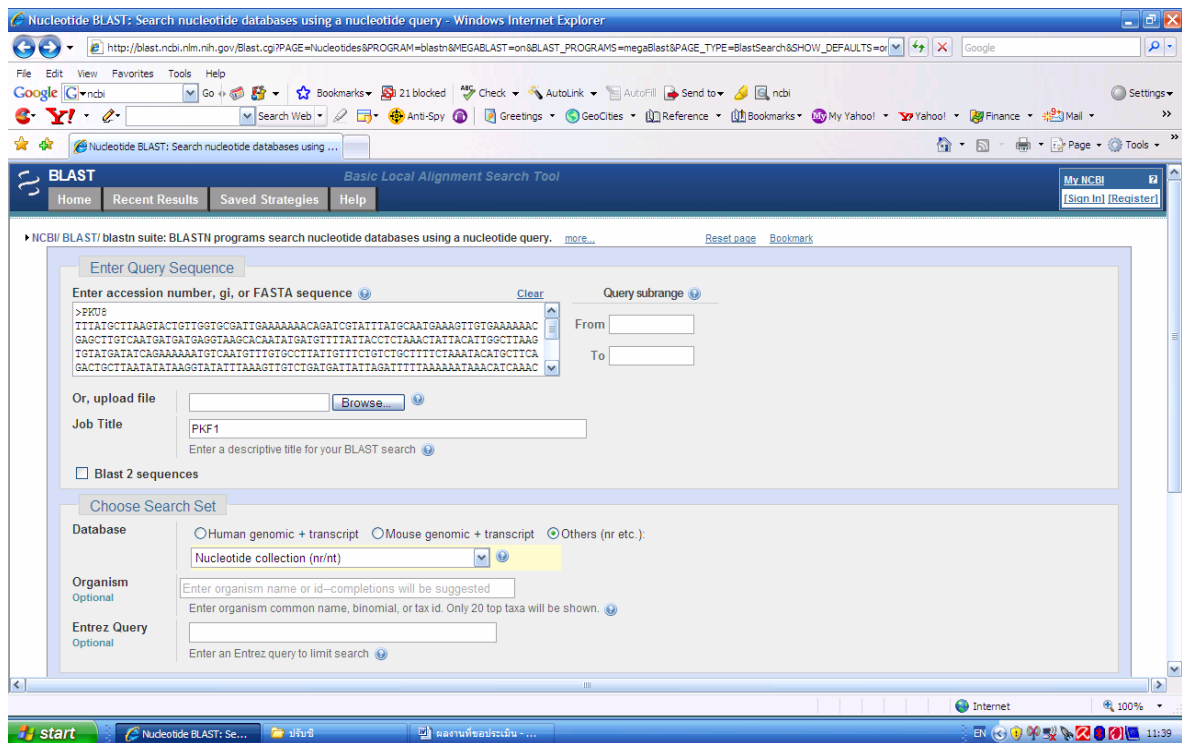
กวางป่า ; *Cervus unicolor* (Sample name = PKU8) เปรียบเทียบแล้วมีความเหมือนกับกวางรูซ่า (*Cervus timorensis* ; Assession No. DQ379333.1) 99 %

ละมั่งพันธุ์พม่า ; *C. eldi thamin* (Sample name = PKT1) และละมั่งพันธุ์ไทย; *C. eldi siamensis* (Sample name = PKS1) เปรียบเทียบแล้วมีความเหมือนกับกวางซิคะ (*Cervus nippon* ; Assession No. DQ379332.1) 98 %

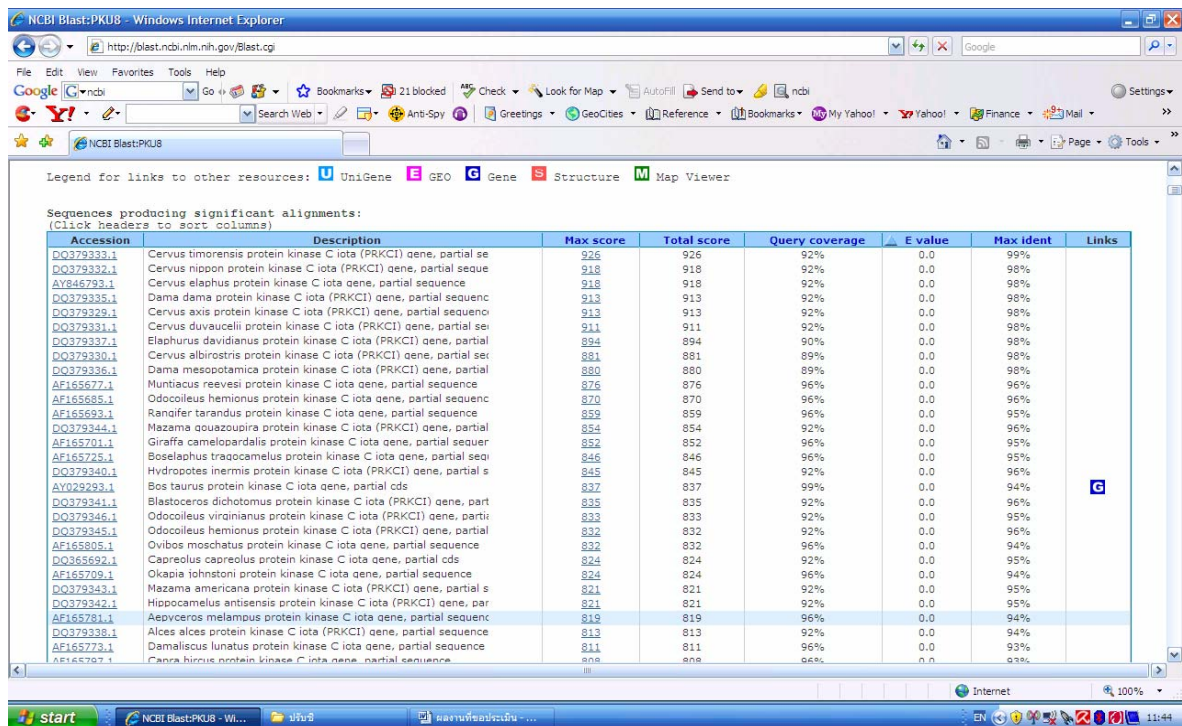
เนื้อทราย ; *C. porcinus or Axis porcinus* (Sample name = PKP1) เปรียบเทียบแล้วมีความเหมือนกับกวางดาว (*Axis porcinus* ; Assession No. DQ379329.1) 99 %

แก้งธรรมดา ; *Muntiacus muntjak* (Sample name = PKM2) และ แก้งหม้อ; *Muntiacus feae* (Sample name = PKF1) เปรียบเทียบแล้วมีความเหมือนกับ Reeves's Muntjac (*Muntiacus reevesi* ; Assession No. AF165677.1) 97 %

ตัวอย่างของการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของกวางป่า (Sample name = PKU8) ในฐานข้อมูล NCBI เป็นดังภาพที่ 6 และภาพที่ 7



ภาพที่ 6 การใส่ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ (PKU8) ในฐานข้อมูลของ NCBI



ภาพที่ 7 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ (Blastn) ในฐานข้อมูล NCBI

สรุปผลการศึกษา

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของส่วน Intron1 ของยีน *PRKCI* ของสัตว์วงศ์กวาง (Cervidae) คือ กวางป่า, ละมั่งพันธุ์พม่า, ละมั่งพันธุ์ไทย, เนื้อทราย, เก้งธรรมดา และเก้งหม้อโดยใช้คู่ไพรเมอร์ L748 และ U26 สามารถหาลำดับนิวคลีโอไทด์ได้โดยใช้ Condition ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA amplification ; PCR) ที่เหมาะสม คือ Denaturation step 94°C, 20 วินาที, Annealing step 53°C, 30 วินาที และ Extension step 72°C, 1 นาที จำนวน 35 รอบ ได้ขึ้นส่วนความยาวของลำดับเบสประมาณ 514 bp ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้สามารถนำไปเปรียบเทียบในฐานข้อมูลของ NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) ได้สัตว์วงศ์กวางและขึ้นส่วนของยีน *PRKCI* ถูกต้อง พบว่าตัวอย่างที่ทำการศึกษาทุกชนิดพันธุ์ยังไม่มีในฐานข้อมูลของ NCBI คือ กวางป่า, ละมั่งพันธุ์พม่า, ละมั่งพันธุ์ไทย, เนื้อทราย, เก้งธรรมดา และเก้งหม้อ ซึ่งในขั้นต่อไปจะส่งข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้นี้เข้าไปในฐานข้อมูล ของ NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) (DNA Sequences Submit) เพื่อใช้ประโยชน์ในการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์สัตว์ป่าของกลางในกลุ่มของสัตว์วงศ์กวางที่จะพบในอนาคตเพื่อใช้ในการจำแนกชนิดพันธุ์ที่ถูกต้องต่อไป

ข้อเสนอแนะ

ข้อมูลด้านพันธุกรรมดังกล่าว สามารถนำไปประยุกต์ใช้กับการอนุรักษ์ และจัดการสัตว์ป่าภายในประเทศไทย ตลอดจนการปล่อยสัตว์ป่าของกลางคืนสู่ธรรมชาติให้ถูกต้องตามหลักวิชาการ ซึ่งหมายถึงการปล่อยสัตว์ป่าของกลางได้ถูกต้องตามสภาพนิเวศวิทยา หรือถิ่นที่อยู่อาศัยของสัตว์ป่าของกลางชนิดนั้นๆ การปล่อยสัตว์ป่าของกลางกลับคืนสู่ป่าภายในประเทศ ควรเป็นสัตว์ป่าซึ่งเป็นชนิดพันธุ์ของประเทศไทยเท่านั้น หากตรวจสอบข้อมูลพันธุกรรมแล้วพบว่าเป็นสัตว์ป่าต่างประเทศ ควรดำเนินการจัดการปล่อยสัตว์ป่าชนิดดังกล่าวกลับคืนสู่ประเทศที่เป็นเจ้าของ หรือเป็นแหล่งกำเนิดเท่าที่จะเป็นไปได้ ซึ่งนับเป็นหนทางหนึ่งในการอนุรักษ์สัตว์ป่าอย่างยั่งยืน ในกรณีของสัตว์ป่าของกลางที่เป็นสัตว์วงศ์กวาง ซึ่งส่วนมากมักเป็นซากสัตว์ป่า หรือก้อนชิ้นเนื้อที่จำแนกชนิดได้ไม่ชัดเจนนั้น การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของสัตว์ป่าของกลางจะทำให้ทราบชนิดที่ชัดเจน ทำให้สามารถดำเนินคดี หรือช่วยให้ขั้นตอนต่างๆ ในการดำเนินคดีนั้นดำเนินต่อไปได้ง่าย รวดเร็ว และถูกต้องมากยิ่งขึ้น ซึ่งจะเป็นการช่วยแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้นจากการลักลอบค้าสัตว์ป่าในระยะยาว และฐานข้อมูลพันธุกรรมสัตว์ป่านี้อาจมีส่วนช่วยให้การทำงานด้านการอนุรักษ์สัตว์ป่ามีความเป็นระบบ และมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

เอกสารอ้างอิง

- จอห์น พาร์. 2546. สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมในประเทศไทย. สำนักพิมพ์สารคดี. กรุงเทพฯ. 216 น.
- Azanza, B. 1993. Sur la nature des appendices frontaux des cervidés (Artiodactyla, Mammalia) du MioCène infÉrieur et moyen. Remarques sur leur systématique et leur phylogÉnic. **C. R. Acad. Sci. Paris II.** 316 : 1163-1169.
- Cronin, M. A., R. Stuart, B.J. Pierson and J. C. Patton. 1996. *K*-casein gene phylogeny of higher ruminants (Pecora, Artiodactyla) **Mol. Phylogenet. Evol.** 6 : 295-311.
- Di Stefano, G. and C. Petronio. 2002. Systematics and evolution of the Eurasian Plio-Pleistocens tribe Cervini (Artiodactyla, Mammalia). **Geol. Romana.** 36 : 311-334.
- Eisenberg, J. F. 1981. The mammalian radiations. **An analysis of trends in evolution, adaptation and behavior.** The University of Chicago press, Chicaao and London.
- Emerson, B. C. and M. L. Tate. 1993. Genetic analysis of evolutionary relationships among deer, Subfamily Cervidae. **J. Hered.** 84 : 266-273.
- Gentry, A.W. 1994. The Miocene Differentiation of Old World Pecora (Mammalia). **Hist. Biol.** 7 : 115-158.
- Groves, C. P. and P. Grubb. 1987. Relationships of living deer. Pp. 21-59. *In* C. M. Wemmer (ed.) **Biology and management of the Cervidae.** Smithsonian Institution Press, Washington and London.
- Grubb, P. 1993. A taxonomic and geographic reference. Pp. 384-392. *In* D. E. Wilson and D. M. Reeder (eds.) **Mammal species of the world.** Smithsonian Institution Press, Washington and London.

- Han, D. 1985. Preliminary study of the fossils of the order Artiodactyla from the ancient fossil locality of Lufeng : Renlixue Xuebao. **Acta Anthropol. Sinica**. 4 : 4-54.
- Hey, J. 2001. The mind of the species problem. **Trend Eco. Evo**. 16 : 326-329.
- IUCN. 2000. **2000 IUCN Red List of Threatened Species : a global species assessment**. International Union for the Conservation of Nature and Natural Resources. 191p.
- Janis, C. M. and K. M. Scott. 1987. The interrelationships of higher ruminant families, with special emphasis on the members of the Cervidae. **Am. Mus. Novit**. 2893 : 1-85.
- Lakagul, B. and J. A. McNeely. 1977. **Mammals of Thailand**. Kurushpa Ladprao Press, Bangkok, Thailand.
- Liu, X. H., Y. Q. Wang, Z. Q. Liu and K. Y. Zhou. 2003. Phylogenetic relationships of Cervinae based on sequence of mitochondrial cytochrome *b* gene. **Zool. Res**. 24 : 27-33.
- Mayr, E. 1964. **Systematics and the origin of species**. Dover publications, Inc. New York. 334.
- Randi, E., N. Mucci, F. Claro-Hergueta, A. Bonnet and E. J. P. Douzery. 2001. A mitochondrial DNA control region phylogeny of the Cervinae : speciation in *Cervus* and implications for consevation. **Anim. Conserv**. 4 : 1-11.
- Ropiquet, A. and A. Hassanin. 2005. Molecular evidence for the polyphyly of the genus *Hemitragus* (Mammalia, Bovidae). **Mol. Phylogenet. Evol**. 36 : 154-168.
- Pitra, C., J. Fickel, E. Meijaard and C. P. Groves. 2004. Evolution of old world deer. **Mol. Phylogenet. Evol**. 33 : 880-895.
- Scott, K. M. and C. M. Janis. 1987. Phylogenetic relationships of the Cervidae, and the case for a superfamily Cervoidea. In C. M. Wemmer (ed.) **Biology and management of the Cervidae**. Smithsonian Institution Press, Washington and London.