รหัสโครงการ 2554A10862002

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การพัฒนาเทคนิคการพิสูจน์อัตลักษณ์ของโลมาอิรวดี (*Orcaella brevirostris*) ในสถานที่เพาะพันธุ์ด้วยลายพิมพ์ดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์

Development of individual identification techniques for Irrawaddy dolphins (*Orcaella brevirostris*) in captivity using microsatellite DNA fingerprinting

วันศุกร์ เสนานาญ
ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยบูรพา

ก้องเกียรติ กิตติวัฒนาวงศ์ สุรศักดิ์ ทองสุกดี
สมชาย มั่นอนันต์ทรัพย์ และนิภาวรรณ บุศราวิช
กรมทรัพยากรธรรมชาติทางทะเล และชายฝั่ง

สนับสนุนโดย สำนักบริหารโครงการวิจัยในอุดมศึกษา
และพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ
สำนักคณะกรรมการการอุดมศึกษา

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยชิ้นนี้ ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจาก สำนักบริหารโครงการวิจัยในอุดมศึกษาและพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ สำนักคณะกรรมการการอุดมศึกษา ผู้วิจัยยังได้รับการสนับสนุนตัวอย่าง (และค่าใช้จ่ายที่เกี่ยวข้องกับการเก็บตัวอย่าง) จากสถาบันวิจัยและพัฒนาทรัพยากรทางทะเล ชายฝั่งทะเล และป่าชายเลน ศูนย์วิจัยทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่งอ่าวไทยตอนบน ศูนย์วิจัยทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่งอ่าวไทยตอนกลาง และศูนย์วิจัยทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่งอ่าวไทยฝั่งตะวันออก

ผู้วิจัยได้รับการสนับสนุนด้านเทคนิค และงานเอกสาร จากนิสิตระดับปริญญาโท และบุคคลากรของภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา โดยเฉพาะอย่างยิ่งนางสาวสุภาพร สอนแก้ว นิสิตปริญญาโท สาขาวาริชศาสตร์ ผู้วิจัยขอขอบคุณ มา ณ โอกาสนี้

บทคัดย่อ

โลมาอิรวดี หรือโลมาหัวบาตร (*Orcaella brevirostris*) เป็นสัตว์ที่รับความคุ้มครองในระดับชาติ และนานาชาติ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีเครื่องมือที่ถูกต้องแม่นยำในการติดตามตัวสัตว์ในสถานแสดงโลมา สถานเพาะพันธุ์ และในธรรมชาติเพื่อเตรียมพร้อมสำหรับการอนุรักษ์ในอนาคต การศึกษานี้จึงทดสอบประสิทธิภาพของลายพิมพ์ดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์ 11 ตำแหน่ง (8 ตำแหน่งพัฒนามาจากโลมาปากขวด และ 3 ตำแหน่งพัฒนาขึ้นมาใหม่) ในการบ่งชี้อัตลักษณ์ของโลมาอิรวดีจากอ่าวไทย โดยใช้ตัวอย่างซากเกยตื้นจากอ่าวไทย (n=36) และทะเลอันดามัน (n=3) ที่รวบรวมระหว่างปี พ.ศ. 2537-2553 ผลการศึกษา พบว่าเครื่องหมายที่พัฒนาขึ้นมาใหม่ 3 ตำแหน่ง มีระดับความหลากหลายในระดับปานกลาง (จำนวนอัลลิลต่อตำแหน่ง=8-18) และลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ประกอบไปด้วยเครื่องหมายทั้ง 11 ตำแหน่ง สามารถบ่งชี้อัตลักษณ์ของโลมาอิรวดีจากอ่าวไทยได้ โดยมีค่าความน่าจะเป็นที่ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของสัตว์สองตัวจะซ้ำกัน (PI) เท่ากับ 2×10^{-12} และ 3.3×10^{-5} สำหรับกรณีที่สัตว์ไม่ได้มีความสัมพันธ์ทางเครือญาติ และสัตว์ที่มีความสัมพันธ์ ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ประกอบไปด้วยเครื่องหมายอย่างน้อย 6 ตำแหน่งก็เพียงพอที่จะ บ่งชี้อัตลักษณ์ของโลมาอิรวดีจากอ่าวไทยได้ (ค่า PIsibs เท่ากับ 2.0×10^{-3} หรือ 2 ตัวใน 1,000 ตัว)

ระดับความหลากหลายทางพันธุกรรมของกลุ่มตัวอย่างส่วนใหญ่ (อ่าวไทยตอนกลาง, Gulf-C; ตราด, TRT; อ่าวไทยตอนในฝั่งตะวันออกและฝั่งตะวันตก, UG-E, UG-W) อยู่ในระดับใกล้เคียงกันระหว่างกลุ่มโลมาอิรวดี (ค่า allelic richness เฉลี่ยทุกตำแหน่ง= 3.18-3.92 และค่า observed heterozygosity = 0.58-0.69) ส่วนกลุ่มตัวอย่างจากอันดามัน มีค่า allelic richness เฉลี่ยทุกตำแหน่งน้อยที่สุดคือ 2.73 เมื่อพิจารณาความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่มพบว่า ตัวอย่างจากอันดามัน มีแนวโน้มที่จะต่างกับตัวอย่างจากอ่าวไทย และพบความแตกต่างระหว่างกลุ่มตัวอย่างภายในอ่าวไทย โดยตัวอย่าง Gulf-C และ TRT ต่างกับตัวอย่างจากอ่าวไทยตอนใน (UG-E, UG-W) ส่วนความต่างทางพันธุกรรมระหว่าง Gulf-C และ TRT และระหว่าง UG-E และ UG-W ยังไม่สามารถหาข้อสรุปได้อย่างแน่ชัดเนื่องจากหลายวิธีการทดสอบยังให้คำตอบที่ไม่ตรงกัน

การจัดกลุ่มตัวอย่างใหม่ตามระดับความคล้ายกันของจีโนไทป์ของสัตว์แต่ละตัว โดย Discriminant analysis of principal components สามารถแบ่งกลุ่มได้ 2 – 3 กลุ่ม ที่ประกอบด้วย (1) ตัวอย่างส่วนใหญ่อ่าวตราด+อ่าวไทยตอนกลาง (2) ตัวอย่างส่วนใหญ่จากอ่าวไทยตอนในทั้งสองฝั่ง และ (3) คละจำนวนจากตราด ชลบุรี และจันทบุรี ซึ่งอาจบ่งชี้แหล่งพันธุกรรมอื่นที่แตกต่างจาก 2 กลุ่มข้างต้น

คำสำคัญ: โลมาอิรวดี, *Orcaella brevirostris*, ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ, ไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ

Abstract

Irrawaddy dolphin (*Orcaella brevirostris*) is a protected species under national and international laws. To prepare for future conservation measures, we need a standardized tool to identify individuals in captivity and in the wild. This study evaluated the effectiveness of DNA fingerprinting profiles consisting of 11 microsatellite loci for individual identification. Eight loci were derived from bottlenose dolphin and three were newly developed for Irrawaddy dolphin under the present study. I analyzed multilocus genotypes of 39 stranded individuals collected during 2003 to 2011 from the Gulf of Thailand (n=36) and Andaman Sea (n=3). The novel markers revealed a reasonable level of polymorphisms (allele per locus = 8-18). A combination of eleven loci were adequate for identification of individuals obtained from the Gulf of Thailand, with a probablity of identiy (PI) value of 2×10^{-12} and 3.3×10^{-5} for unrelated and sibs (PIsibs) respectively. A DNA fingerprint that can differentiate individuals from the Gulf of Thailand would require at least six loci (PIsibs = 2.0×10^{-3}).

Most samples (four samples from Gulf of Thailand, Gulf-C, TRT, UG-E and UG-W) had moderate levels of genetic diversity (allelic richness averaged across loci= 3.18-3.92; observed heterozygosity averaged across loci = 0.58-0.69). The Andaman sample had the lowest value of allelic richness (2.73). I detected population genetic structure among samples. The Andaman sample was likely to be different from the Gulf of Thailand samples. Samples with Gulf of Thailand were also genetically distinct with Gulf-C & TRT (central Gulf of Thailand and Trat bay) being different from UG-E & UG-W (inner Gulf of Thailand). The difference between Gulf-C and TRT as well as between UG-E and UG-W were inconclusive as different tests offered slightly different insigts.

An indivudal assignment approach, Discriminant Analysis of Principal component (DAPC), offered an interesting insight. All individuals can be grouped into two to three clusters, (1) most individuals from TRT and Gulf-C, (2) most individuals from UG-E and UG-W and (3) a mixture of few individuals from UG-E and TRT. The third group may represent another genetic source as it is close proximity to anther coastal population of Cambodia.

Keywords : Irrawaddy dolphin, *Orcaella brevirostris*, microsatellite genetic markers, DNA fingerprints

สารบัญเรื่อง

สารบัญภาพ

สารบัญตาราง

บทนำ

โลมาอิรวดี หรือโลมาหัวบาตร (Irrawaddy dolphin, *Orcaella brevirostris*) เป็นหนึ่งใน 11 ชนิดของโลมาที่พบในน่านน้ำไทย (นิติกรและอังสุนีย์ 2545) และเป็นสัตว์ที่รับความคุ้มครองในระดับชาติ และนานาชาติ ทั้งนี้เนื่องจากประชากรของโลมาชนิดนี้มีแนวโน้มที่จะลดลงอย่างมากจนอยู่ในภาวะวิกฤตมีโอกาสที่จะสูญพันธุ์ ดังจะเห็นได้จากปรับการปรับเลื่อนสถานภาพของโลมาชนิดนี้จากสัตว์สงวนคุ้มครองตามบัญชีที่ 2 สู่บัญชีที่ 1 ในอนุสัญญาว่าด้วยการค้าระหว่างประเทศ ชนิดพันธุ์สัตว์ป่าและพืชป่าที่ใกล้สูญพันธุ์ (CITES: Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora) และสหภาพสากลว่าด้วยการอนุรักษ์ (IUCN: The International Union for Conservation of Nature and Natural Resources) ได้จัดให้บางประชากรเป็นสัตว์ที่มีแนวโน้มใกล้สูญพันธุ์อย่างวิกฤต (Critical Endangered) ในบัญชีสถานภาพทรัพยากรชีวภาพ (IUCN Red List of Threatened Species) สาเหตุที่ทำให้จำนวนโลมาอิรวดีมีแนวโน้มที่ลดลง รวมถึงภาวะความเสื่อมโทรมของสภาพแวดล้อมชายฝั่งทะเลที่ทำลายแหล่งที่อยู่อาศัยและแหล่งหากิน การตายอันเนื่องจากเครื่องมือทำการประมงในพื้นที่ที่มีการแพร่กระจายของโลมาอิรวดี และการลักลอบจับโลมาอิรวดีเพื่อนำไปแสดงในสถานแสดงพันธุ์สัตว์น้ำต่างๆ

ในประเทศไทยโลมาอิรวดีมีการแพร่กระจายทั่วไปตามทะเลชายฝั่งทั้งอ่าวไทย และทะเลอันดามัน โดย จะพบมากในบริเวณอ่าวไทยตอนบนโดยเฉพาะบริเวณพื้นที่ปากแม่น้ำสายสำคัญๆ (สุรศักดิ์และสุชาติ 2548) นอกจากนี้สามารถพบเห็นบริเวณเขตพื้นที่ทะเลสาบสงขลา (สุพจน์และคณะ 2539; นิติกรและอังสุนีย์ 2545) อย่างไรก็ตามจำนวนโลมาอิรวดีบริเวณทะเลสาบสงขลา มีจำนวนลดลงเรื่อยๆ และมีรายงานการตายอย่างสม่ำเสมอจนน่าเป็นห่วง ในปี พ.ศ. 2552 กรมทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่งได้ประเมินจำนวนโลมาอิรวดีในแหล่งสำคัญๆ และรายงานค่าที่อยู่ในช่วง 5-50 ตัวต่อแหล่ง ซึ่งเมื่อคิดรวมทั้งประเทศแล้วมีจำนวนโลมาชนิดนี้อยู่เพียงไม่ถึง 200 ตัว

เนื่องจากโลมาอิรวดีเป็นสัตว์ที่มีพฤติกรรมน่ารัก ฉลาดและแสนรู้ ประกอบกับสามารถอยู่ได้ในน้ำจืด ซึ่งมีค่าใช้จ่ายในการดูแลรักษาน้อยกว่าโลมาที่อยู่น้ำเค็มมาก จึงทำให้โลมาอิรวดีเป็นที่ต้องการในสถานแสดงพันธุ์สัตว์ทะเลหลายแห่งในประเทศไทย และต่างประเทศ ในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้มีสถานแสดงพันธุ์สัตว์น้ำที่มีการแสดงโลมากว่า 80 แห่ง และกำลังอยู่ระหว่างการก่อสร้างอีกถึง 13 แห่ง (เพชร 2547) ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีความต้องการใช้โลมาอิรวดี สำหรับธุรกิจนี้ที่เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ซึ่งถ้าไม่มีมาตรการในการควบคุมการจับ และการครอบครองแล้ว อาจจะทำให้ประชากรที่อยู่ในสภาวะวิกฤตอยู่แล้ว เสี่ยงต่อการสูญพันธุ์มากยิ่งขึ้น (Fisher and Reeves, 2005)

มาตรการหนึ่งในการลดการลักลอบใช้โลมาจากธรรมชาติมาทดแทนโลมาที่ได้รับอนุญาตในเลี้ยงในที่กักขัง (การสวมสิทธิ) คือการสร้างระบบการบ่งชี้อัตลักษณ์ของโลมาใน

สถานที่เพาะเลี้ยง แม้ว่าในปัจจุบัน ผู้ครอบครองโลมาจะต้องยื่นขออนุญาตต่อกรมประมงต่อเนื่องทุกปี เนื่องจากโลมาเป็นสัตว์ที่ได้รับความคุ้มครองตามกฎหมาย แต่หน่วยงานที่เกี่ยวข้อง ยังขาดหลักเกณฑ์ที่ชัดเจน และขาดเครื่องมือที่เหมาะสมในตรวจสอบอัตลักษณ์ของโลมาที่อยู่ในสถานแสดงพันธุ์สัตว์ทะเล และลูกหลานของโลมาเหล่านี้ ซึ่งเป็นปัญหาสำหรับการบริหารจัดการค่อนข้างมาก และเป็นช่องทางให้มีการสวมสิทธิโลมาได้ ดังนั้นหน่วยงานที่เกี่ยวข้องกับการอนุรักษ์ และการติดตามตรวจสอบใบอนุญาต จึงมีความจำเป็นเร่งด่วนในการพัฒนาระบบดังกล่าว การวิจัยนี้จึงต้องการพัฒนาเครื่องมือที่มีความแม่นยำสูง และเป็นที่ยอมรับในระดับนานาชาติ สำหรับหน่วยงาน และธุรกิจที่เกี่ยวข้อง ในการตรวจติดตามอัตลักษณ์ของโลมาในแหล่งเพาะเลี้ยง และในการขนย้ายโลมาที่ถูกกฎหมาย ระหว่างประเทศ

การศึกษานี้ จะสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ด้วยดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์หลายตำแหน่ง ซึ่งเป็นชิ้นดีเอ็นเอชิ้นเล็กๆ (น้อยกว่า 500 คู่เบส) ที่มีจำนวนซ้ำของนิวคลีโอไทด์เป็นช่วงๆ ในการพัฒนาลายพิมพ์ดีเอ็นเอดังกล่าว จำเป็นต้องตอบคำถามให้ได้ว่า **ต้องใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์กี่ตำแหน่ง**จึงจะเพียงพอที่จะบ่งชี้อัตลักษณ์ของโลมาอิรวดีที่อยู่ในสถานแสดงพันธุ์สัตว์ทะเล ในการพิสูจน์ลักษณ์บุคคลที่เป็นที่ยอมรับในระดับสากล มีการใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ 13 ตำแหน่ง และแต่ละตำแหน่งมีจำนวนขนาดของดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน (อัลลิล) ไม่น้อยกว่า 9 อัลลิล (Weir, 2007) เพื่อให้มั่นใจว่าลายพิมพ์ดีเอ็นเอของผู้กระทำผิด ไม่ซ้ำกับลายพิมพ์ฯของคนอื่น นอกจากนี้ เครื่องมือและข้อมูลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ ยังสามารถใช้เป็นฐานข้อมูลทางพันธุกรรมของประชากรโลมาอิรวดีในประเทศไทยได้

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. ทดสอบประสิทธิภาพของดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์ ที่มีการพัฒนาสำหรับโลมาในปัจจุบัน รวมถึงการพัฒนาเครื่องหมายพันธุกรรมขึ้นมาใหม่ ในการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะต่อตัวตน ของโลมาอิรวดีที่มีอยู่ในสถานแสดงพันธุ์สัตว์น้ำในประเทศไทย
2 สร้างฐานข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรโลมาอิรวดีในประเทศไทย
3. ตรวจสอบโครงสร้างทางพันธุกรรมของโลมาอิรวดีในอ่าวไทย และทะเลอันดามัน

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้เครื่องมือที่มีความแม่นยำสูงในการตรวจติดตามตัวสัตว์ ที่ได้รับอนุญาตในการครอบครอง เพื่อจะลดปัญหาการลักลอบจับโลมาจากธรรมชาติมาสวมสิทธิ์
2. ได้ข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรโลมาอิรวดีในประเทศไทย โดยเฉพาะอย่างยิ่งในอ่าวไทย
3. เป็นต้นแบบในการพัฒนาเทคนิคในการพิสูจน์อัตลักษณ์โลมาในธรรมชาติ
4. เป็นต้นแบบในการพัฒนาเครื่องมืออนุรักษ์สำหรับโลมาหรือวาฬชนิดอื่น

ทฤษฎี และเอกสารที่เกี่ยวข้อง

การศึกษานี้ อาศัยแนวคิดจากการพิสูจน์อัตลักษณ์บุคคล โดยใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์ มาประยุกต์ในงานอนุรักษ์โลมา เนื่องจากดีเอ็นเอประเภทนี้มีความหลากหลายค่อนข้างสูง และพบได้ทั่วไปในจีโนมของสิ่งมีชีวิตเกือบทุกชนิด การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ อาศัยเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุล ซึ่งประกอบด้วย (1) การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอปริมาณน้อยๆ ให้มีปริมาณเพิ่มมากขึ้น ซึ่งจำเป็นสำหรับการพิสูจน์หลักฐานที่มีปริมาณดีเอ็นเอน้อยๆ เช่น คราบเลือด เส้นผม หรือน้ำลาย หรือในสัตว์ใกล้สูญพันธุ์ที่มีคุณค่าสูง ที่ไม่สามารถรบกวนสัตว์มากจนเกินไปในการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อ หรือสัตว์ที่ไม่สามารถเข้าถึงตัวได้ง่าย (e.g., Smith and Wayne, 1996) และ (2) การใช้ดีเอ็นเอที่มีความหลากหลายสูง ที่จำเพาะต่อตัวตนของคน หรือสิ่งมีชีวิตที่สนใจ (ซึ่งตั้งอยู่บนสมมติฐานที่ว่าไม่มีใครที่มีดีเอ็นเอเหมือนกัน ยกเว้นฝาแฝดที่เกิดจากไข่ใบเดียวกันเท่านั้น)

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่ หรือพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction, PCR) เป็นเทคนิคที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอชิ้นสั้น ๆ โดยจำลองกระบวนการซ่อมแซมสายดีเอ็นของเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส ซึ่งรวมถึงการเตรียมวัตถุดิบสำหรับการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่ และการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิขึ้นลงหลายๆ รอบ เพื่อให้สายดีเอ็นเอแยกออกจากกัน รวมกับไพร์เมอร์ซึ่งชิ้นดีเอ็นที่ขนาบยืนที่สนใจ และซ่อมสายดีเอ็นให้สมบูรณ์ (วิชัยและคณะ 2545) พีซีอาร์จึงเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอแบบทวีคูณ จากดีเอ็นเอปริมาณน้อยๆ เป็นปริมาณหลายล้านชุดในระยะเวลาอันสั้น

วัตถุดิบที่สำคัญสำหรับพีซีอาร์ คือ ดีเอ็นเอต้นแบบ ไพร์เมอร์ 2 สาย แต่ละสายมีลำดับเบสที่เข้าคู่ กับลำดับเบสส่วนปลาย 3 ของสายดีเอ็นเอต้นแบบแต่ละสาย, นิวคลีโอไทป์หรือเบส (dNTP); อะดีนีน (Adenine, A), กัวนีน (Guanine, G), ไซโตซีน (Cytosine, C) และไธมีน (Thymine, T), เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส (DNA Polymerase) ทำหน้าที่ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่, แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) เป็นสาร เร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ (DNA Polymerase), บัพเฟอร์ (Buffer) สารที่ทำให้สภาพของสารในหลอดทดลองมีสภาวะความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาและ น้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อใช้ผสมกับสารดังกล่าวมาข้างต้น คุณภาพของผลผลิตพีซีอาร์ขึ้นอยู่กับคุณภาพของดีเอ็นเอ ซึ่งได้รับอิทธิพลจากการเก็บรักษาเนื้อเยื่อ ซึ่งการศึกษาในครั้งนี้จะทดสอบผลของประเภทของเนื้อเยื่อ วิธีการเก็บรักษาเนื้อเยื่อ และ วิธีการสกัดดีเอ็นเอ ต่อคุณภาพของดีเอ็นเอต้นแบบที่จะใช้ในพีซีอาร์ และต่อคุณภาพของผลผลิตพีซีอาร์

เครื่องหมายพันธุกรรมที่จะใช้ในการศึกษานี้คือ ไมโครแซเทลไลท์ดีเอ็นเอ ซึ่งเป็นบริเวณของโครโมโซมที่มีลักษณะการเรียงตัวของเบสซ้ำกัน ตั้งแต่ 1-6 เบส เป็นช่วงๆ บริเวณนี้จะมีความแปรผันของดีเอ็นเอสูง จึงเหมาะสมที่จะใช้ตรวจสอบถึงความแตกต่างทางพันธุกรรมระดับครอบครัวหรือสมาชิกในครอบครัว ข้อดีของเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดนี้คือ

(1) ความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง (มีหลายอัลลิล) (2) มีการปรากฏของอัลลิลที่ได้รับจากพ่อ และแม่ ที่แต่ละตำแหน่ง (3) มีการกระจายอยู่ทั่วไปในจีโนม (4) มีความจำเพาะต่อชนิดสูง เนื่องจาก ชิ้นส่วนไพร์เมอร์ ในการเพิ่มสายดีเอ็นเอ ค่อนข้างจะจำเพาะต่อไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ แต่ละตำแหน่ง และ (5) ต้องการเนื้อเยื่อที่ใช้สำหรับการสกัดดีเอ็นเริ่มต้นในพีซีอาร์เพียงเล็กน้อย ปัจจัยเหล่านี้เป็นสิ่งสำคัญในการทำงานกับสัตว์หายาก (Smith and Wayne 1996) เนื่องจากไม่จำเป็นต้องฆ่าสัตว์ และ บางครั้งสามารถใช้ชิ้นส่วนอย่างอื่น (เช่นอุจจาระ หรือ ขน) ที่ไม่จำเป็นต้องเก็บจากตัวสัตว์โดยตรง

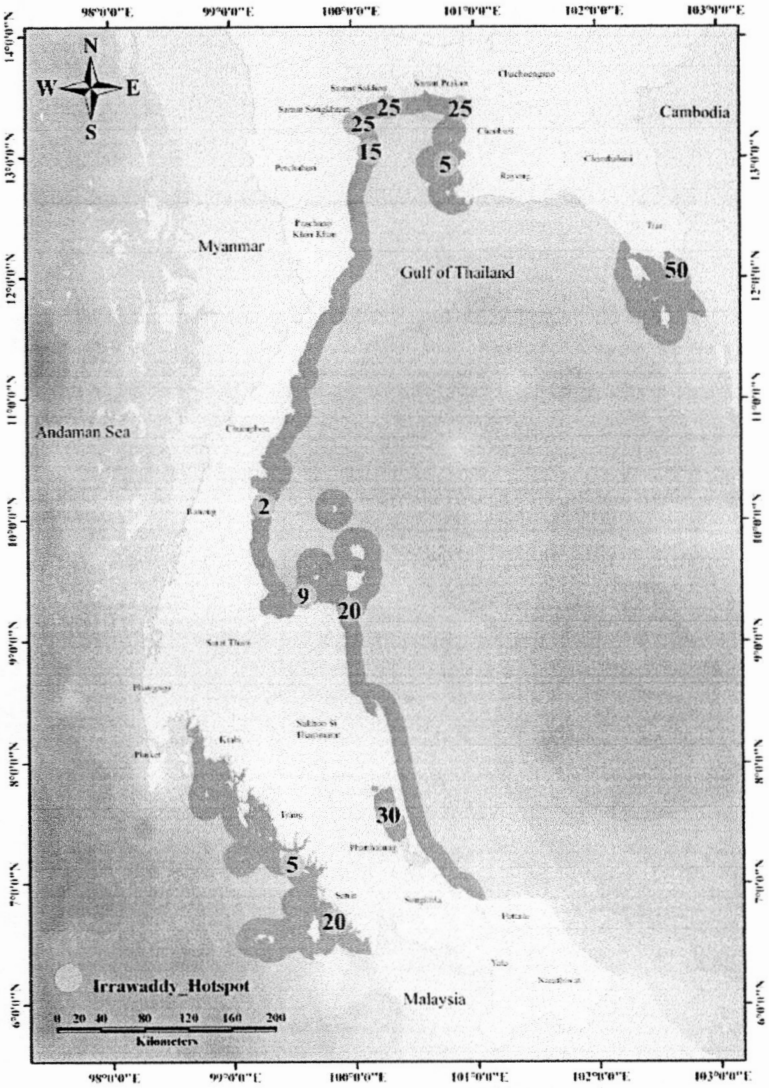
ลายพิมพ์ดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์มักประกอบด้วย ไมโครแซทเทลไลท์หลายตำแหน่ง เนื่องจากจะทำให้มีความเฉพาะตัวสูง โดยจำนวนตำแหน่งที่จะใช้บ่งชี้อัตลักษณ์จะขึ้นกับระดับความหลากหลายของเครื่องหมายพันธุกรรม และความถี่ของอัลลิลในแต่ละตำแหน่งที่พบในประชากร ซึ่งต้องมีการประเมินสำหรับสิ่งมีชีวิตแต่ละประชากรที่สนใจ ในการพิสูจน์ลักษณ์บุคคลที่เป็นที่ยอมรับในระดับสากล มีการใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ 13 ตำแหน่ง และแต่ละตำแหน่งมีจำนวนขนาดของดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน (อัลลิล) ไม่น้อยกว่า 9 อัลลิล (Weir 2007) เพื่อให้มั่นใจว่าลายพิมพ์ดีเอ็นเอของผู้กระทำผิด ไม่ซ้ำกับลายพิมพ์ฯของคนอื่น และจำเป็นต้องคำนวณความถี่ของอัลลิลและจีโนไทป์ในประชากรของคนหลายๆ เชื้อชาติ นอกจากนี้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์ ยังสามารถใช้บอกความสัมพันธ์ระดับครอบครัวได้ โดยใช้หลักการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของเมนเดลที่ว่าลูกจะได้รับอัลลิลมาจากพ่อและแม่อย่างละ 1 ชุด ที่เครื่องหมายพันธุกรรมตำแหน่งหนึ่งๆ (Jones and Ardren 2003)

ข้อมูลเบื้องต้นเกี่ยวกับโลมาอิรวดี และข้อมูลทางพันธุกรรม

โลมาอิรวดี หรือโลมาหัวบาตร เป็นสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่อาศัยอยู่ในน้ำ อยู่ร่วมกันเป็นฝูงและมีระบบสังคมที่ซับซ้อน มีอายุยืนเต็มที่ประมาณ ๓๐ ปี โลมาชนิดนี้เป็นเป็นโลมาชนิดไม่มีจงอยปาก (Beak) หัวกลมมน ลักษณะภายนอกสีน้ำเงินเทาด้านหลังและสีเทาจางด้านท้อง โลมาชนิดนี้อาศัยอยู่ในแม่น้ำสายใหญ่หลายสายในเอเชีย เช่น แม่น้ำโขงในเวียดนาม กัมพูชา และลาว แม่น้ำอิรวดีในพม่า นอกจากนี้ยังพบอาศัยอยู่ใกล้ชายฝั่งทะเลของเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และทางตอนเหนือของออสเตรเลีย ในประเทศไทยพบโลมาอิรวดีได้ตามแนวชายฝั่งทะเลทั้งด้านอ่าวไทยและอันดามัน (ภาพที่ 1) โดยพบมากที่ชายทะเลจังหวัดตราด และอ่าวไทยตอนในที่สำคัญยังพบโลมาอิรวดีในทะเลสาบสงขลา ซึ่งถือเป็นทะเลสาบน้ำจืดหนึ่งในสองแห่งของโลกที่มีโลมาอิรวดีอาศัยอยู่ (กาญจนาและก้องเกียรติ 2547)

แม้ว่าจะยังไม่มีการอธิบายลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพร์เมอร์ที่พัฒนาสำหรับโลมาอิรวดี แต่ก็ได้มีการพัฒนาไพร์เมอร์ของไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอในโลมาหลายชนิด เช่น โลมาปากขวด (*Tursiops aduncus* ; Nater et al. 2009 และ *T. truncatus*; Rosel et al. 2005) โลมากระโดด (*Stenella longirostris*; e.g., Farro et al. 2008) โลมาลายแถบ (*Stenella coeruleoalba*; e.g., Mirimin et al. 2006) โลมาหลังโหนก (*Sousa chinensis*; Chen and

Yang 2009) และโลมาหัวบาตรหลังเรียบ (*Neophocoena phocoenoides*; Chen and Yang 2008) โดยความหลากหลายทางพันธุกรรมค่อนข้างแปรปรวนในต่างตำแหน่งและต่างชนิด โดยมีจำนวนอัลลิลต่อตำแหน่งตั้งแต่ 2-23 อัลลิล โดยปกติไพร์เมอร์ที่พัฒนามาสำหรับสัตว์ชนิดหนึ่งมักจะสามารถเพิ่มดีเอ็นเอของใช้ได้กับสัตว์ที่มีลักษณะใกล้เคียงทางพันธุกรรมได้ ซึ่งข้อสังเกตนี้ก็เป็นจริงสำหรับความสามารถของไพร์เมอร์ที่พัฒนาสำหรับโลมาปากขวด ในการเพิ่มดีเอ็นเอของโลมา อิรวดี (เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ 7 ตำแหน่งที่ใช้ในการศึกษาของ Ludwig and Lieckfeldt (2010) อย่างไรก็ตาม การศึกษาดังกล่าว แสดงถึงความหลากหลายของอัลลิลตั้งแต่ 2-4 อัลลิลต่อตำแหน่งซึ่งค่อนข้างน้อยสำหรับการทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอ และน้อยกว่าความหลากหลายที่พบในโลมาปากขวดค่อนข้างมาก ดังนั้นจึงต้องมีการทดสอบเพิ่มเติมเพื่อให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะต่อตัวโลมา



ภาพที่ 1. การแพร่กระจายและจำนวนของโลมาอิรวดีที่พบในประเทศไทย (ที่มา: เวปไซต์ http://www.dmcr.go.th/)

ข้อมูลทางพันธุกรรมของโลมาอิรวดี ยังมีค่อนข้างน้อย มีเพียงการศึกษาของ Ludwig and Lieckfeldt (2010) ที่ใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ 7 ตำแหน่ง และบริเวณดีลูปของไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอในโลมาอิรวดีที่พบในบริเวณแม่น้ำโขง (23 ตัวอย่าง) ซึ่งผู้วิจัยพบว่าความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ของไมโตคอนเดรียลดีลูป บ่งชี้ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรแม่น้ำโขง และประชากรของอินโดนีเซีย และประชากรที่อยู่บริเวณชายฝั่ง และไม่พบการลดลงของจำนวนรูปแบบที่แตกต่างกันของลำดับฯ (แฮพโพลไทป์) ในประชากรแม่น้ำโขง ซึ่งเป็นหนึ่งในประชากรที่เสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ นอกจากนี้ความหลากหลายทางพันธุกรรมของไมโครแซทเทลไลท์ก็ไม่ได้ลดลงเมื่อเทียบกับการศึกษาของ Krützen et al. (2001) ยกเว้นที่ 1 ตำแหน่ง

วิธีการดำเนินการวิจัย

การรวบรวมตัวอย่างโลมา

รวบรวมเนื้อเยื่อ (หนังและกล้ามเนื้อ) ของซากโลมาอิรวดี ที่เกยตื้นบริเวณชายฝั่งอ่าวไทย และทะเลอันดามัน ที่รวบรวมโดยหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง ของกรมทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง (หน่วยงานของผู้ร่วมวิจัย) มาตั้งแต่ปี พ.ศ. 2537 จนถึง พ.ศ. 2553 (ตารางที่ 1) โดยสามารถรวบรวมได้ทั้งสิ้น 39 ตัว ซึ่งสามารถแบ่งเป็นกลุ่มตามแหล่งที่พบ (ตารางที่ 1) ได้ 5 กลุ่ม คือ (1) ทะเลอันดามัน (Andaman) (2) บริเวณอ่าวไทยตอนในฝั่งตะวันตก (UG-W) ซึ่งได้แก่ จังหวัดสมุทรปราการ สมุทรสาคร และเพชรบุรี (3) อ่าวไทยตอนในฝั่งตะวันออก (UG-E) ซึ่งได้แก่ ฉะเชิงเทรา ชลบุรี และจันทบุรี (4) อ่าวตราด (TRT) และ (5) อ่าวไทยตอนกลาง (UG-C) จังหวัดชุมพร และสุราษฎร์ธานี เก็บรักษาตัวอย่างเนื้อเยื่อโลมาอิรวดีด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 95%

ตารางที่ 1 รายละเอียดการพบซากตัวอย่างโลมาอิรวดีที่ใช้ในการศึกษานี้

ชื่อรหัสตัวอย่าง	สถานที่เก็บ	รหัสของสถานที่	วันที่เก็บตัวอย่าง
S376	ตรัง	ANDAMAN	03/18/2005
SA255	สตูล	ANDAMAN	08/21/2002
SA380	ตรัง	ANDAMAN	03/20/2005
CHCE113	ชุมพร	Gulf-C	11/13/2010
CHCE114	ชุมพร	Gulf-C	11/19/2010
CHCE127	สุราษฎร์ธานี	Gulf-C	01/21/2011
CHCE130	ชุมพร	Gulf-C	02/03/2011
CHCE073	ชุมพร	Gulf-C	12/15/2008
CHCE083	สุราษฎร์ธานี	Gulf-C	03/10/2009
SA386	สุราษฎร์ธานี	Gulf-C	07/7/2005
RYCE113	ตราด	TRT	05/10/2010
RYCE130	ตราด	TRT	08/26/2010
RYCE133	ตราด	TRT	09/1/2010
RYCE141	ตราด	TRT	02/28/2011
RYCE150	ชลบุรี	Gulf-E	07/9/2011
RYCE152	จันทบุรี	Gulf-E	08/23/2011
RYCE032	ตราด	TRT	07/26/2005

ชื่อรหัสตัวอย่าง	สถานที่เก็บ	รหัสของสถานที่	วันที่เก็บตัวอย่าง
RYCE095	จันทบุรี	Gulf-E	08/16/2009
RYCEA3	ตราด	TRT	01/16/2012
RYCEA8	ชลบุรี	Gulf-E	10/7/2011
RYCE102	ตราด	TRT	02/20/2010
RYCE105	ตราด	TRT	03/23/2010
RYCE074	ตราด	TRT	11/17/2008
RYCE081	ตราด	TRT	02/28/2009
RYCE096	จันทบุรี	Gulf-E	ไม่มีข้อมูล
SSCE01	ฉะเชิงเทรา	Gulf-E	12/30/2004
SSCE11	ฉะเชิงเทรา	Gulf-E	03/6/2006
SSCE32	ชลบุรี	Gulf-E	12/3/2008
SSCE42	ฉะเชิงเทรา	Gulf-E	06/29/2009
SSCE49	ชลบุรี	Gulf-E	10/1/2009
SSCE14	สมุทรสาคร	Gulf-W	02/12/2007
SSCE25	เพชรบุรี	Gulf-W	03/21/2008
SSCE30	เพชรบุรี	Gulf-W	11/22/2008
SSCE35	สมุทรปราการ	Gulf-W	02/02 /2009
SSCE37	สมุทรสาคร	Gulf-W	02/25/2009
SSCE38	สมุทรสาคร	Gulf-W	02/27/2009
SSCE40	สมุทรสาคร	Gulf-W	05/12 /2009
SSCE45	เพชรบุรี	Gulf-W	08/18/2009
RYCE155	ไม่มีข้อมูล	Unk	ไม่มีข้อมูล

การวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ

<u>การพัฒนาเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์</u>

พัฒนาเครื่องหมายพันธุกรรมโดยดัดแปลงวิธีของ Nunome et al. (2006) ซึ่งเป็นวิธีหาเครื่องหมาย ไมโครแซทเทลไลท์จากการเพิ่มปริมาณจีโนมิกดีเอ็นเอ ในขั้นตอนการทำห้องสมุดดีเอ็นเอ (enriched library) และเลือกไมโครแซทเทลไลท์โดยวิธี selective hybridization ซึ่งมีขั้นตอนโดยสังเขปดังนี้คือ

1. สกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อหนังของโลมา 2 ตัว ตามรายละเอียดที่ระบุไว้ในหัวข้อสกัดดีเอ็นเอ

2. ย่อยจีโนมิกดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ RsaI ในสัดส่วน 1 Unit ต่อดีเอ็นเอประมาณ 100 ng ในปฏิกิริยาปริมาตร 50 µl ที่อุณหภูมิ 37 C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
3. เชื่อมดีเอ็นเอที่ย่อยแล้วกับ adapter ที่สร้างสายนิวคลีโอไทด์ 2 เส้นที่เป็นคู่สมกัน (Oligo 1 และ Oligo 2) และมีสายหนึ่งยาวกว่าอีกสายหนึ่ง 4 คู่เบส (เพื่อประโยชน์ในการออกแบบไพร์เมอร์) ด้วย T4 ligase (18 Unit/สารละลายดีเอ็นเอจากข้อ 1 รวมกับ T4 ligase buffer) ในสัดส่วนประมาณ 1 µg ของ annealed adapter ต่อปฏิกิริยา 64 µl แล้วบ่มต่ออีก 2 ชั่วโมง สายนิวคลีโอไทด์สายสั้น 2 เส้นได้แก่ 21-mer oligo (Oligo 1) 3' ATC AGG TGC GCA TTC GTT CTC 5' และ 25-mer oligo (Oligo 2) *5' TAG TCC ACG CAA GAG CAA GAG CAC A 3' โดยสัญลักษณ์ * แสดงการ phosphorylate ที่ปลายด้าน 5' และ anneal ดีเอ็นเอทั้งสองสายด้วยวัฏจักรอุณหภูมิ 65 C 10 นาที 37C 10 นาที 25 C 10 นาที และ 4 C 30 นาที เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 C
4. เพิ่มจีโนมิกดีเอ็นเอที่เชื่อมกับ adapter (จากข้อ 3) ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่ (ตามขั้นตอนที่อธิบายด้านล่าง) โดยองค์ประกอบของสารละลายในปฏิกิริยา ปริมาตร 50 µl ประกอบด้วยดีเอ็นเอประมาณ 1 µl, 1x buffer, Oligo 1 ปริมาณ 500 ng, 0.2 mM dNTPs, Taq polymerase 1.25 Unit, และ 2.5 mM $MgCl_2$ ด้วยวัฏจักรอุณหภูมิ 95 C 1 นาที 1 รอบ อุณหภูมิ 95 C 15 วินาที 60 C 1 นาที 72 C 3 นาที เป็นจำนวน 30 รอบ อุณหภูมิ 72 C นาน 15 นาที 1 รอบ
5. ทำความสะอาดผลผลิตพีซีอาร์ที่ ได้จากข้อ 4 ด้วยชุดทำความสะอาดผลผลิตพีซีอาร์สำเร็จรูป (RBC Bioscience, Taiwan) ตามวิธีที่ผู้ผลิตแนะนำไว้ elute สารละลายดีเอ็นเอด้วยน้ำปราศจากเชื้อปริมาตร 30 µl
6. ตรึง probe ที่มีลักษณะเป็นนิวคลีโอไทด์ซ้ำๆ (ไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ) บนแผ่น nylon membrane ที่มีขนาดชิ้นละ 0.5x0.5 cm และสัดส่วนของ membrane ต่อนิวคลีโอไทด์ คือ membrane 20 ชิ้นต่อนิวคลีโอไทด์ประเภทละประมาณ 5 µg (นิวคลีโอไทด์ซ้ำๆ ที่ใช้ได้แก่ $(CA)_{15}$, $(CT)_{15}$, $(ATT)_{14}$, $(GATA)_9$) และเติมสารละลาย 3xSSC (45mM Sodium Citrate, pH 7.0, 450 mM NaCl) ให้ได้ปริมาตร 0.4 ml
7. Hybridize ผลผลิตพีซีอาร์จากข้อ 5 กับ probe ที่ตรึงอยู่กับ nylon membrane ในข้อ 6 และล้างดีเอ็นเอที่ไม่ติดกับ probe ออกด้วย wash buffer (2xSSC, 0.1%SDS และ 0.5xSSC, 0.01SDS))
8. ปลดปล่อยดีเอ็นเอที่เชื่อมติดกับ probe ด้วยการต้ม 5 นาที จากนั้นนำไปเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ปฏิกิริยาเหมือนกับในข้อ 4

9. ทำความสะอาดผลผลิตพีซีอาร์ตามขั้นตอนในข้อ 5 และคัดเลือกชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่กว่า 100 คู่เบส โดยใช้ Pharmacia Microspin S-300 ตามคำแนะนำในคู่มือการใช้
10. Clone ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ โดยเชื่อมผลผลิตพีซีอาร์เข้ากับพลาสมิด pTG19-T (Viviantis, Malaysia) ตามคำแนะนำในคู่มือ ทิ้งปฏิกิริยา ligation ที่ 4 C ไว้ข้ามคืน
11. Tranform พลาสมิดตามข้อ 10 โดยใช้วิธีการ heat shock transfer ตามคู่มือการใช้ competent cell JM109 (Promega, 2012) และคัดเลือก positive clones โดยใช้ แอมพลิซิลิน และการเกิดโคโลนีสีขาว-น้ำเงินตามวิธีที่แนะนำไว้ในคู่มือดังกล่าว

<u>การสกัดดีเอ็นเอ</u>

สกัดดีเอ็นเอจากหนังของซากโลมาด้วยวิธีมาตรฐานที่ใช้ Chelex หรือ salt extraction หรือชุดสกัดสำเร็จรูป (RBC Bioscience, Taiwan) โดยวิธี Chelex เริ่มจากการตัดส่วนที่เป็นหนังขนาดประมาณ 4-5 มิลลิเมตร ลงในหลอด Microcentifuge Tube ขนาด 1.5 ml ที่มีสารละลาย Chelex 10% ปริมาตร 20 µl และ Protinase K ที่ความเข้มข้น 0.4 mg/ml ปริมาตร 20 µl ซึ่ง Chelex เป็น Chealating Resin ที่มีประจุสามารถจับกับโปรตีนได้ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส (Poly Science 9005 A5, USA) ประมาณ 2-3 ชั่วโมง หรือทิ้งไว้ทั้งคืน จากนั้นบ่มที่ 95 องศาเซลเซียส นาน 8 นาที แล้วจึงดูดสารละลายด้านบนใส่หลอดใหม่

ส่วนการสกัดโดยวิธี salt extraction ดัดแปลงจาก Aljanabi and Martinez (1994) โดยมีรายละเอียดโดยสังเขปดังนี้ ตัดตัวอย่างขนาด ประมาณ 0.5 เซนติเมตร ใส่ลงในหลอด microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml ที่มี Lysis buffer (100mM Tris HCl 100mM EDTA 0.5% SDS 0.2M NaCl) และ Proteinase K (20 mg/ml) เพื่อย่อยโปรตีนออกจากเนื้อเยื่อ บ่มสารละลายที่ได้ ที่ 55 องศาเซลเซียส ด้วยเครื่อง Waterbath (Poly Science, USA 9005 A5) ประมาณ 6-8 ชั่วโมง จากนั้นตกตะกอนโปรตีนโดยใช้ 6M NaCl และตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย Isopropanol 100% ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย Ethanol 70% และเก็บรักษาดีเอ็นเอใน น้ำ deionized ที่ปราศจากเชื้อ หรือ TE buffer (0.1X)

ส่วนการสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสำเร็จรูปใช้หลักการของ Spin column ที่บรรจุซิลิกาที่จะตรึงดีเอ็นเอ จะทำตามขั้นตอนที่แนะนำไว้โดยบริษัทที่ผลิตชุดสกัด

<u>การประเมินปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้</u>

ตรวจสอบดีเอ็นเอที่สกัดได้ในเชิงปริมาณ และคุณภาพ โดยวัดปริมาณของสารละลายดีเอ็นเอ โดยวัดการดูดกลืนแสงในเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่สองช่วงคลื่นคือ

260 และ 280 จากนั้นคำนวณความเข้มข้นของดีเอ็นคำนวณจากสูตร $\frac{A_{260}}{dilution} x50ug/ml$ และประเมินความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอวัดได้จากสัดส่วนของ $\frac{A_{260}}{A_{280}}$ ซึ่งค่าที่ได้ควรอยู่ระหว่าง 1.8-2.0 ส่วนการประเมินขนาดดีเอ็นเอที่สกัดได้ จะใช้การแยก DNA ที่มีน้ำหนัก โมเลกุลต่างกันโดยใช้กระแสไฟฟ้า (gel electrophoresis) บนเจลอะกาโรส โดยจะเทียบขนาดดีเอ็นเอที่สกัดได้กับดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน หลังจากการย้อมด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์) ซึ่งสารดีเอ็นเอที่ย้อมติดด้วยเอธิเดียม โบรไมด์ จะเรืองแสง ภายใต้แสง UV ดีเอ็นเอที่ขนาดโมโลกุลใหญ่ จะมีคุณภาพดีกว่าดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลเล็ก

<u>การเพิ่มดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่ หรือพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction, PCR)</u>

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่เครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ จำนวน 11 ตำแหน่ง ซึ่งได้แก่ MK3, MK5, MK6, MK9, Tru4_117, Tru4_162, Tru4_105 และTru4_F10 (Krutzen et al. 2001; Nater et al. 2009) (ตารางที่ 2) และที่พัฒนาใหม่ขึ้นใหม่ โดยมีการติดฉลากเรืองแสงที่ปลายด้าน 5' ของไพร์เมอร์ 1 สายในแต่ละคู่ ด้วยสี FAM, TET และ HEX

สารละลายที่ใช้ในการทำพีซีอาร์ 10 ไมโครลิตร ประกอบไปด้วยดีเอ็นเอต้นแบบ 3 µl (ความเข้มข้นประมาณ 10-20 ng/µl), 1X PCR Buffer, สารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) ที่ความเข้มข้น 2 mM, นิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (dNTPs) ที่ความเข้มข้น 2mM ไพรเมอร์แต่ละสายที่ความเข้มข้น 1 mM และ Taq Polymerase ปริมาณ 0.5 U

วัฏจักรการเพิ่มลดอุณหภูมิ ประกอบไปด้วย 3 วัฏจักร คือ วัฏจักรที่ 1 ประกอบด้วย Denaturation Temperature ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เพื่อแยกคู่ดีเอ็นเอต้นแบบสายคู่ให้เป็นสายเดี่ยว นาน 3 นาที จำนวน 1 รอบ วัฏจักรที่ 2 ประกอบด้วย 3 อุณหภูมิดังนี้ (1) อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 30วินาที (2) Primer Annealing Temperature (ตารางที่ 2) ที่อุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที และ (3) Primer Extension ที่อุณหภูมิประมาณ 72 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที จำนวน 30 รอบ และวัฏจักรที่ 3 ได้แก่ Final Extention Temperature เป็นการสร้างผลผลิตพีซีอาร์ให้เป็นสายที่สมบูรณ์ ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จำนวน 1 รอบ

<u>การตรวจสอบจีโนไทป์ของไมโครแซทเทลไลท์</u>

ตรวจสอบจีโนไทป์ ด้วยการวิเคราะห์ capillary electrophoresis บนเครื่องจีโนไทป์อัตโนมัติ (fluorescent automated genotyper) ของบริษัท First Base Laboratory (Malaysia) โดยจะรายงานผลเป็นขนาดของชิ้นดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์ในแต่ละตำแหน่ง (fragment analysis) โดยเทียบกับดีเอ็นเอขนาดมาตรฐานที่ต้องวิเคราะห์ร่วมกับตัวอย่าง บันทึกจีโนไทป์ของสัตว์แต่ละตัว โดยบันทึกขนาดของแต่ละอัลลิล ซึ่งอาจเป็นอัลลิลที่มีขนาดเดียวกัน หรือ ต่างขนาดก็ได้

ตารางที่ 2 ลำดับเบสของไพรเมอร์และ อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับพีซีอาร์ของไมโครแซลเทลไลท์ 8 ตำแหน่ง (Krutzen et al. 2001; Nater et al., 2009)

Locus name	Repeat motif	Primer sequences (5'→3')	Annealing temp (°C)	Allele size range (bp)
MK 3	$(A)_9TAC(GT)_{15}AT(GT)_7$	F: TGCATTCATGTAAAGGTGCG R: CTGCAACTAGAGAAAGCCCG	50	139-171
MK5	$(TG)_{13}CT(TG)_2CA(TG)_2(TA)_2(TG)_4$	F: CTCAGAGGGAAATGAGGCTG R: TGTCTAGAGGTCAAAGCCTTCC	52	201-221
MK6	$(GT)_{17}$	F: GTCCTCTTTCCAGGTGTAGCC R: GCCCACTAAGTATGTTGCAGC	52	145-189
MK9	$(CA)_{17}$	F: CATAACAAAGTGGGATGACTCC R: TTATCCTGTTGGCTGCAGTG	60	168-180
Tru4_117	$(GATA)_9$	F:TTGCAGTCAGCGTTTTCCCAGAGA R: GCCAGCCCATCCTTCAGATTTC	60	175-187
Tru4_105	$(GATA)_9$	F: CCCCGGCCTGCTTACCTCTG R: CCGCCCCCTCCCCAAGTC	60	367-403
Tru4_162	$(GATA)_9$	F: GCCAACCTCCAGGCAAACACTC R:TGCAGTCAACCTGAGGCAAGTCTC	60	403-407
Tru4_F10	$(GATA)_9$	F: TCTTGATGGCTCAGAGGATGATTTTAC R:AGCCAAACTGAAGATGCAACTGACTAC	60	374-390

การวิเคราะห์ข้อมูล

<u>ความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในกลุ่ม</u>

ข้อมูลที่แสดงความหลากหลายภายในกลุ่ม หรือใช้เป็นพื้นฐานสำหรับการคำนวณอื่นๆ ได้แก่

1. ความถี่ของอัลลิล (Allele Frequency) ในแต่ละตำแหน่งของกลุ่มตัวอย่าง
2. จำนวนอัลลิลต่อตำแหน่ง (Number of Alleles per Locus, *A*)
3. Allelic Richness (A_r) คือ จำนวนอัลลิลต่อตำแหน่งที่คำนวณโดยปรับตามจำนวนตัวอย่างที่เท่ากันในทุกประชากร ดังนั้นจึงสามารถใช้ค่านี้ในการเปรียบเทียบความหลากหลายของอัลลิล ในประชากรที่มีจำนวนตัวอย่างไม่เท่ากัน (Foulley and Ollivier, 2006) คำนวณค่า A_r โดยใช้โปรแกรม Microsatellite Analyzer (MSA 4.05, Dieringer and Schlötterer 2003)

4. ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตี้ (heterozygosity)

5. การทดสอบการเบี่ยงเบนจากสมดุลฮาร์ดี–ไวน์เบิร์ก ของความถี่จีโนไทป์ที่แต่ละตำแหน่งภายในประชากร โดยการประเมินค่า Exact *p*-Value ด้วยวิธี Markov Chain ตามวิธีของ Guo and Thompson (1992) (Dememorization = 1000, Batches = 1000, Iterations per Batch = 1000) ในโปรแกรม GENEPOP Version 4 (Rousset, 2007) และปรับระดับความน่าจะเป็น (*p*-value) สำหรับการใช้ข้อมูลวิเคราะห์ซ้ำหลายครั้ง (Multiple Tests) ด้วยวิธี Bonferroni Correction (Rice, 1989)

คำนวณดัชนีในข้อ 1, 2 และ 4 โดยใช้โปรแกรม GenAlEx Version 6.1 (Peakall and Smouse 2006)

ความสามารถของเครื่องหมายที่จะบ่งชี้อัตลักษณ์

สิ่งที่ต้องพิสูจน์ให้ได้คือ จีโนไทป์ที่หลายตำแหน่งของโลมาตัวหนึ่งๆ จะต้องมีโอกาสซ้ำกับโลมาตัวอื่นน้อยมาก การวิเคราะห์ดังกล่าวประกอบด้วย 2 ขั้นตอนคือ (1) การสร้างฐานข้อมูลพันธุกรรมของประชากรโลมาอิรวดีในประเทศไทย (ซึ่งคาดว่าน่าจะเป็นแหล่งของโลมาอิรวดีที่มีอยู่ในสถานแสดงพันธ์สัตว์ทะเล ในประเทศไทย) เพื่อคำนวณความถี่ของแต่ละอัลลิลที่หนึ่งตำแหน่ง (อัลลิลคือ รูปแบบของดีเอ็นเอที่ 1 ตำแหน่ง ซึ่งสัตว์หนึ่งตัวจะมีอัลลิล 2 ชุด ซึ่งได้รับมาจากพ่อ และแม่อย่างละชุด อัลลิลที่ 1 ตำแหน่งอาจเหมือนหรือต่างกันก็ได้) และ (2) คำนวณโอกาสที่จีโนไทป์หลายตำแหน่งของโลมา 2 ตัวจะซ้ำกัน (probability of identity; PI; Waits et al., 2001) โดยคำนวนจากสูตร $PI = \sum pi^4 + \sum\sum (2pi\,pj)^2$ โดยที่ p_i, p_j = ความถี่ของอัลลีล i และ j ซึ่งถ้าลายพิมพ์ดีเอ็นเอจะมีความเฉพาะตัว ค่า PI ควรมีค่าอยู่น้อย ซึ่งค่าที่ยอมรับได้เมื่อประเมินประชากรธรรมชาติ คือค่าที่อยู่ระหว่าง 0.001–0.0001 ค่า PI ขึ้นอยู่กับระดับความสัมพันธุ์ทางเครือญาติระหว่างโลมา จำนวนเครื่องหมายพันธุกรรม และความหลากหลายทางพันธุกรรม (จำนวนอัลลิล)

โครงสร้างพันธุกรรมของประชากร

วิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มตัวอย่าง 2 แบบ คือ (1) ตามแหล่งที่พบซากตัวอย่าง และ (2) จัดกลุ่มใหม่ โดยการวิเคราะห์ในส่วนแรกมีรายละเอียดดังนี้

1. การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางพันธุกรรม (Analysis of Molecular Variance, AMOVA) โดยทดสอบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของสัดส่วนความแปรปรวนอันเนื่องมาจากความต่างระหว่างกลุ่มตัวอย่างโดยใช้ค่า Φ_{ST} ดังนั้นจึงคำนวณค่า Φ_{ST} ระหว่างคู่กลุ่มตัวอย่าง และมีการปรับระดับความน่าจะเป็น (*p*-Value) สำหรับการใช้ข้อมูลวิเคราะห์ซ้ำหลายครั้ง (Multiple Tests) ด้วยวิธี Bonferroni Correction (Rice, 1989)

2 Genic Differentiation ที่ทดสอบความแตกต่างของความถี่อัลลิลของแต่ละกลุ่มตัวอย่างโดย Exact Tests ตามวิธีของ Guo and Thompson (1992) (Dememorization = 1000, Batches = 1000, Iterations per Batch = 1000) ในโปรแกรม GENEPOP Version 4 (Rousset, 2007)

3. สร้างแผนภูมิ dendrogram โดยใช้ข้อมูลระยะห่างทางพันธุกรรม Cavalli-Sforza and Edwards' genetic distance (1,000 bootstrap replications) โดยใช้โปรแกรม MSA และการสร้างแผนภูมิแบบ UPGMA ในโปรแกรม NEIGHBOR and CONSENSE ในชุดโปรแกรม PHYLIP (Felsenstein 1993) จากนี้จะพิมพ์แผนภาพที่ได้ในโปรแกรม TREEVIEW (Page 1996)

4. วิเคราะห์รูปแบบการกระจายของจีโนไทป์หลายตำแหน่งของสัตว์แต่ละตัว (แต่ยังคงการจัดกลุ่มตามแหล่งพบซากตัวอย่าง) ด้วยการวิเคราะห์หลายตัวแปร (multivariate analysis) ซึ่งได้แก่ Principal component analysis (PCA) และ Discriminant Analysis of Principal Component (DAPC) (Jambart et al. 2010) การวิเคราะห์ในส่วนนี้ใช้ชุดโปรแกรมAdegenet ซึ่งเป็นโปรแกรมที่มีการพัฒนาด้วยภาษา R (Jambart, 2008)

5. ตรวจสอบระดับการปนกันของแหล่งพันธุกรรม (admixture) โดย DAPC

การวิเคราะห์แบบที่ 2 จะตรวจสอบการแบ่งประชากรย่อยใหม่ เมื่อเอาข้อมูลของทุกตัวอย่างมารวมกัน โดยอาศัยหลักระดับคล้ายคลึงกันของจีโนไทป์หลายตำแหน่งระหว่างตัวอย่าง ด้วยการวิเคราะห์ DAPC ซึ่งประกอบไปด้วย 3 ขั้นตอนคือ (1) วิเคราะห์หาจำนวนกลุ่มย่อยที่เป็นไปได้โดยดูจากค่า Bayesian Information Criteria (BIC) ที่ต่ำที่สุด (2) จะใช้ข้อมูลจำนวนกลุ่มและจำนวนแกนหลักที่อธิบายความแปรปรวนระหว่างกลุ่มในการจัดกลุ่มตัวอย่างในแผนภูมิรูปภาพ และ (3) จัดกลุ่มตัวอย่างให้เข้ากับกลุ่มที่จัดใหม่

ผลการศึกษา

ความหลากสภาพของเครื่องหมายพันธุกรรม

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาเครื่องหมายพันธุกรรมขึ้นมาใหม่ จำนวนทั้งสิ้น 3 ตำแหน่ง (ตารางที่ 3) โดยเครื่องหมายที่พัฒนาได้ทั้งหมดมีลักษณะเป็นซ้ำครั้งละ 2 นิวคลีโอไทด์ (dinucleotides) ที่ซ้ำกันเป็นช่วงๆ ซึ่งแต่ละช่วงมีการซ้ำกันตั้งแต่ 7 ถึง 22 ครั้ง ระดับความหลากหลายของเครื่องหมายทั้งสาม อยู่ในระดับปานกลางคือมีจำนวนอัลลิลต่อตำแหน่งอยู่ในช่วง 8-18 อัลลิลและค่า expected heterozygosity อยู่ในช่วง 0.62 และ 0.85 ซึ่งเป็นค่าที่อยู่ในระดับใกล้เคียงกับความหลากสภาพของดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์ของโลมาอิรวดีที่ได้จากเครื่องหมายที่พัฒนาจากโลมาปากขวด (ตารางที่ 4)

เทคนิคการพัฒนาเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ ให้จำนวนโคลนที่มีไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ ที่มากกว่า 6 ซ้ำต่อช่วง (positive clones) ทั้งสิ้น 8 จาก 33 โคลน ซึ่งคิดเป็นประมาณ 24 เปอร์เซ็นต์ และได้จำนวน เครื่องหมายที่ใช้ได้คิดเป็น ประมาณ 9 เปอร์เซ็นต์ (3 ใน 33 โคลนที่มีการหาลำดับนิวคลีโอไทด์)

สำหรับความหลากสภาพของเครื่องหมายพันธุกรรมที่พัฒนาจากโลมาชนิดอื่น จำนวน 8 ตำแหน่ง (ตารางที่ 4) พบว่ามีจำนวนอัลลิลต่อตำแหน่งอยู่ในช่วง 5 (Tru4_162) ถึง 16 อัลลิล (Mk5) และค่า expected heterozygosity อยู่ในช่วง 0.646 (Tru4_117) ถึง 0.843 (Mk3) จีโนไทป์ที่เกือบทุกตำแหน่งเบี่ยงเบนจากค่าที่คาดหวังภายใต้สมดุลฮาร์ดี–ไวน์เบิร์ก ทั้งนี้น่าจะเป็นผลจากการปนกันของตัวอย่างที่มีลักษณะทางพันธุกรรมแตกต่างกัน (หรือมีโครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรนั่นเอง)

ตารางที่ 3 ลักษณะของเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ที่พัฒนาขึ้นมาใหม่ จำนวน 3 ตำแหน่ง

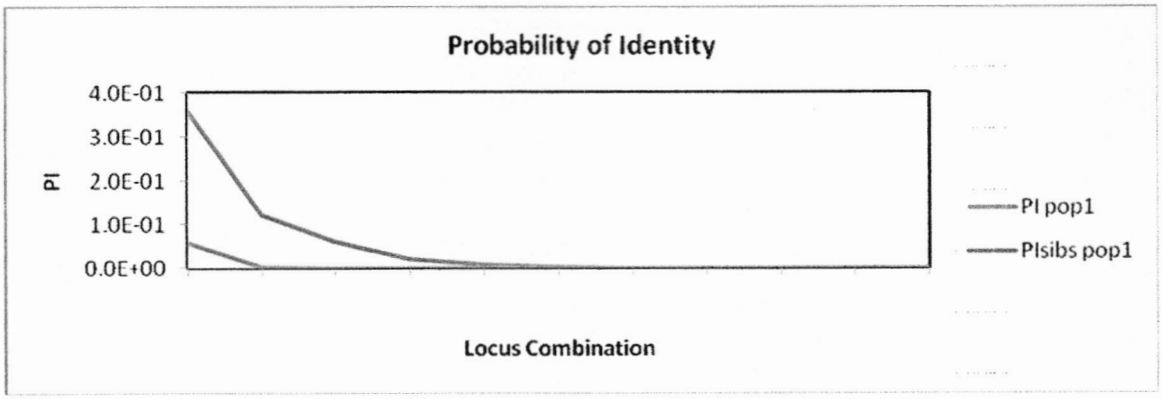
ชื่อตำแหน่ง	Orb156	Orb233	Orb235
ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพร์เมอร์	F: AgCCATCTgTgTgAgTgTgC R: CAATgCATggCCTATACCAg	F: TACgCgTggACTAggACCTT R: CggCAAATCCACAgTTAC g	F: CTTCACgAggACACCTAAACCT R : ggAAggACATACTGAgCACACA
Repeat motifs	$(TG)_{13}(GT)_6(GT)_7$	$(TG)_{22}$	$(AC)_{20}$
Melting temperature (Tm)	55 50	60 60	59 60
จำนวนอัลลิลต่อตำแหน่ง	8 (N=39)	18 (N=37)	11 (N=37)
Observed heterozygosity	0.64	0.73	0.78
Expected heterozygosity	0.62	0.83	0.85

ตารางที่ 4 ระดับความหลากหลายของเครื่องหมายพันธุกรรมที่พัฒนาจากโลมาชนิดอื่น กับตัวอย่างโลมาอิรวดีจากอ่าวไทยและทะเลอันดามัน เครื่องหมาย * แสดงถึงการเบี่ยงเบนของจีโนไทป์ที่สังเกตจากค่าจีโนไทป์ที่คำนวณจากความถี่อัลลิล ภายใต้สมดุลฮาร์ดี–ไวน์เบิร์ก

ตำแหน่ง	N	จำนวนอัลลิลต่อตำแหน่ง	Effective number of allele	Observed heterozygosity	Expected heterozygosity	F
Orb233	37	18	5.070	0.730	0.803	0.091
Orb235	37	11	6.504	0.784	0.846	0.074
Orb156	39	8	2.596	0.641	0.615	-0.043*
Mk3	39	11	6.367	0.732	0.843	0.132*
Mk5	38	16	6.347	0.526	0.842	0.375*
Mk6	38	9	4.534	0.711	0.779	0.088*
Mk9	38	11	4.349	0.553	0.770	0.282*
Tru4_117	38	8	2.826	0.474	0.646	0.267*
Tru4_162	28	5	3.124	0.571	0.680	0.159
Tru4_105	30	10	4.265	0.500	0.766	0.347*
Tru4_F10	35	14	4.785	0.657	0.791	0.169*

ศักยภาพของเครื่องหมายพันธุกรรมในการบ่งชี้อัตลักษณ์ของโลมา

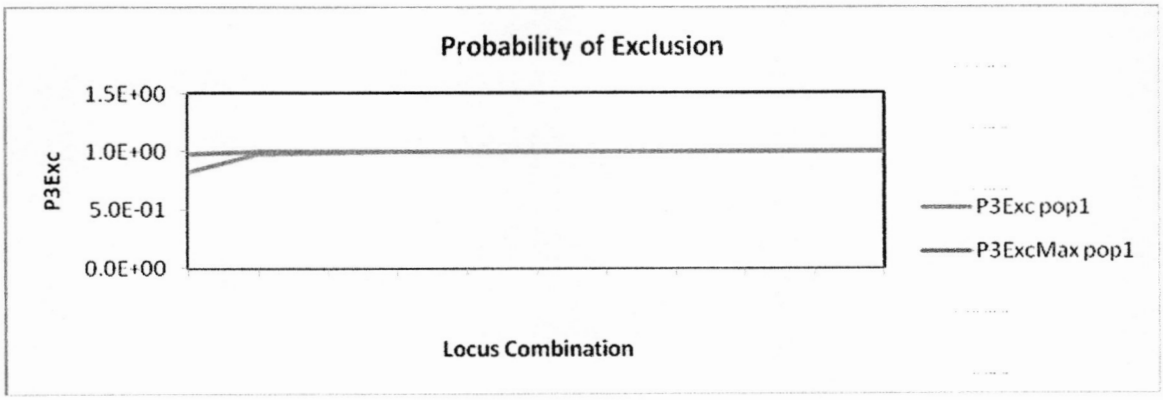
เครื่องหมายพันธุกรรมที่ใช้ในครั้งนี้มีศักยภาพในการบ่งชี้ตัวตนของโลมาได้ (ภาพที่ 2 และ 3; ตารางที่ 5) โดยโอกาสที่สัตว์สองตัวจะมีจีโนไทป์แต่ละตำแหน่งซ้ำกัน (probability of identity, PI) อยู่ในช่วง 1.6×10^{-1} (Tru4_162) และ 9.1×10^{-2} (Tru4_105) ในกรณีที่สัตว์ไม่ได้มีความสัมพันธ์ทางเครือญาติ และอยู่ในช่วง 3.3×10^{-1} (Orb235) และ 5.1×10^{-1} (Orb156) ในกรณีที่สัตว์เป็นญาติกัน (PI sibs) (ตารางที่ 5) และเมื่อพิจารณาโอกาสที่จีโนไปท์ทั้ง 11 ตำแหน่งของสัตว์ 2 ตัวจะซ้ำกัน พบว่าค่า PI และ PI sibs มีค่าเท่ากับ 1.2×10^{-12} และ 3.3×10^{-5} ตามลำดับ ซึ่งหมายความว่าแทบจะไม่มีโอกาสเจอสัตว์ในประชากรที่มีจีโนไทป์ซ้ำกันเลย ในประชากรที่มีสมาชิกประมาณ 200 ตัว (โอกาสที่จีโปไทป์จะซ้ำกันคือประมาณ 3 ตัวใน 10,000 ตัว ในกรณีที่สัตว์มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน) นอกจากนี้ ผลการวิเคราะห์ยังบ่งชี้จำนวนเครื่องหมายจำนวนน้อยที่สุด (เรียงตามระดับค่าความหลากหลายทางพันธุกรรม expected heterozygosity ในตารางที่ และค่า PIsibs ของแต่ละตำแหน่งที่แสดงในตารางที่ 5 ที่เพียงพอต่อการบ่งชี้ความเป็นเอกลักษณ์ของสมาชิกโลมาในอ่าวไทย คือ 6 ตำแหน่ง (Orb233, Orb235, Mk3, Mk5, Tru4_F10, และ Mk6) โดยมีค่า PIsibs เท่ากับ 2.0×10^{-3} หรือ 2 ตัวใน 1,000 ตัว



ภาพที่ 2 โอกาสที่สัตว์ 2 ตัวจะมีจีโนไทป์ซ้ำกัน หรือค่า probability of identity โดยค่า PI คือกรณีที่สัตว์ในประชากรไม่เกี่ยวข้องกันทางเครือญาติ และ PI sibs เป็นกรณีที่สัตว์ในประชากรมีความสัมพันธ์ทางเครือญาติ

ตารางที่ 5 ค่าโอกาสการซ้ำกับของจีโนไทป์ของแต่ละตำแหน่ง และหลายตำแหน่งร่วมกัน ในกรณีที่สัตว์ไม่ได้มีความสัมพันธ์ทางเครือญาติ (PI) และ มีความสัมพันธ์ทางเครือญาติ (PI sibs)

ตำแหน่ง	ค่า PI	ค่า PI (sibs)	ตำแหน่งร่วมกัน	ค่า PI ร่วม	ค่า PI (sibs) ร่วม
Orb233	5.8×10^{-2}	3.6×10^{-1}	1	5.8×10^{-2}	3.6×10^{-1}
Orb235	4.0×10^{-2}	3.3×10^{-1}	1+2	2.3×10^{-3}	1.2×10^{-1}
Orb156	2.4×10^{-1}	5.1×10^{-1}	1+2+3	5.6×10^{-4}	6.2×10^{-2}
Mk3	4.3×10^{-2}	3.4×10^{-1}	1+2+3+4	2.4×10^{-5}	2.1×10^{-2}
Mk5	4.2×10^{-2}	3.4×10^{-1}	1+2+3+4+5	1.0×10^{-6}	7.1×10^{-3}
Mk6	8.0×10^{-2}	3.8×10^{-1}	1+2+3+4+5+6	8.0×10^{-8}	2.7×10^{-3}
Mk9	8.5×10^{-2}	3.9×10^{-1}	1+2+3+4+5+6+7	6.8×10^{-9}	1.0×10^{-3}
Tru4_117	1.7×10^{-1}	4.7×10^{-1}	1+2+3+4+5+6+7+8	1.2×10^{-9}	4.9×10^{-4}
Tru4_162	1.6×10^{-1}	4.5×10^{-1}	1+2+3+4+5+6+7+8+9	1.8×10^{-10}	2.2×10^{-4}
Tru4_105	9.1×10^{-2}	4.0×10^{-1}	1+2+3+4+5+6+7+8+9+10	1.6×10^{-11}	8.8×10^{-5}
Tru4_F10	7.0×10^{-2}	3.8×10^{-1}	1+2+3+4+5+6+7+8+9+10+11	1.2×10^{-12}	3.3×10^{-5}



ภาพที่ 3 ความน่าเป็นที่เครื่องหมายพันธุกรรมหลายตำแหน่งสามารถ คัดแยก (exclude) สัตว์ตัวอื่นๆ ที่อยู่ในประชากร

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของโลมาอิรวดีตามแหล่งที่พบซาก

เครื่องหมายทุกตำแหน่งมีความหลากสภาพในอย่างน้อย 1 กลุ่มตัวอย่าง (ตารางที่ 6) โดยทุกกลุ่มยกเว้น Andaman มีระดับความหลากหลายทางพันธุกรรมใกล้เคียงกัน โดยมีค่า allelic richness เฉลี่ยทุกตำแหน่ง (จำนวนอัลลิลต่อตำแหน่ง ที่ปรับตามจำนวนตัวอย่างที่เท่ากันในทุกกลุ่ม) อยู่ในช่วง 3.18 ถึง 3.92 (Gulf-C) และค่า observed heterozygosity อยู่ในช่วง 0.58 ถึง 0.69 (Gulf-C) ส่วนกลุ่ม Andaman มีค่า allelic richness เฉลี่ยทุกตำแหน่งน้อยที่สุดคือ 2.73

เครื่องหมายพันธุกรรมเกือบทุกตำแหน่งในทุกกลุ่มตัวอย่าง มีพฤติกรรมที่เป็นไปตามความคาดหวังของสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบริ์ก กล่าวคือ สัดส่วนของจีโนไทป์ที่คำนวณจากตัวอย่างไม่เบี่ยงเบนจากค่าที่คำนวณจากความถี่อัลลิล อย่างไรก็ตามมีเพียงบางตำแหน่งใน Gulf-C, TRT และ UG-E ที่มีการเบี่ยงเบนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง Tru4_F10 ใน UG-E แม้ว่าจะมีเพียง 1-2 ตำแหน่งที่เบี่ยงเบนจากสมดุลย์ แต่โดยภาพรวม Gulf-C, TRT และ UG-E มีการเบี่ยงเบนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.01$) ซึ่งอาจสะท้อนถึงการปนกันของสัตว์จากต่างแหล่งพันธุกรรม

ตารางที่ 6 ความหลากหลายทางพันธุกรรมที่เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ 11 ตำแหน่ง โดยแสดงค่า จำนวนอัลลิลต่อตำแหน่ง (Na) effective number of alleles (Ne) allelic richness (Ar) และค่าเฮทเทอโรไซโกซิตี้ที่คำนวนจากตัวอย่าง (observed heterozygosity, Ho) และค่าที่คำนวณได้จากความถี่อัลลิล (expected heterozygosity, He) ค่า Fis และค่า p value แสดงการเบี่ยงเบนของสัดส่วนจีโนไทป์ที่คำนวณจากตัวอย่างจากค่าที่คำนวณจากความถี่อัลลิล ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.01 (ขีดเส้นใต้) และ 0.0009 (เมื่อปรับเพื่อการเปรียบเทียบหลายการทดสอบ โดยคำนวณจาก 0.05/55 การทดสอบ, เน้นตัวหนา และขีดเส้นใต้)

		เครื่องหมายพันธุกรรม											
Pop		Orb233	Orb235	Orb156	Mk3	Mk5	Mk6	Mk9	Tru4_117	Tru4_162	Tru4_105	Tru4_F10	เฉลี่ย
Gulf-C	N	7	6	7	7	7	7	7	7	6	6	6	
	Na	5	4	2	6	5	4	6	2	3	3	3	3.91
	Ne	3.06	3.13	1.69	3.16	3.06	3.27	3.50	1.51	2.57	2.32	2.32	2.69
	Ar	4.50	4.50	2.49	4.17	5.07	3.61	3.41	3.20	3.00	4.93	4.26	3.92
	Ho	0.86	0.83	0.29	0.57	0.71	1.00	0.71	0.14	0.83	0.67	1.00	0.69
	He	0.67	0.68	0.41	0.68	0.67	0.69	0.71	0.34	0.61	0.57	0.57	0.60
	F*	-0.273	-0.224	0.300	0.164	-0.061	-0.441	0.000	0.576	-0.364	-0.171	-0.756	
	P value	0.0103	0.0689	0.0909	0.5974	0.0091	0.1804	0.2546	0.5844	0.0667	0.3148	0.7986	0.0025
TRT	N	9	10	9	10	9	9	9	9	7	7	9	
	Na	6	10	3	7	7	4	5	4	2	5	5	5.27
	Ne	3.86	6.90	2.45	4.88	3.31	3.06	2.08	3.06	1.32	3.06	3.45	3.40
	Ar	4.63	3.59	2.99	4.86	4.54	4.45	3.66	3.30	3.18	3.94	3.91	3.91
	Ho	0.78	1.00	0.67	0.90	0.56	0.67	0.44	0.44	0.29	0.29	0.56	0.60
	He	0.74	0.86	0.59	0.80	0.70	0.67	0.52	0.67	0.24	0.67	0.71	0.65
	F*	-0.050	-0.170	-0.125	-0.132	0.204	0.009	0.143	0.339	-0.167	0.576	0.217	
	P value	0.0067	0.4227	0.0742	0.433	0.0032	0.6811	0.0362	0.0668	1	0.11	0.0859	0.0003

		เครื่องหมายพันธุกรรม											
Pop		Orb233	Orb235	Orb156	Mk3	Mk5	Mk6	Mk9	Tru4_117	Tru4_162	Tru4_105	Tru4_F10	เฉลี่ย
UG-E	N	11	10	11	11	10	9	11	10	8	8	10	
	Na	10	8	4	9	9	8	6	8	4	5	7	7.09
	Ne	6.54	4.65	2.81	5.63	6.45	6.23	4.94	3.39	3.12	4.13	5.00	4.81
	Ar	3.71	4.57	2.45	3.46	3.58	2.78	2.80	3.47	1.79	2.72	3.61	3.18
	Ho	0.82	0.80	0.73	0.73	0.30	0.78	0.55	0.50	0.75	0.50	0.60	0.64
	He	0.85	0.79	0.64	0.82	0.85	0.84	0.80	0.71	0.68	0.76	0.80	0.77
	F	0.034	-0.019	-0.128	0.116	0.645	0.074	0.316	0.291	-0.103	0.340	0.250	
	P value	0.3755	0.7649	0.5885	0.0908	0.0511	0.0046	0.0684	0.0615	1	0.0402	**0.0009**	0.0001
UG-W	N	6	7	7	8	8	8	7	8	4	5	6	
	Na	6	6	3	6	10	5	5	4	4	7	6	5.64
	Ne	4.50	5.16	2.18	5.12	8.53	3.88	3.06	3.28	4.00	6.25	4.50	4.59
	Ar	3.67	3.88	1.93	4.03	3.67	3.45	4.11	2.26	2.74	3.08	2.49	3.21
	Ho	0.33	0.57	0.86	0.75	0.63	0.63	0.57	0.75	0.00	0.60	0.67	0.58
	He	0.78	0.81	0.54	0.80	0.88	0.74	0.67	0.70	0.75	0.84	0.78	0.75
	F	0.571	0.291	-0.585	0.068	0.292	0.158	0.152	-0.079	1.000	0.286	0.143	
	P value	0.0216	0.8545	0.4406	0.2446	0.4116	0.7073	0.375	0.0769	1	0.2008	0.0909	0.1183
Andaman	N	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	
	Na	2	4	3	3	3	1	3	2	2	3	4	2.73
	Ne	2	3	2	3	3	1	2	1	2	3	3	2.19
	Ar	2	4	3	3	3	1	3	2	2	3	4	2.73
	Ho	1.00	0.67	0.33	0.33	0.67	0.00	0.67	0.33	1.00	0.67	0.67	0.58
	He	0.50	0.67	0.50	0.61	0.61	0.00	0.50	0.28	0.50	0.61	0.67	0.49
	F	-1.000	0.000	0.333	0.455	-0.091	#N/A	-0.333	-0.200	-1.000	-0.091	0.000	
	P value	0.400	0.600	0.200	0.200	1.000	-	1.000	-	0.400	1.000	0.600	0.8396

ความแตกต่างทางพันธุกรรมของโลมาระหว่างต่างแหล่งเก็บซาก

การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มด้วยหลายวิธี แสดงระดับความแตกต่างระหว่างกลุ่มที่ไม่เหมือนกัน โดยวิธีที่ไวน้อยที่สุดคือ AMOVA ที่แสดงว่าเกือบทุกกลุ่มตัวอย่างไม่แตกต่างกันทางพันธุกรรม และวิธีที่ไวมากที่สุด คือ Exact tests ที่แสดงความแตกต่างระหว่าง 5 จาก 10 คู่ตัวอย่าง (ตารางที่ 8) นอกจากนี้การแสดงโดยแผนภาพ ไม่ว่าจะเป็นแผนภูมิ dendrogram, principal component analysis (PCA) หรือ discriminant analysis of principal component (DAPC) ยังแสดงความสัมพันธ์ไปในทิศทางเดียวกันโดย กลุ่ม UG-W และ UG-E มีความคล้ายกันทางพันธุกรรม มากกว่ากลุ่มอื่นๆ และ UG-C กับ TRT ต่างกับกลุ่มอื่นในอ่าวไทย นอกจากนี้กลุ่มอันดามันยังแยกออกจากกลุ่มอ่าวไทย การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางพันธุกรรม (Analysis of molecular variance, AMOVA) บ่งชี้ว่ามีความแตกต่างระหว่างกลุ่มตัวอย่างตามแหล่งที่พบซาก โดยมีระดับความแปรปรวนที่อธิบายความแตกต่างระหว่างกลุ่มตัวอย่าง เท่ากับ 7% (p = 0.01) ซึ่งเป็นระดับที่มีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อพิจารณาความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างคู่ตัวอย่างที่แสดงโดยค่า Φ_{ST} (ตารางที่ 7) พบว่าอย่างไรก็ตามเมื่อทดสอบความแตกต่างของความถี่อัลลิลระหว่างคู่ตัวอย่างโดยใช้ Exact tests (ตารางที่ 8) พบความแตกต่างระหว่าง 5 คู่ตัวอย่าง คือ Andaman & Gulf-C, Gulf-C & UG-E, TRT & UG-E, Gulf-C & UG-W, และ TRT & UG-W ซึ่งกล่าวโดยสรุปคือ ตัวอย่างจากทะเลอันดามันมีแนวโน้มไม่แตกต่างจากตัวอย่างจากอ่าวไทย แต่ตัวอย่างอย่างอ่าวไทยตอนกลาง และจากตราดค่อนข้างต่างจากตัวอย่างจากกลุ่มอื่นในอ่าวไทยเอง

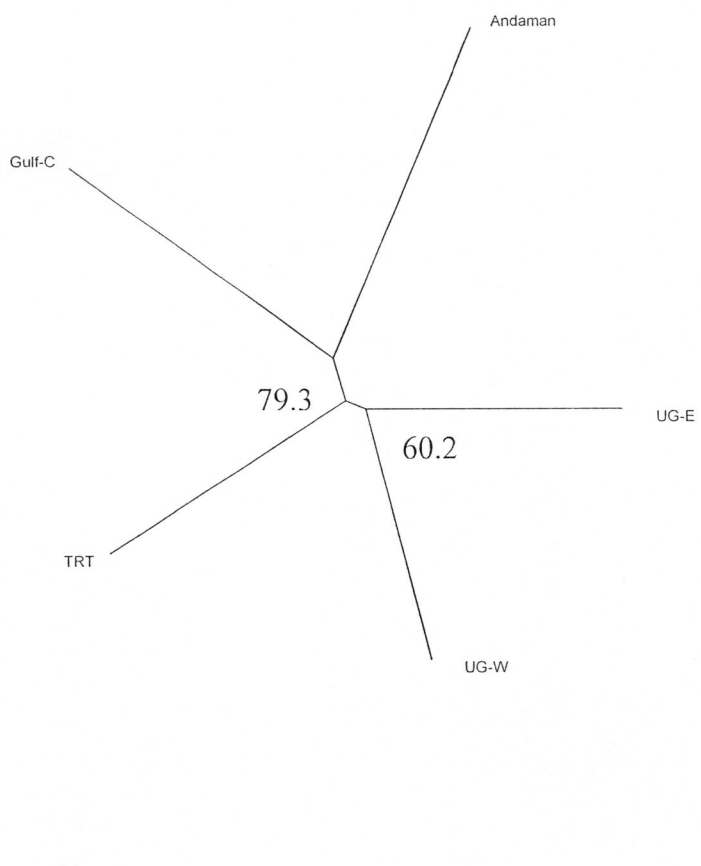
โครงสร้างทางพันธุกรรมของแหล่งตัวอย่างที่จัดโดยแผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (ภาพที่ 4) การวิเคราะห์ PCA (ภาพที่ 5) และการวิเคราะห์ DAPC (ภาพที่ 6) สามารถแยกกลุ่ม Andaman จากกลุ่มอ่าวไทย และกลุ่ม UG-E และ UG-W มีความใกล้เคียงทางพันธุกรรม จุดที่น่าสนใจคือกลุ่ม Gulf-C และ TRT มีความต่างกับกลุ่ม UG-E และ UG-W สามแกนหลักของ PCA สามารถอธิบายข้อมูลความแปรปรวนของข้อมูล (แสดงโดยค่า eigen values) ได้เท่ากับ 0.6607, 0.3501 และ 0.2923 ตามลำดับ มีเพียงคู่ของ UG-W และ Gulf-C ที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 7 ดัชนีความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างคู่ตัวอย่าง Φ_{ST} (ด้านล่างแนวทะแยงมุม) และค่า P (ด้านเหนือแนวทะแยงมุม) โดยค่าที่ขีดเส้นใต้ค่า P ที่มีนัยสำคัญจะเท่ากับ 0.005

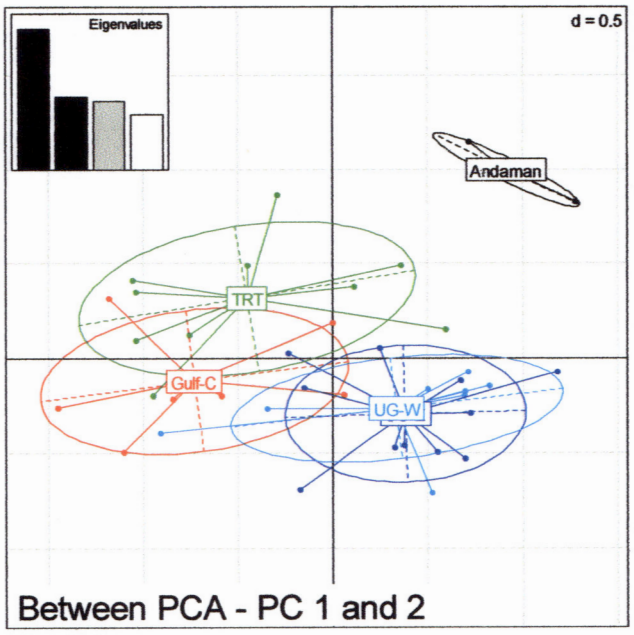
	Gulf-C	TRT	UG-E	UG-W	Andaman
Gulf-C	0.000	0.053	0.042	<u>0.001</u>	0.014
TRT	0.066	0.000	0.023	0.025	0.107
UG-E	0.062	0.061	0.000	0.448	0.051
UG-W	0.143	0.058	0.000	0.000	0.045
Andaman	0.152	0.062	0.099	0.107	0.000

ตารางที่ 8 ค่า P ของการทดสอบความแตกต่างระหว่างกลุ่มตัวอย่าง โดย Exact tests ที่อยู่บนพื้นฐานของความถี่อัลลิล ค่า P ที่ขีดเส้นใต้เป็นค่าที่น้อยกว่าค่า P ที่มีการปรับสำหรับการทดสอบหลายคู่ตัวอย่าง (0.005)

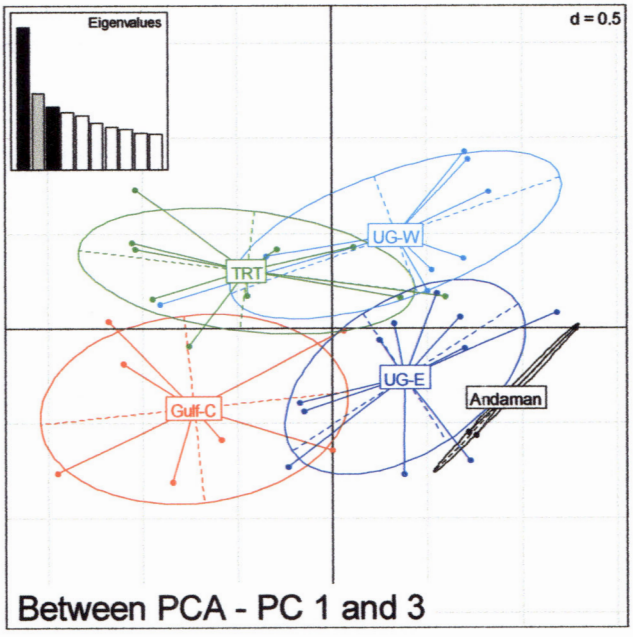
คู่กลุ่มตัวอย่าง	Chi square	df	P value
Andaman & Gulf-C	43.97097	22	0.003576
Andaman & TRT	40.76504	22	0.008788
Gulf-C & TRT	41.32093	22	0.007545
Andaman & UG-E	37.72927	22	0.019645
Gulf-C & UG-E	67.58224	22	0.000002
TRT & UG-E	57.75842	22	0.000048
Andaman & UG-W	41.46364	22	0.007254
Gulf-C & UG-W	62.69537	22	0.000009
TRT & UG-W	49.74113	22	0.000636
UG-E & UG-W	36.06111	22	0.029912



ภาพที่ 4 แผนภูมิ dendrogram ที่สร้างจากระยะห่างทางพันธุกรรมแบบ Cavalli-Sforza chord distance



(a)

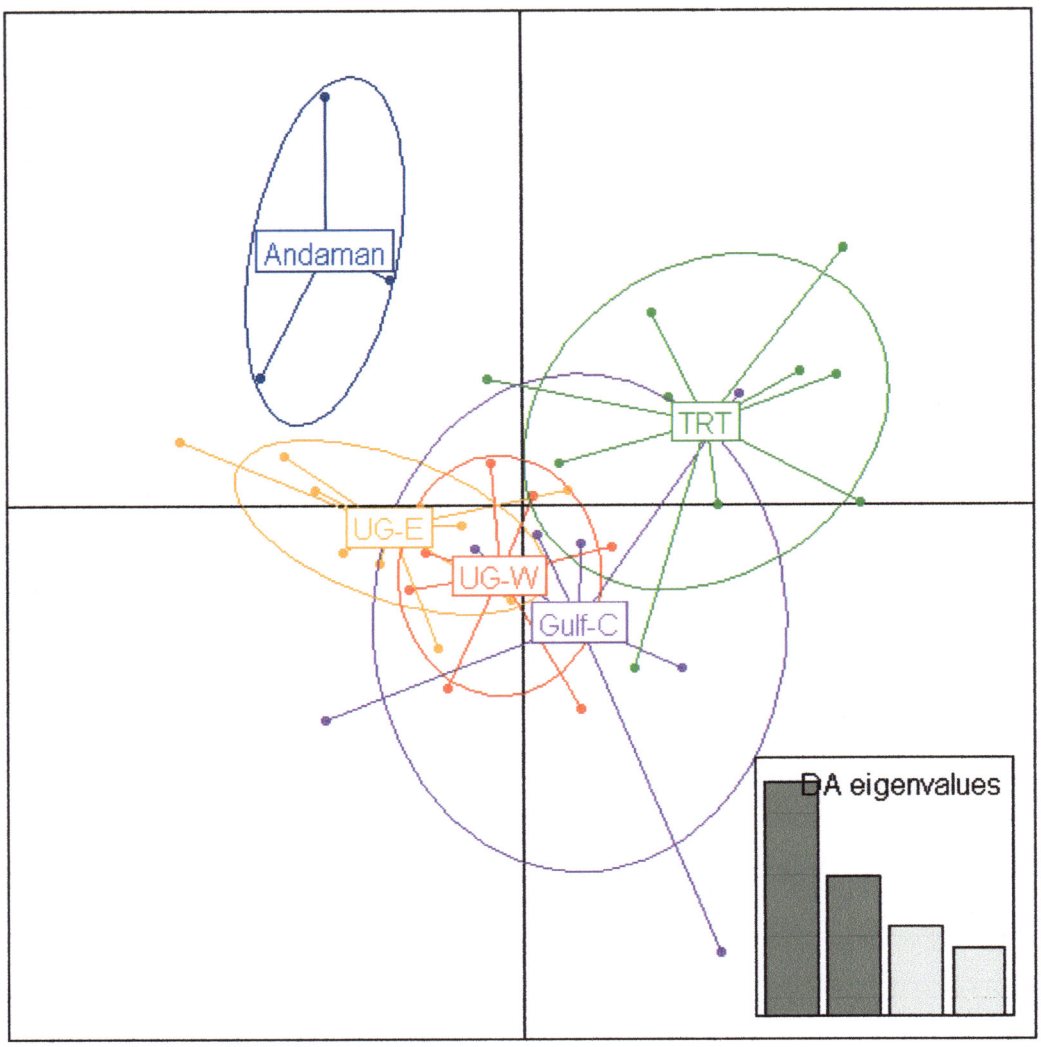


(b)

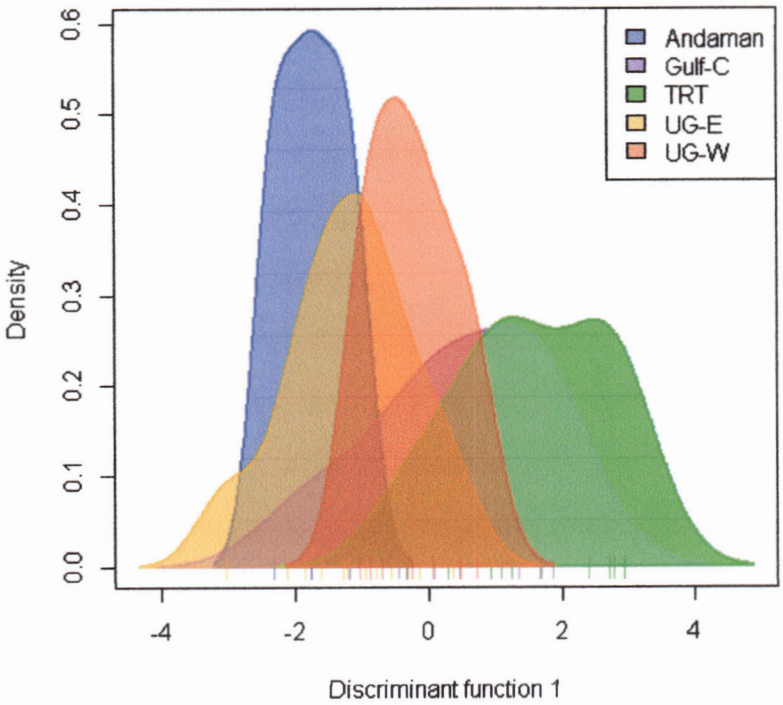
ภาพที่ 5 การกระจาย (Scatterplot) ของจีโนไทป์ ที่ 11 ตำแหน่งของตัวอย่าง จากแต่ละแหล่งที่จัดจากการวิเคราะห์ between population PCA ซึ่งเป็นเน้นความแสดงความแตกต่างระหว่างประชากร (ความแปรปรวนระหว่างกลุ่ม) โดยแสดงความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มตัวอย่างด้วยแกนหลักที่ 1 และ 2 (a) กับ แกนหลักที่ 1 และ 3 (b)

เมื่อพิจารณาความสามารถของวิธีการ Discriminant Analysis of Principal Component (DAPC) และเครื่องหมายพันธุกรรมในการจำแนกกลุ่มของตัวอย่างพบว่า DAPC

สามารถระบุความแตกต่างได้ดีระดับหนึ่ง (ภาพที่ 6 และ7) โดยตัวอย่างจาก Andaman สามารถแยกออกจากกลุ่มอ่าวไทย (แกนหลักที่ใช้ในการคำนวณ = 12 และ discriminant function = 4) ซึ่งอธิบายความแปรปรวนได้ประมาณ 69.2 เปอร์เซ็นต์ และสามารถระบุตัวอย่างกลับไปที่กลุ่มตั้งต้นได้ถูกต้อง ที่ในช่วง ประมาณ 70-100 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 8) โดยสามารถระบุตัวอย่างกลับไปที่ Andaman ได้มากที่สุด และที่อ่าวไทยรองลงมาในระดับพอๆ กัน

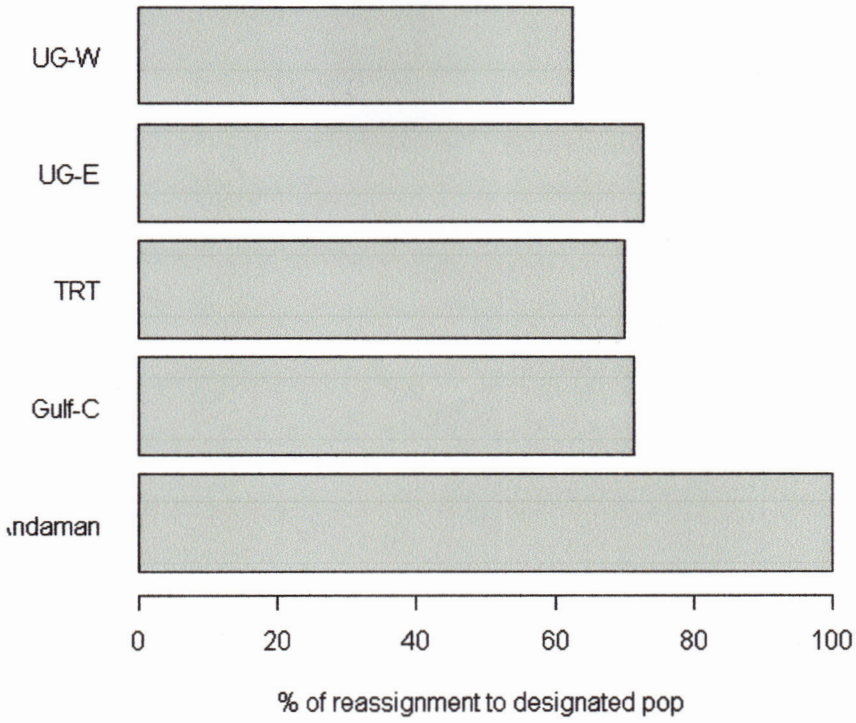


ภาพที่ 6 การกระจาย (Scatterplot) ของจีโนไทป์ ที่ 11 ตำแหน่งของตัวอย่าง จากแต่ละแหล่ง (Andaman, TRT, UG-E, UG-W และ Gulf-C) ที่จัดตามการวิเคราะห์ Discriminant Analysis of Principal Component (DAPC) ตัวอักษรย่อแสดงแหล่งที่เก็บตัวอย่าง อยู่ภายใน 95% inertia eclipse อักษรย่อแสดงถึงแหล่งเก็บตัวอย่าง 4 แหล่งคือ อ่าวไทยตอนกลาง (Gufl-C), ตราด (TRT), อ่าวไทยตอนบนฝั่งตะวันออก (UG-E) และอ่าวไทยตอนบนฝั่งตะวันตก (UG-W)

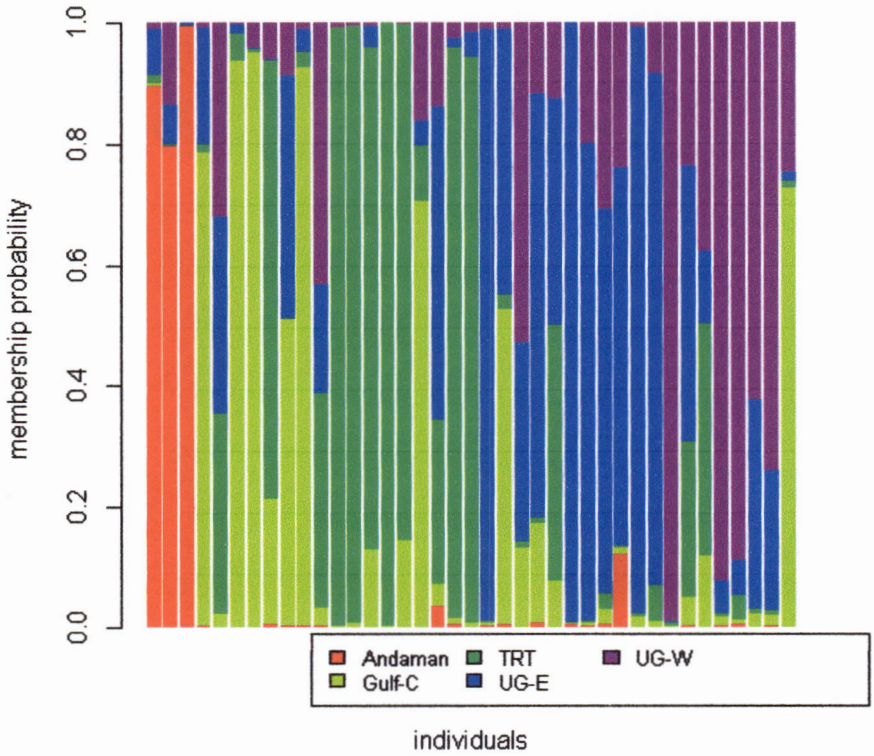


ภาพที่ 7 ความสามารถในการแยกกลุ่มตัวอย่างออกจากกันโดยแกนหลัก ของการวิเคราะห์ DAPC

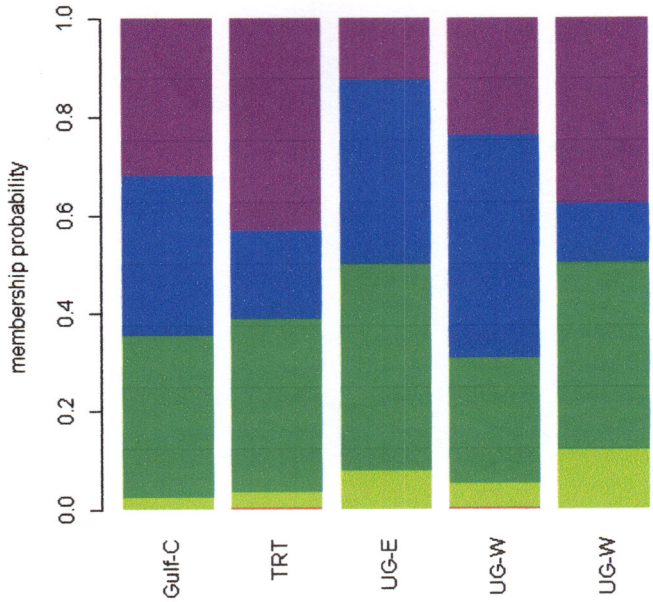
เมื่อพิจารณาองค์ประกอบทางพันธุกรรมของแต่ละตัวอย่าง (ภาพที่ 9) พบว่าสัตว์ที่รวบรวมได้จากทะเลอันดามัน มีองค์ประกอบทางพันธุกรรมที่ค่อนข้างเป็นเอกลักษณ์ (สีแดง) ในขณะที่ตัวอย่างจากอ่าวไทยมีบรรพบุรุษจากหลายแหล่งจากภายในอ่าวไทยเอง โดยส่วนใหญ่มีองค์ประกอบทางพันธุกรรมตรงตามแหล่งเก็บตัวอย่าง (ประมาณ 63 เปอร์เซ็นต์) ในขณะที่มีสัตว์บางส่วนที่มีองค์ประกอบทางพันธุกรรมต่างกับสมาชิกตัวอื่นในแหล่งเก็บตัวอย่างเดียวกับ โดยมีลักษณะทางพันธุกรรมคล้ายแหล่งอื่น (ประมาณ 10-12.5 เปอร์เซ็นต์ต่อแหล่ง) หรือเป็นลูกผสม (มีบรรพบุรุษจากหลายแหล่งปนกัน โดยมีองค์ประกอบจากแต่ละแหล่ง น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์) (ภาพที่ 9b) นอกจากนี้พบว่า สมาชิกในกลุ่ม UG-E และ UG-W มีองค์ประกอบของสองแหล่งนี้ปนกัน (มีความน่าจะเป็นที่สัตว์จะมีพันธุกรรมจากอีกแหล่งหนึ่ง มากกว่า 20 เปอร์เซ็นต์) มากกว่าการปนกันจากแหล่งอื่นๆ (ประมาณ 37 เปอร์เซ็นต์ ของสมาชิกในกลุ่ม) ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากสภาพภูมิประเทศที่มีการเอื้อให้มีการเคลื่อนย้ายได้ง่าย



ภาพที่ 8 ร้อยละของสัตว์ที่ DAPC สามารถระบุกลับไปยังแหล่งที่เก็บซาก



(a)



(b)

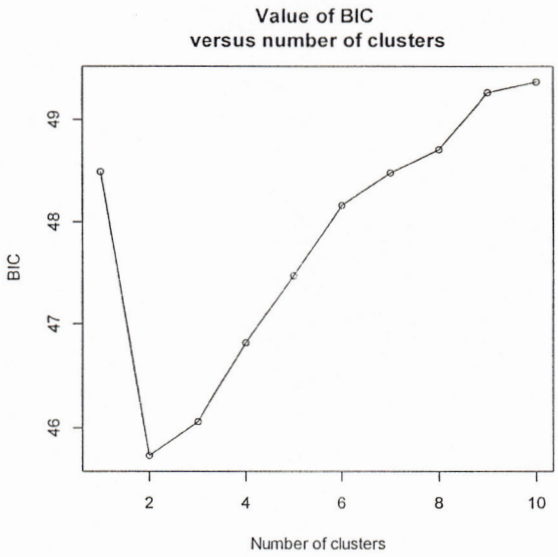
ภาพที่ 9 ความน่าจะเป็นขององค์ประกอบทางพันธุกรรมที่สัตว์หนึ่งตัวได้รับจากแต่ละแหล่ง ซึ่งในกรณีนี้ มี 4 แหล่งคือ อ่าวไทยตอนกลาง (Gufl-C), ตราด (TRT), อ่าวไทยตอนบนฝั่งตะวันออก (UG-E) และอ่าวไทยตอนบนฝั่งตะวันตก (UG-W) (a) แสดงสัตว์ทุกตัวที่วิเคราะห์ และ (b) แสดงเฉพาะตัวสัตว์ที่มาจากบรรพบุรุษจากหลายแหล่ง โดยแต่ละแหล่งมีค่าน้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ (เป็นลูกผสม) ตัวอย่างที่มีการผสมของบรรพบุรุษได้แก่ CHCE114 (Gulf-C), RYCE113 (TRT), RYCE096 (UG-E), SSCE25 (UG-W) และ SSCE30 (UG-W)

การจัดแบ่งกลุ่มพันธุกรรมของซากโลมาที่พบในบริเวณอ่าวไทย

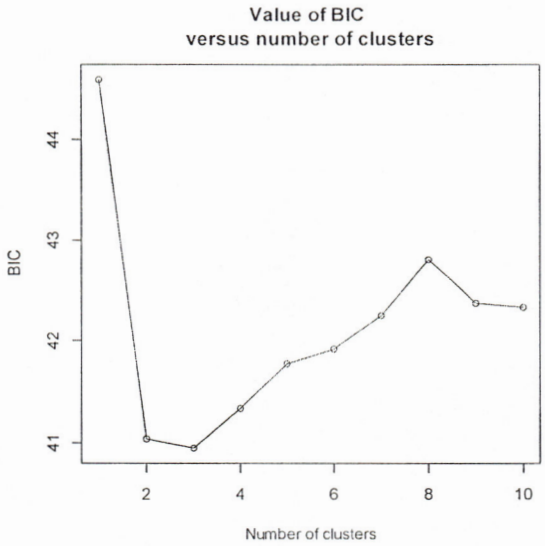
เมื่อจัดแบ่งกลุ่มโดยประเมินความสัมพันธ์ของจีโนไทป์ของแต่ละตัวอย่างที่ได้จากอ่าวไทย พบว่าสามารถจัดกลุ่มใหม่ได้เพียง 2-3 กลุ่ม (ค่า Bayesian information criteria ต่ำที่สุด, ภาพที่ 10) ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับจำนวนแกนหลักที่ใช้ในการประมวลผลข้อมูล โดยเมื่อใช้แกนหลักจำนวน 15 แกน ให้ผลการจัดกลุ่มเป็น 2 กลุ่ม (ภาพที่ 10a) และเมื่อใช้แกนหลักจำนวน 12 แกนให้ผลการจัดกลุ่ม เป็น 3 กลุ่ม (ภาพที่ 10b)

เมื่อพิจารณาการจัดแบ่งเป็น 2 กลุ่มตัวอย่าง การวิเคราะห์ DAPC (จำนวนแกนหลัก PCA = 10 และจำนวน discriminant factor เท่ากับ 1) พบว่า กลุ่มที่ 1 ประกอบไปด้วยสัตว์ส่วนใหญ่ที่รวบรวมได้จาก อ่าวไทยตอนบน (UGE และ UG-W) และกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยสัตว์ส่วนใหญ่ที่รวบรวมได้จาก ตราด และอ่าวไทยตอนกลาง (TRT และ Gulf-C) (ตารางที่ 9) ในขณะที่การแบ่งเป็นสามกลุ่ม (จำนวนแกนหลัก = 12 และ discriminant factor เท่ากับ 2) ได้แบ่งกลุ่ม ที่ 1 ข้างต้น ออกเป็นกลุ่มที่ 3 โดยสองกลุ่มที่แบ่งใหม่ ประกอบไปด้วย (1)

ตัวอย่างส่วนใหญ่ของ UGE และ UG-W กับตัวอย่างจากตราด 2 ตัวอย่าง และ (2) บางส่วนของ UG-E และ TRT



(a)



(b)

ภาพที่ 10 จำนวนกลุ่มที่สามารถแบ่งได้ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมของตัวสัตว์ ด้วยวิธี DAPC โดยจำนวนกลุ่มที่เป็นไปได้มากที่สุด พิจารณาจากค่า Bayesian Information Criteria ที่ต่ำสุด เมื่อใช้แกนหลัก 15 แกน และ 12 แกนสามารถคำนวณได้ค่าเท่ากับ 2 กลุ่ม (a) และ 3 กลุ่ม (b) ตามลำดับ

ตารางที่ 9 การจัดกลุ่มใหม่จากระดับความคล้ายกันของจีโนไทป์ระหว่างตัวสัตว์ โดยสีที่เน้นแตกต่างกัน สะท้อนถึงกลุ่มที่แตกต่างกันของการจัดกลุ่มโดยวิธี DAPC สัญลักษณ์ * แสดงถึงตัวอย่างที่มีการจัดกลุ่มที่แตกต่างไปจากเดิม

ชื่อตัวอย่าง	แหล่งเก็บตัวอย่าง	รหัสแหล่งเก็บตัวอย่าง	กลุ่มที่จัดใหม่โดย DAPC (3 กลุ่ม)	กลุ่มที่จัดใหม่โดย DAPC (2 กลุ่ม)
CHCE114	ชุมพร	Gulf-C	1	1
RYCE113	ตราด	TRT	1	1
RYCE032	ตราด	TRT	1	1
RYCE081*	ตราด	TRT	1	2
RYCE150	ชลบุรี	UG-E	1	1
RYCE152*	จันทบุรี	UG-E	1	2
RYCE096	จันทบุรี	UG-E	1	1
SSCE49	ชลบุรี	UG-E	1	1
CHCE113	ชุมพร	Gulf-C	2	2
CHCE127	สุราษฎร์ธานี	Gulf-C	2	2
CHCE130	ชุมพร	Gulf-C	2	2
CHCE073	ชุมพร	Gulf-C	2	2
CHCE083	SURAT	Gulf-C	2	2
RYCE130	ตราด	TRT	2	2
RYCE133	ตราด	TRT	2	2
RYCE141	ตราด	TRT	2	2
RYCEA3	ตราด	TRT	2	2
RYCE102	ตราด	TRT	2	2
RYcE095	จันทบุรี	UG-E	2	2
RYCEA8*	ชลบุรี	UG-E	2	1
SSCE42	ฉะเชิงเทรา	UG-E	2	2
SSCE30	เพชรบุรี	UG-W	2	2
SSCE45	เพชรบุรี	UG-W	2	2
SA386	สุราษฎร์ธานี	Gulf-C	3	1
RYCE105	ตราด	TRT	3	1
RYCE074	ตราด	TRT	3	1
RYCE155	UNK	UG-E (UNK)	3	1
SSCE01	ฉะเชิงเทรา	UG-E	3	1
SSCE11	ฉะเชิงเทรา	UG-E	3	1
SSCE32	ชลบุรี	UG-E	3	1
SSCE14	สมุทรสาคร	UG-W	3	1

ชื่อตัวอย่าง	แหล่งเก็บตัวอย่าง	รหัสแหล่งเก็บตัวอย่าง	กลุ่มที่จัดใหม่โดย DAPC (3 กลุ่ม)	กลุ่มที่จัดใหม่โดย DAPC (2 กลุ่ม)
SSCE25	เพชรบุรี	UG-W	3	1
SSCE35	สมุทรปราการ	UG-W	3	1
SSCE37	สมุทรสาคร	UG-W	3	1
SSCE38	สมุทรสาคร	UG-W	3	1
SSCE40	สมุทรสาคร	UG-W	3	1

อภิปรายผลการศึกษา

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเครื่องหมายที่พัฒนาขึ้นมาใหม่

เครื่องหมายที่พัฒนาขึ้นมาใหม่นี้เป็นเครื่องหมายเฉพาะชนิดโลมาอิรวดี ชุดแรกของโลก ซึ่งในอดีตการวิเคราะห์พันธุศาสตร์ระดับประชากรของโลมาอิรวดี ได้ใช้เครื่องหมายที่พัฒนาจากโลมาชนิดอื่น (Bourret et al. 2008; Ludwig and Lieckfeldt 2010) จึงอาจส่งผลให้ระดับความหลากหลายที่พบในโลมาอิรวดี มีค่าน้อยกว่า ที่เคยพบในโลมาชนิดที่นำมาพัฒนาเครื่องหมาย และจำกัดการประยุกต์ใช้เครื่องหมายเหล่านี้ในงานที่มีความต้องการความละเอียดของเครื่องหมายที่ค่อนข้างสูง (เช่นการวิเคราะห์พ่อแม่ลูก หรือการพิสูจน์อัตลักษณ์ตัวตนของสัตว์)

เครื่องหมายชุดนี้ มีระดับความหลากสภาพในระดับที่น่าพอใจ โดยจำนวนอัลลิลต่อตำแหน่ง (8-18) มีค่าสูงกว่าเครื่องหมายที่พัฒนาสำหรับโลมาชายฝั่งชนิดอื่น ในขณะที่ค่าเฮทเทอโรไซโกซิตี้มีระดับใกล้เคียง กันกับโลมาชายฝั่งชนิดอื่น (ตารางที่ 10) ระดับความหลากหลายดังกล่าวน่าจะมีประโยชน์ทั้งในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากร โดยเฉพาะอย่างยิ่งตำแหน่งที่มีจำนวนอัลลิลไม่มากจนเกินไป เช่น Orb156 และ Orb235 และการศึกษาอัตลักษณ์ของตัวตนโลมา โดยเฉพาะอย่างยิ่งตำแหน่งที่มีความหลากหลายสูง เช่น Orb233

ความสำเร็จของการได้เครื่องหมายในการศึกษานี้ คิดเป็นประมาณ 9 เปอร์เซ็นต์ (3 ใน 33 โคลนที่มีการหาลำดับนิวคลีโอไทด์) ซึ่งเป็นค่าที่ต่ำกว่า อัตราความสำเร็จของการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ในโลมาชายฝั่งชนิดอื่น (ตารางที่ 10) ทั้งนี้ปัจจัยที่นำไปสู่ความสำเร็จมีหลายประการ คือ คุณภาพของดีเอ็นเอตั้งต้น เทคนิคในการหาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ (Zane et al. 2002) และจำนวนโคลนที่นำไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ ปัจจัยหลักที่น่าจะส่งผลต่อความสำเร็จในครั้งนี้ น่าจะมาจากคุณภาพของเนื้อเยื่อตั้งต้น ที่ทำให้ได้จำนวนโคลนที่จะไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ได้น้อย โดยเนื้อเยื่อส่วนใหญ่ที่การศึกษาอื่นใช้คือเลือด (Zheng et al. 2008) หรือหนัง หรือกล้ามเนื้อสดแช่แข็ง (Cunha and Watts 2007) ในขณะที่การศึกษาในครั้งนี้ใช้ตัวอย่างหนังของซากเกยตื้นที่ดองแล้ว แม้ว่าซากที่ได้จะดองได้ไม่นานก็ตาม (ประมาณ 6 เดือน) จึงทำให้ปริมาณดีเอ็นเอจากจีโนมที่เป็นต้นทุนในการหาชิ้นไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอก็ลดตามไปด้วย อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ก็ได้พิสูจน์ว่า ในกรณีที่ไม่มีดีเอ็นเอ คุณภาพดีเยี่ยม เทคนิคที่ใช้ในการศึกษานี้ก็สามารถหาชิ้นไมโครแซทเทลไลท์จากดีเอ็นเอคุณภาพปานกลางได้ดีระดับหนึ่ง

ตารางที่ 10 ประสิทธิภาพของการหาเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ ในโลมาชายฝั่งบางชนิด

สปีชีส์	จำนวนตำแหน่ง	จำนวน positive clones/ clone ทั้งหมด	จำนวนอัลลิลต่อตำแหน่ง	ค่า heterozygosity (H0/He) และแหล่งของโลมาที่ทำการทดสอบ	Crossamplification	อ้างอิง
Irrawaddy dolphin (*Orcaella brevirostris*)	3 Dinucleotides = 3 ตำแหน่ง	9/33	8-18	0.641-0.784/0.615-0.846 อ่าวไทยและอันดามัน	ไม่ได้ทดสอบ	การศึกษานี้
Finless porpoise (*N. p. asiaeorientalis*)	9 Dinucleotides = 8 ตำแหน่ง Tetranucleotides = 1 ตำแหน่ง	30/64	2-9	0.300-0.633/0.473-0.804 แม่น้ำแยงซี (N=30)		Zheng et al. (2008)
Humpback dolphin (*Sousa chinensis*)	16 Dinucleotides = 11 ตำแหน่ง Tetranucleotides = 5 ตำแหน่ง	33/65	2-9	0.167-0.917/0.159-0.913 Chinese waters (n=12)	*Delphinus delphis* *N. phocaenoides* *Tursiops trucatus* *Stenella attenuata* *S. coeruleoalba*	Chen and Yang (2009)
Tucuxi dolphin (*Sotalia guianensis*).	12 Dinucleotides = 12 ตำแหน่ง	18/54	2-14	0.04-0.74/0.093-0.818 Brazil (n=34)	S. fluviatilis (10 ตำแหน่ง)	Cunha and Watts (2007)

จำนวนซ้ำในลักษณะ dinucleotides ของไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอที่พบในการศึกษานี้ เป็นไปตามโอกาสที่ควรจะพบในลักษณะนี้ในสัตว์กลุ่ม Cetaceans ที่พบ dinucleotides มากถึงประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ของประเภทไมโครแซทเทลไลท์ที่พบทั้งหมด (reviewed ใน Bourret et al. 2008)

ความสามารถบ่งชี้อัตลักษณ์ของโลมาของเครื่องหมายพันธุกรรม

การที่เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ จะบ่งชี้อัตลักษณ์ตัวตนของโลมาอิรวดีที่มีต้นกำเนิดจากอ่าวไทยได้นั้น ความน่าจะเป็นของการซ้ำกันของจีโนไทป์ (Probability of Identity) ต้องมีค่าไม่มากกว่า 1/200 (จำนวนโลมาทั้งประเทศไม่น่าจะเกิน 200 ตัว) โดยถ้าจะพิจารณาให้ระมัดระวังมากที่สุด น่าจะใช้ค่าความน่าจะเป็นที่คำนวณสำหรับสัตว์มีความสัมพันธ์ทางเครือญาติ (PIsibs) ซึ่งค่าดังกล่าวมีความแตกต่างจากค่า PI ของสัตว์ที่ไม่ได้เป็นญาติกันถึงกว่า 100,000 เท่า (ค่า PI และ PIsibs สำหรับจีโนไทป์ 11 ตำแหน่งที่ใช้ในการศึกษานี้มีค่าเท่ากับ 1.2×10^{-12} และ 3.3×10^{-5} ตามลำดับ) ดังนั้นสำหรับสัตว์ในอ่าวไทยค่า PIsibs น่าจะมีเหมาะสม เพราะว่า มีความเป็นไปได้สูงที่สัตว์จะมีความสัมพันธ์ทางเครือญาติในบางแหล่ง

เมื่อพิจารณาข้อมูลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ PIsibs สำหรับ 11 ตำแหน่ง บ่งชี้โอกาสที่สัตว์ประมาณ 3 ใน 100,000 ตัว จะมีจีโนไทป์ซ้ำกัน อย่างไรก็ตาม การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของบางเครื่องหมาย มีข้อจำกัดค่อนข้างมาก เนื่องจากมีขนาดใหญ่ (300 คู่เบสขึ้นไป) และเป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพร์เมอร์ข้ามชนิด ประกอบกับคุณภาพของดีเอ็นเอของตัวอย่างโลมาอิรวดีที่ได้อาจไม่สมบูรณ์ (ซากเกยตื้นที่เน่าแล้ว หรือตัวอย่างที่เก็บรักษามานาน) ดังนั้นถ้าพิจารณาจำนวนเครื่องหมายที่น้อยที่สุดที่จะสามารถบ่งชี้อัตลักษณ์ของโลมาอิรวดีในอ่าวไทยได้ จะพบว่าการใช้ 6 ตำแหน่งที่มีความหลากหลายพอประมาณ และที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบได้ง่าย (Orb233, Orb235, Mk3, Mk5, Tru4_F10, และ Mk6) จะเพียงพอต่อการบ่งชี้ความเป็นเอกลักษณ์ของสมาชิกโลมาในอ่าวไทย (ค่า PIsibs เท่ากับ 2.0×10^{-3} หรือ 2 ตัวใน 1,000 ตัว)

นอกจากนี้การพัฒนาเครื่องหมายพันธุกรรมที่เฉพาะชนิดที่มีความหลากสภาพของโลมาอิรวดีเพิ่มเติม น่าจะเป็น อีกทางเลือกหนึ่งที่จะลดจำนวนเครื่องหมายที่จะต้องใช้ร่วมกันเพื่อวัตถุประสงค์ดังกล่าว

ความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในกลุ่มโลมาตามแหล่งเก็บตัวอย่าง

ผลการศึกษา บ่งชี้ว่าเกือบทุกกลุ่มตัวอย่างที่ศึกษา (ยกเว้นตัวอย่างจากทะเลอันดามัน) มีระดับความหลากสภาพใกล้เคียงกัน (ค่า Ar เฉลี่ยทุกตำแหน่ง = 3.18-3.92 ค่า A เฉลี่ยทุกตำแหน่ง = 3.91-5.64 และค่า observed heterozygosity อยู่ในช่วง 0.58-0.69) และมีระดับความหลากหลายที่ใกล้เคียงกับโลมาชายฝั่งบางชนิดเช่น โลมา Guiana ในบริเวณชายฝั่ง

ของประเทศบราซิล (A=3.5-3.6 และ Ho = 0.496-0.553) แต่ต่ำกว่าระดับความหลากหลายที่พบในโลมาชายฝั่งบางชนิด (ตารางที่ 11) เช่น โลมาหัวบาตรหลังเรียบที่พบบริเวณแม่น้ำแยงซี ทะเลเหลือง และทะเลจีนใต้ของจีน (A = 7.2-11.9, Ho = 0.751-0.770) (Chen et al. 2010) ทั้งนี้ความแตกต่างที่เห็นอาจสะท้อนธรรมชาติของเครื่องหมายทีใช้ และสะท้อนสถานภาพของประชากร เครื่องหมายที่พัฒนาสำหรับโลมาหัวบาตรหลังเรียบ เป็นเครื่องหมายของโลมาชนิดนี้โดยเฉพาะ และมีระดับความหลากหลายค่อนข้างสูง (อัลลิลต่อตำแหน่ง > 8 อัลลิล) ในขณะที่เครื่องหมายที่ใช้ในการวิเคราะห์โลมา Guiana และโลมาอิรวดี (การศึกษานี้ และ Ludwig and Lieckfeldt 2010) เป็นเครื่องหมายที่พัฒนามาจากโลมาชนิดอื่น ทำให้มีแนวโน้มที่จะมีความหลากหลายลดลง (ตารางที่ 12) อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาจำนวนอัลลิลของตำแหน่งของโลมาอิรวดีที่ได้จากการศึกษานี้ เทียบกับโลมาปากขวดที่เป็นชนิดที่ใช้พัฒนาเครื่องหมายพันธุกรรม ที่ตำแหน่งเดียวกัน พบว่าจำนวนอัลลิลที่ได้จากการศึกษานี้จะมีมากกว่าหรือใกล้เคียงกับชนิดดั้งเดิม (ยกเว้นตำแหน่ง MK6) ทั้งนี้น่าจะมีผลจากขอบเขตทางภูมิศาสตร์ของแหล่งตัวอย่างซึ่งในการศึกษาในครั้งนี้ที่ใช้ตัวอย่างจากหลายแหล่งทั้งจากอ่าวไทย และอันดามัน ซึ่งในแต่ละแหล่งจะมีอัลลิลที่มีความเฉพาะตัว แต่มีความถี่ต่ำ จะเห็นว่าเมื่อพิจารณาค่า effective number of allele ซึ่งจะแสดงจำนวนอัลลิลที่มีความถี่ปานกลาง ค่าที่ได้ในตัวอย่างของอ่าวไทย และอันดามัน ก็มีค่าลดลงอย่างมาก และมีค่าต่ำกว่าค่าอัลลิลที่พบในโลมาปากขวด

นอกจากนี้ความหลากหลายทางพันธุกรรมอาจยังสะท้อนสถานภาพของประชากรโลมา โดยประชากรขนาดเล็กจะสูญเสียความหลายหลายทางพันธุกรรมอันเป็นผลจากการขาดช่วงทางพันธุกรรม (genetic drift) ได้เร็วและมากกว่าประชากรขนาดใหญ่ (วัดโดยค่า Effective Population Size, Ne) กรณีนี้อาจเป็นจริงในกรณีของโลมาอิรวดีที่มีประชากร ขนาดเล็ก (ค่า Ne ของโลมาในอิรวดีในอ่าวไทย มีค่าประมาณ Ne=21.9, 95% CI=16.3-30.5) แต่ไม่น่าจะเป็นจริงในกรณีของโลมา Guiana ที่มีขนาดประชากรอยู่ในหลักพันตัว แม้ว่าในกรณีของโลมาหัวบาตรหลังเรียบ ประชากรของแม่น้ำแยงซี จะมีการลดของประชากรอย่างรวดเร็วถึงปีละ 7.3 เปอร์เซ็นต์ จากที่เคยมีเป็นหลักพัน ในปี ค.ศ. 1978-1991 (Zhang et al. 1993) แต่ความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ตรวจพบในประชากรนี้ โดย Chen et al. (2010) ก็ไม่ได้น้อยไปกว่าประชากรที่อยู่ชายฝั่ง (ตารางที่ 11) จึงเป็นไปได้ว่าการลดลงของความหลากหลายเกิดขึ้นช้า เนื่องจากโลมาจะถึงวัยเจริญพันธุ์ช้า (จึงทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมได้เพียงไม่กี่รุ่น ในระหว่างที่ประชากรมีการลดจำนวนลง)

ส่วนค่าความหลากหลายของตัวอย่างจาก Andaman ที่มีค่าความหลากหลายต่ำที่สุด (Ar เฉลี่ยทุกตำแหน่ง = 2.73) น่าจะเป็นผลมาจากจำนวนตัวอย่างที่น้อย ที่อาจจะยังไม่เป็นตัวแทนของประชากรโลมาที่อาศัยอยู่ในบริเวณดังกล่าว

ค่าความหลากหลายพันธุกรรมของโลมาอิรวดีชายฝั่งของอ่าวไทย และทะเลอันดามัน มีค่าสูงกว่าค่าที่ตรวจสอบได้ในประชากรแม่น้ำโขงตอนล่าง (Ludwig and Lieckfeldt 2010) ทั้งค่าจำนวนอัลลิลต่อตำแหน่ง และค่าเฮทเทอโรไซโกซิตี (ตาราง 11 และ12) นอกจากนี้ค่า effective number of alleles ของการศึกษานี้ ยังสูงกว่าค่าของประชากรแม่น้ำโขงอีกด้วย (effective number of alleles ประชากรแม่น้ำโขงเท่ากับ 1.94) ทั้งนี้น่าจะเป็นผลมาจากขอบเขตการเก็บตัวอย่างของการศึกษาครั้งนี้ที่กระจายอยู่ทั่วบริเวณอ่าวไทย ซึ่งครอบคลุมกว่าการเก็บตัวอย่างของแม่น้ำโขง จึงมีโอกาสพบอัลลิลเฉพาะถิ่นที่มีรูปแบบที่หลากหลายมากกว่า นอกจากนี้สถานภาพของโลมาอิรวดีในแม่น้ำโขงตอนล่างยังเป็นหนึ่งใน 5 ประชากรแม่น้ำของโลมาอิรวดีที่มีสถานภาพเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ จึงอาจมีความเสี่ยงต่อการสูญเสียความหลากหลายทางพันธุกรรมได้เร็วกว่าประชากรของอ่าวไทย

แม้ว่าค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของโลมาอิรวดีในการศึกษานี้ และประชากรแม่น้ำโขงจะมีค่าค่อนข้างต่ำ แต่ Ludwig and Lieckfeldt (2010) ได้สรุปว่าค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรแม่น้ำโขงยังไม่น่าจะอยู่ในขั้นวิกฤต ทั้งนี้การศึกษาดังกล่าวได้ประมวลข้อมูลไมโตรคอนเดรียดีเอ็นเอด้วยโดยจำนวนแฮพโพไทด์ 3 แฮพโพไทด์ที่พบไม่ได้น้อยลงจากการศึกษาครั้งก่อนหน้านี้ (Beasley et al. 2005) และไม่ได้น้อยกว่าประชากรชายฝั่งอื่นที่ไม่ได้มีปัญหา ดังนั้นระดับความหลากหลายที่พบในประเทศไทยจากการศึกษาครั้งนี้ยังไม่สามารถชี้ชัดได้ว่าต่ำถึงขั้นวิกฤตหรือไม่ นอกจากนี้การที่ความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรแม่น้ำโขงซึ่งเป็นประชากรใกล้สูญพันธุ์ไม่ได้ลดลงจากค่าที่พบในตัวอย่างซากที่เก็บในปี 2002 (Beasley et al. 2005) อาจเกิดจากจำนวนที่ค่อย ๆ ลดลงไม่มาก และสัตว์ชนิดนี้จะถึงวัยเจริญพันธุ์ช้า (ระยะเวลาเฉลี่ยประมาณ 4-6 ปี) ทำให้ในระยะเวลากว่า 10 ที่ผ่านมามีการถ่ายทอดทางพันธุกรรมเพียง 1-2 รุ่นเท่านั้น ซึ่งรูปแบบการลดลงของความหลากหลายในลักษณะนี้ อาจคล้ายกับปรากฏการณ์ที่เกิดในโลมาหัวบาตรหลังเรียบในแม่น้ำแยงซี ในการศึกษาของ Chen et al. (2011) ที่ไม่พบความแตกต่างของระดับความหลากหลายภายในกลุ่มของโลมาในแม่น้ำแยงซี เทียบกับประชากรชายฝั่งบริเวณทะเลเหลืองและทะเลจีนใต้

การใช้เครื่องหมายพันธุกรรมที่พัฒนามาจากโลมาชนิดอื่น อาจทำให้ศักยภาพการติดตามการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมในประชากรทำได้ยาก เนื่องจากความหลากหลายของเครื่องหมาย มีแนวโน้มลดลงเมื่อนำไปวิเคราะห์ดีเอ็นเอของโลมาชนิดอื่น (*P. blainvillei, P. blainvillei, S. coerleoalba, T. truncates, S. longirostris, D. delphis, Sotalia guianesis*) (ตารางที่ 12) ดังนั้นความหลากหลายของเครื่องหมายพันธุกรรมชุดที่ใช้ในการศึกษานี้ และใน Ludwig and Lieckfeldt (2010) อาจไม่พอที่จะบอกผลของการขาดช่วงทางพันธุกรรมได้ ทั้งนี้เครื่องหมายที่จะมีศักยภาพสูงในการติดตามดังกล่าว ควรต้องมีจำนวนอัลลิลต่อตำแหน่ง

ในระดับสูง ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์จากโลมาอิรวดีเพิ่มเติมจากที่ได้ทำในการศึกษาในครั้งนี้

โครงสร้างทางพันธุกรรมของตัวอย่างโลมา

การศึกษานี้พบโครงสร้างทางพันธุกรรมของโลมาในอ่าวไทย และทะเลอันดามัน โดยตัวอย่างจากทะเลอันดามันมีความแตกต่างจากตัวอย่างจากอ่าวไทย (จากวิเคราะห์หลายตัวแปร Discriminant analysis of principal component, DAPC และจากค่าระยะห่างทางพันธุกรรม) และมีความแตกต่างระหว่างกลุ่มตัวอย่างในอ่าวไทย โดยตัวอย่างส่วนใหญ่จากอ่าวไทยตอนกลาง (ชุมพร และสุราษฎร์ธานี) และตราด ต่างจากตัวอย่างจากอ่าวไทยตอนบนอื่นๆ (ชลบุรี ฉะเชิงเทรา จันทบุรี สมุทรสาคร สมุทรสงคราม และเพชรบุรี) อย่างไรก็ตามการทดสอบสถิติอื่นๆ (AMOVA, extact tests) ไม่สามารถตรวจความแตกต่างของตัวอย่างอันดามันจากอ่าวไทยได้อย่างชัดเจน แต่แสดงความแตกต่างภายในอ่าวไทยเอง รูปแบบความแตกต่างที่ตรวจสอบได้นี้อาจเป็นเพราะตัวอย่างจากอันดามัน มีจำนวนตัวอย่างน้อย (3 ตัวอย่าง) ทำให้วิธีการทางสถิติส่วนใหญ่ไม่สามารถตรวจพบความแตกต่างอันอาจมีเพียงเล็กน้อยได้

แม้ว่าตัวอย่างจากอันดามันจะมีจำนวนตัวอย่างน้อย แต่ DAPC ก็สามารถระบุตัวอย่างกลับมาที่แหล่งอันดามันได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ในกรณีที่เอาตัวอย่างจากทุกแหล่งมารวมกัน และตัวอย่างจากอันดามันมีลักษณะพันธุกรรมที่แตกต่างอย่างสิ้นเชิงกับตัวอย่างจากแหล่งอื่น (ภาพที่ 8 และ 9) และแผนภาพแสดงองค์ประกอบทางพันธุกรรมยังแสดงให้เห็นอีกว่า ลักษณะนี้มีโอกาสไปปรากฏในตัวอย่างจากอ่าวไทยในระดับที่น้อยมาก (น้อยกว่า 10 เปอร์เซ็นต์)

ตารางที่ 11 ความหลากหลายของไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ ภายในกลุ่มของโลมาชายฝั่งบางชนิด

	ตำแหน่ง	สถานที่ (จำนวนประชากร)	ภายในประชากร			อ้างอิง
			H_o	H_e	*A/Ar*	
Irawaddy dolphin *(Orcaella brevirostris)*	11	อ่าวไทย (N=36) ทะเลอันดามัน (N=3)	0.58-0.69 0.58	0.60-0.77 0.49	3.91-5.64/3.181-3.92 2.73	การศึกษานี้
Irawaddy dolphin	8	แม่น้ำโขง (N=22)	0.432	0.475	3.0 – 3.7	Ludwig and Lieckfeldt (2010)
Finless porpoise *(Neophocaena phocaenoides)*	10	แม่น้ำแยงซี (N=33) แม่น้ำเหลือง (N=23) ทะเลจีนใต้ (N=69)	0.762 0.770 0.751	0.732 0.795 0.780	7.2 9.4 11.9	Chen et al. (2010)
Guiana dolphin (*Sotalia guinesis*)	10	Septiba bay entrance (N=20)	0.496	0.469	3.5	Hollatz et al. (2011)
		Septiba bay interior (N=23)	0.574	0.507	3.6	
		Paraty bay (N=15)	0.553	0.580	3.5	

ตารางที่ 12 จำนวนอัลลิลของเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ ในโลมาอิรวดีและโลมาชายฝั่งชนิดอื่นๆ (ปรับจาก Ludwig and Lieckfeldt 2010)

ชนิด/ตำแหน่ง	MK3	MK5	MK6	MK9	Tru4_105	Tru4_117	Tru4_162	Tru4_F10	เฉลี่ย
O.brevirostris การศึกษานี้	**11(39)**	**16(38)**	**9(38)**	**11(38)**	**11(38)**	**8(32)**	**5(28)**	**14(35)**	**11.4(35.8)**
O.brevirostris (Mekhong)	4(21)	4(20)	2(22)	3(18)	3(18)	2(20)	3(14)	3(16)	3.00(18.62)
*O.spec**	4(31)	7(30)	2(32)	4(32)	4(31)	2(31)	4(27)	3(30)	3.75(30.50)
*Tursiops aduncus***	11(336)	10(355)	23(357)	7(228)	7(100)***	4(100)***	3(100)***	4(100)***	
*Pontoporia blainvillei***	n.d	4(13)	5(13)	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	
*Stenella coerleoalba***	n.d	16(99)	16(102)	9(102)	n.d	n.d	n.d	n.d	
*T. trucatus****	n.d	n.d	n.d	n.d	3	4	1	4	
*Stenella longirostris****	n.d	n.d	n.d	n.d	4	2	3	4	
*Delphinus delphis****	n.d	n.d	n.d	n.d	4	4	1	3	
*Kogia breviceps****	n.d	n.d	n.d	n.d	No Product	2	No Product	No Product	
*Sotalia guianesis*****			4(54)	2(52)					

หมายเหตุ n.d - No data available; * Krutzen Unpublished Data 2010; ** Krutzen et al. (2001) *** Nater et al. (2009) ****Hollatz et al. (2011)

มีความเป็นไปได้สูงว่ากลุ่มสัตว์ที่อาศัยอยู่ในทะเลอันดามัน จะมีโอกาสที่น้อยที่จะแลกเปลี่ยนยีนกับกลุ่มสัตว์จากอ่าวไทย เนื่องจากมีแผ่นดินของคาบสมุทรมลายู ที่แบ่งมหาสมุทรอินเดีย (ทะเลอันดามัน) กับอ่าวไทย มาเป็นเวลากว่าสามพันปี (Kittiwattanawong et al. 2004) และมีการตรวจพบความแตกต่างทางพันธุกรรมของสัตว์หลายชนิดที่มีช่วงชีวิตการสืบพันธุ์ไว เช่นปลา (เช่น *Epinephelus cocoides*; Antoro et al. 2006) หรือกุ้งทะเล (เช่น *Peneaus monodon*; Supungul et al. 2000) อย่างไรก็ตามยังมีข้อสงสัยสำหรับสัตว์ที่ถึงระยะการสืบพันธุ์ช้า เช่นสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม และเต่าทะเล โดย Kittiwattanawong et al. (2004) ตรวจไม่พบความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างตัวอย่างเต่าตนุจากอ่าวไทย และทะเลอันดามัน ค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมที่คำนวณจากรูปแบบแฮพโพลไทป์ และลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณดีลูปบนไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอ เท่ากับ 0.028 และ 0.003 ตามลำดับ (P>0.05) ทั้งนี้ Kittiwattanawong et al. (2004) ได้สันนิษฐานว่าสัตว์สองกลุ่มอาจมีโอกาสแลกเปลี่ยนยีน ในช่วง 4,000 ปีที่แล้ว ที่น้ำทะเลมีระดับสูงปกคลุมแผ่นดินบางส่วนของคาบสมุทรมลายู และขยายขนาดของช่องแคบมะละกา

สำหรับโครงสร้างทางพันธุกรรมของโลมาอิรวดีในอ่าวไทยเป็นประเด็นที่น่าสนใจ และการศึกษานี้ได้บ่งชี้ว่าโลมาอิรวดีในอ่าวไทยมีการแบ่งเป็นประชากรย่อยอย่างชัดเจน ไม่ว่าจะเป็นการทดสอบ AMOVA, exact tests, ระยะห่างทางพันธุกรรม และ DAPC โดย exact tests บ่งชี้ว่า ตัวอย่างจากอ่าวไทยตอนกลาง และตราดน่าจะต่างจากกลุ่มอื่นๆ แต่อ่าวไทยตอนกลางกับตราดไม่ต่างกัน โดยที่ค่า Chi-square ของคู่ตัวอย่างนี้มีค่าสูงแต่ไม่ถึงเกณฑ์ที่จะปฏิเสธสมมติฐานหลัก (P=0.0075) ซึ่งค่า *P* ที่ใช้ในการบ่งชี้ความแตกต่างคือที่ระดับ 0.005 (เป็นค่าที่ปรับแล้วสำหรับการเปรียบเทียบพร้อมกันหลายคู่ตัวอย่าง) นอกจากนี้ยังมีคู่ตัวอย่างอื่น ที่มีค่า chi-square ก็อยู่ในระดับที่เกือบจะต่างอย่างมีนัยสำคัญ (เช่นคู่ของ Andaman กับ TRT) ข้อมูลส่วนนี้อาจแสดงว่าคู่ตัวอย่างเหล่านี้มีความแตกต่างทางพันธุกรรมระดับหนึ่ง แต่ไม่มากพอที่จะแสดงมีนัยสำคัญทางสถิติ

แผนภาพ dendrogram ที่สร้างจากระยะห่างทางพันธุกรรม แสดงว่ากลุ่มอ่าวไทยตอนบน (UG-E และ UG-W) ใกล้เคียงทางพันธุกรรมกันมากที่สุด รองมาคือทั้งคู่ต่างจากตราด และอ่าวไทยตอนกลางมากที่สุด ซึ่งการแสดงภาพโดย PCA และ DAPC ก็ได้แสดงความแตกต่างในลักษณะนี้เช่นเดียวกัน การเกิดความต่างทางพันธุกรรมของกลุ่มตัวอย่างที่เกยตื้น ในต่างพื้นที่ อาจสะท้อนธรรมชาติการเคลื่อนที่ของโลมาชนิดนี้ และโลมาชายฝั่งหลายชนิดที่มีการอาศัยในลักษณะเฉพาะถิ่น (เช่น สุรศักดิ์ และคณะ 2550; Parra 2005) สุรศักดิ์ และคณะ (2550) ได้ศึกษาพฤติกรรมการใช้พื้นที่ของโลมาอิรวดีในบริเวณปากแม่น้ำบางปะกง ในระหว่างปี พ.ศ. 2548-2549 และพบว่ามีโลมาอิรวดีกลุ่มมาใช้พื้นที่อย่างสม่ำเสมอ โดยพบมากบริเวณปากแม่น้ำ และพบประปรายในระยะรัศมีไม่เกิน 10 กิโลเมตร

ห่างจากฝั่ง โลมาอิรวดีอาศัยพื้นที่ปากแม่น้ำบางปะกงเพื่อเป็นแหล่งหาอาหาร (ปากแม่น้ำบางปะกงมีลักษณะเป็นเอสทูรี และมีความอุดมสมบูรณ์ของปลาในธรรมชาติ ค่อนข้างมาก) และเป็แหล่งผสมพันธุ์ และออกลูก (พบโลมาแม่ลูกอ่อนในบริเวณดังกล่าวในบางฤดูกาล) นอกจากนี้ยังตั้งข้อสังเกตจากตำหนิของโลมา ว่ากลุ่มที่มาผสมพันธุ์ในปีหนึ่ง จะกลับมาดกลูกในบริเวณเดิมในปีถัดมา ซึ่งปัจจัยเหล่านี้เป็นปัจจัยหนึ่งที่รักษาความเป็นเอกลักษณ์ทางพันธุกรรมไว้ได้

การใช้ชีวิตในแนวชายฝั่ง ในบริเวณปากแม่น้ำบางปะกง (ไม่เกิน 10 กิโลเมตรจากปากแม่น้ำไปในทะเล) ยังสอดคล้องกับข้อสังเกตของ Parra (2005) ที่ติดตามการเคลื่อนที่ของโลมาอิรวดี บริเวณชายฝั่งทางตะวันออกเฉียงเหนือ ของประเทศออสเตรเลีย และพบโลมาอิรวดีส่วนใหญ่ (มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์) ที่ภายในระยะ 5-15 กิโลเมตรจากชายฝั่ง หรือ 10-20 กิโลเมตรจากปากแม่น้ำที่ใกล้ที่สุด และที่น้ำลึกไม่เกิน 10-15 เมตร ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสภาพภูมิประเทศ (ในการศึกษานี้ สำรวจ 2 พื้นที่คือ ชายฝั่ง Far Northeast section และ Central section ของ Great Barrier Reef Marine Park)

นอกจากบริเวณแม่น้ำบางปะกงแล้ว พื้นที่ที่มีโลมาอิรวดีปรากฏอย่างสม่ำเสมอได้แก่ อ่าวตราด ชลบุรี สมุทรสาคร สมุทรสงคราม เพชรบุรี ชุมพร นครศรีธรรมราช และทะเลสาบสงขลา (ภาพที่ 1) (กาญจนา และก้องเกียรติ 2547) ดังนั้นการศึกษาพันธุศาสตร์ประชากรในครั้งนี้น่าจะบ่งชี้บริเวณแหล่งพันธุกรรมในอ่าวไทยได้อย่างน้อย 2-3 แหล่งคือ (1) อ่าวไทยตอนกลาง ซึ่งรวมถึงบริเวณชุมพร นครศรีธรรมชาติ สุราษฎร์ธานี (2) อ่าวไทยตอนบน ซึ่งรวมถึง ฉะเชิงเทรา ชลบุรี สมุทรสาคร สมุทรสงคราม สมุทรปราการและ (3) อ่าวตราด ทั้งนี้อ่าวตราดและอ่าวไทยตอนกลางมีความคล้ายทางพันธุกรรมระดับหนึ่ง ซึ่งอาจรวมเป็นแหล่งพันธุกรรมเดียวกันได้ อย่างไรก็ตามการศึกษาในครั้งนี้ยังไม่ได้วิเคราะห์ตัวอย่างจากทะเลสาบสงขลา จึงยังไม่สามารถขยายข้อสรุปนี้ไปยังกลุ่มที่อยู่ในทะเลสาบสงขลาได้ ทั้งนี้ทะเลสาบสงขลาน่าจะเป็นกลุ่มที่แยกจากกลุ่มอื่นในอ่าวไทย เนื่องจากสภาพภูมิประเทศ ดังนั้นอาจจะเป็นแหล่งพันธุกรรมอีกแหล่งหนึ่ง

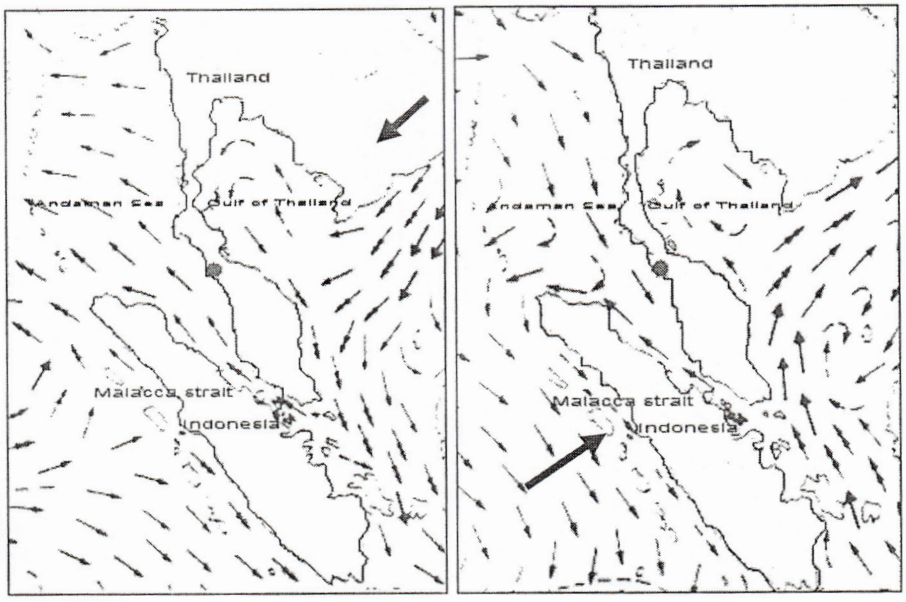
การเกิดโครงสร้างทางพันธุกรรมลักษณะนี้ก็พบในการศึกษาโลมาเกียนาที่อยู่บริเวณอ่าวของประเทศบราซิล โดยความแตกต่างทางพันธุกรรมของตัวอย่างโลมา Guiana จากอ่าวพาราตี้ และเซปติบ้า ประเทศบราซิล ซึ่งสันนิษฐานว่าสัณฐานของอ่าวเซปติบ้าเป็นอ่าวปิด ทำให้ลดโอกาสที่สองกลุ่มจะมีการแลกเปลี่ยนยีน แม้ว่าอ่าวทั้งสองจะมีระยะห่างเพียง 60 กิโลเมตรก็ตาม (Hollatz et al. 2011)

ประเด็นหนึ่งที่ต้องคำนึงถึงในการแปลผลในการศึกษานี้คือ ประเภทของตัวอย่างที่เก็บเป็นซากที่เกยตื้น ซึ่งเราสันนิษฐานว่าจะมาจากแหล่งพันธุกรรมที่กล่าวมาข้างต้น เช่นซากเกยตื้นที่ชุมพร ก็เป็นกลุ่มที่อาศัยอยู่บริเวณชายฝั่งอ่าวไทยตอนกลาง และธรรมชาติของ

ตัวอย่างนี้อาจเป็นเหตุผลหนึ่งที่ทำให้เกิดการปนกันของซากที่ลอยมาจากแหล่งพันธุกรรมอื่น และทำให้ไม่สามารถตรวจพบการแบ่งแยกทางพันธุกรรมของบางกลุ่มตัวอย่าง เช่น อ่าวไทยตอนกลางกับตราด

ข้อมูลความน่าจะเป็นขององค์ประกอบทางพันธุกรรม สามารถอธิบายการแบ่งโครงสร้างได้อย่างน่าสนใจ (ภาพที่ 9) โดยพบว่ามี**สัตว์บางตัวเป็นลูกผสม** และสัตว์บางตัวเป็น**ซากที่มาจากแหล่งพันธุกรรมอื่น** ในกรณีของลูกผสม ตัวสัตว์จะมีองค์ประกอบทางพันธุกรรมที่อาจมาจากหลายแหล่ง และสัดส่วนพันธุกรรมจากแต่ละแหล่งน้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ เช่นตัวอย่าง CHCE114 ซึ่งเป็นซากที่เก็บจากจังหวัดชุมพร มีสัดส่วนขององค์ประกอบทางพันธุกรรมส่วนใหญ่มาจาก 3 แหล่งคือ อ่าวไทยตอนบนฝั่งตะวันออก และตะวันตก และตราด (มีความเป็นไปได้ที่มาจากชุมพรน้อยมาก) หรือ RYCE113 ที่เก็บได้จากตราด ซึ่งมีองค์ประกอบทางพันธุกรรมคล้ายกับ CHCE114 ทั้งๆ ที่เก็บจากคนละแหล่ง (มีความเป็นไปได้ว่าเป็นสมาชิกของแหล่งพันธุกรรมอ่าวตราด แต่ว่าอาจเป็นลูกผสม) ในกรณีที่อาจจะเป็นซากที่มาจากแหล่งพันธุกรรมอื่น ข้อมูลองค์ประกอบพันธุกรรมของตัวสัตว์จะแสดงองค์ประกอบทางพันธุกรรมจากแหล่งพันธุกรรมอื่นมากกว่า แหล่งพันธุกรรมที่ใกล้กับแหล่งเกยตื้น เช่น CHCE114 ที่พบเกยตื้นที่ชุมพร น่าจะเป็นซากที่มาจากอ่าวไทยตอนบนหรือตราด และไม่น่าจะเป็นลูกหลานของแหล่งพันธุกรรมอ่าวไทยตอนกลาง หรือ RYCE102 ที่พบเกยตื้นที่อ่าวตราด กลับมีลักษณะทางพันธุกรรมคล้ายกับ แหล่งพันธุกรรมของอ่าวไทยตอนกลาง

การพัดพาของซากจากแหล่งพันธุกรรมไปยังสถานที่เกยตื้นน่าจะได้รับอิทธิพลจากกระแสน้ำในอ่าวไทย (ภาพที่ 11) โดยในช่วงพฤศจิกายนถึงเมษายนจะได้รับอิทธิพลลมมรสุมตะวันออกเฉียงเหนือ โดยมวลน้ำในอ่าวไทยจะมีการวนในลักษณะทวนเข็มนาฬิกา และช่วงเดือนพฤษภาคมถึงตุลาคม เป็นช่วงที่ได้รับอิทธิพลจากลมมรสุมตะวันตกเฉียงใต้ ที่กระแสน้ำในอ่าวไทยมีการหมุนวนในลักษณะตามเข็มนาฬิกา อย่างไรก็ตามในบริเวณอ่าวไทยตอนบน การเคลื่อนที่ของมวลน้ำโดยเฉพาะอย่างยิ่งในช่วงมรสุมตะวันตกเฉียงใต้ ยังอาจได้รับอิทธิพลจากปัจจัยอื่นๆ อีก เช่นปริมาณน้ำจืดที่ไหลสู่ทะเลจากแม่น้ำสายใหญ่ จึงทำให้ทิศทางของมวลน้ำไม่สม่ำเสมอ และอาจเปลี่ยนแปลงในทิศทางที่แตกต่างไปจากในอ่าวไทยที่มีลักษณะเป็นอ่าวเปิด (Buranapratepat et al. 2006)



(a) (b)

ภาพที่ 11 ทิศทางการไหลมวลน้ำในอ่าวไทย และทะเลอันดามัน ในช่วง (a) ฤดูลมมรสุมตะวันออกเฉียงเหนือ (พฤศจิกายนถึงเมษายน) และ (b) ฤดูลมมรสุมตะวันตกเฉียงใต้ (พฤษภาคมถึงตุลาคม) (Camerlengo and Demmler, 1997)

เมื่อพิจารณาปริมาณลูกผสม จากข้อมูลองค์ประกอบทางพันธุกรรมของสมาชิกในกลุ่ม ยังพบทิศทาง และปริมาณของการผสมข้ามระหว่างกลุ่มพันธุกรรม โดยพบว่าบริเวณอ่าวไทยตอนบน จะมีการปนกับของลักษณะทางพันธุกรรม UG-W และ UG-E มากโดยพบสมาชิกที่มีองค์ประกอบทางพันธุกรรมของอีกกลุ่มหนึ่งสูงถึง 35-36 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่มีการผสมข้ามกับแหล่งอื่น (ตราด และอ่าวไทยตอนใน) เพียง 9-12.5 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 13)

ตาราง 13 สัดส่วนของสมาชิกในกลุ่มที่มีองค์ประกอบทางพันธุกรรมเหมือนกับกลุ่มอื่นอย่างน้อย 20 เปอร์เซ็นต์

	Gulf C	TRT	UGE	UGW
Gulf C	0.714286	0.1	0.090909	0.125
TRT	0.285714	0.7	0.090909	0.25
UGE	0.285714	0.2	0.636364	0.375
UGW	0.142857	0.1	0.363636	0.625

การจัดกลุ่มแหล่งพันธุกรรมใหม่โดยวิธี DAPC

การวิเคราะห์ที่กล่าวมาข้างต้น เป็นการวิเคราะห์ที่ตั้งอยู่บนสมมติฐานที่ว่า ซากเกยตื้นจากแหล่งหนึ่ง เป็นสมาชิกของแหล่งพันธุกรรมเดียว ดังนั้นการวิเคราะห์ข้างต้นจึงสมมติว่าแหล่งพันธุกรรมของอ่าวไทย (ไม่รวมทะเลสาบสงขลา) มีด้วยกัน 4 แหล่ง อย่างไรก็ตามข้อสมมติฐานดังกล่าวอาจไม่เป็นจริงก็ได้เนื่องจากเราไม่ทราบแหล่งที่อยู่อาศัยก่อนตายของซากโลมานั้น ดังนั้นการวิเคราะห์ความคล้ายกันของจีโนไทป์ของสัตว์แต่ละตัว และจัดกลุ่มใหม่ น่าจะเป็นอีกวิธีการหนึ่งที่จะพยายามเข้าใจลักษณะทางพันธุกรรมของโลมาอิรวดีในอ่าวไทย ตัวอย่างหนึ่งที่บ่งชี้ประสิทธิภาพของการหากลุ่มย่อยโดยการวิเคราะห์หาความคล้ายกันของจีโนไทป์ระหว่างตัวสัตว์คือการศึกษาของ So et al. (2006) ที่พบว่าปลาสวายจากแหล่งหาอาหารบริเวณต่าง ๆ ของแม่น้ำโขง 10 แหล่ง เป็นสมาชิกของ 3 ประชากรเท่านั้น ทั้งนี้การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มทั้ง 10 แหล่งตามสถานที่เก็บตัวอย่างไม่พบโครงสร้างทางพันธุกรรมที่ชัดเจน และยังพบการเบี่ยงเบนจากสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบริก์ ในทุกกลุ่มตัวอย่างและเมื่อแบ่งกลุ่มแบบใหม่ (3 กลุ่ม) โดยใช้วิธีการวิเคราะห์ลักษณะความคล้ายคลึงกันของจีโนไทป์ ทำให้พบโครงสร้างทางพันธุกรรมที่ชัดเจนขึ้น

การวิเคราะห์ DAPC ที่รวมทุกตัวอย่างเข้าด้วยกัน (ตารางที่ 9) สามารถจัดกลุ่มตัวอย่างได้ใหม่ เป็น 2-3 กลุ่มขึ้นกับจำนวนแกนหลักของ PCA ในการวิเคราะห์เริ่มต้น (ถูกจำกัดด้วยจำนวนตัวอย่าง ดังนั้นถ้าตัวอย่างจำนวนน้อย จำนวนแกนที่สามารถเลือกใช้ได้ก็จะน้อยตามไปด้วย) ในกรณีของการศึกษานี้ เมื่อใช้แกนหลักจำนวน 10 และ 12 แกน จะได้จำนวนกลุ่มใหม่ 2-3 กลุ่ม ตามลำดับ (ตารางที่ 9) โดยกลุ่มแรกจะประกอบไปด้วยตัวอย่างทีคละจำนวนจากชลบุรี จันทบุรี และตราด กลุ่มสองประกอบไปด้วยตัวอย่างส่วนใหญ่จากอ่าวไทยตอนกลาง และตราด และกลุ่มที่สามประกอบด้วยตัวอย่างส่วนใหญ่จากสามสมุทร เพชรบุรี และฉะเชิงเทรา การจัดทั้ง 2 และ 3 กลุ่มจะคล้ายกันตรงกลุ่มที่สอง

การจัดนี้แสดงความคล้ายกันระหว่างตราดและอ่าวไทยตอนกลาง ซึ่งอาจสะท้อนระดับการแลกเปลี่ยนยีนของสัตว์ 2 กลุ่มนี้ แม้ว่าระยะทางจะค่อนข้างห่างกันพอสมควร ส่วนข้อมูลในอ่าวไทยตอนบน ก็ยืนยันความคล้ายกันทางพันธุกรรมของ 2 แหล่งเกยตื้น แม้ว่าทั้งสองแหล่งอาจยังมีความต่างกันทางพันธุกรรมอยู่บ้างเพราะเมื่อทดสอบการเบี่ยงเบนจากสมดุลย์ฮาร์ดี-ไวน์เบริ์ก พบว่ากลุ่ม 2 ยังมีการเบี่ยงเบนอยู่บ้าง ซึ่งน่าจะแสดงการปนกันแหล่งพันธุกรรม

แม้ว่าความน่าจะเป็นในการจัด 2 กลุ่มจะค่อนข้างชัดเจนมากกว่าการจัด 3 กลุ่ม แต่การจัดได้สามกลุ่มก็มีความน่าสนใจ โดยกลุ่มที่ถูกจัดแยกส่วนใหญ่เป็นซากเกยตื้นที่ตราด จันทบุรี และชลบุรี และส่วนใหญ่เป็นสัตว์ที่มีลักษณะองค์ประกอบทางพันธุกรรมลักษณะเป็นลูกผสม ซึ่งจริงๆ แล้วอาจไม่ใช่ลูกผสมแต่อาจเป็นแหล่งพันธุกรรมอีกแหล่งหนึ่งก็ได้ เช่น

แหล่งพันธุกรรมของชายฝั่งประเทศเขมร ทั้งนี้ได้เคยมีรายงานว่าโลมาอิรวดีสามารถเคลื่อนที่ข้ามพรมแดนได้ (Smith et al. In press)

ข้อจำกัดของการศึกษานี้ คือจำนวนตัวอย่างของแต่ละแหล่งมีน้อย และคุณภาพตัวอย่างไม่ดี จึงทำให้บางครั้งการวิเคราะห์ทางสถิติ ไม่มีประสิทธิภาพเท่าที่ควรในการตรวจพบโครงสร้างทางพันธุกรรมที่อาจจะมีอยู่จริงได้ หรือโครงสร้างที่ตรวจพบอาจเป็น sampling error ก็ได้ ทั้งนี้ควรมีการเพิ่มตัวอย่างจากแต่ละแหล่งให้ได้ประมาณ 20 ตัวอย่างต่อแหล่ง

สรุปผลการวิจัย

1. ได้เครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์เฉพาะชนิดโลมาอิรวดี ที่มีความหลากสภาพทั้งสิ้น 3 ตำแหน่ง

2. เครื่องหมายพันธุกรรมทั้งสิ้น 11 ตำแหน่ง มีระดับความหลากสภาพมากพอที่จะบ่งชี้อัตลักษณ์ของโลมาอิรวดีจากอ่าวไทยได้ โดยมีค่าความน่าจะเป็นที่จีโนไทป์ทั้ง 11 ตำแหน่ง ของสัตว์สองตัวจะซ้ำกัน (PI) มีค่าเท่ากับ $.2 \times 10^{-12}$ และ 3.3×10^{-5} สำหรับกรณีที่สัตว์ไม่ได้มีความสัมพันธ์ทางเครือญาติ และสัตว์ที่มีความสัมพันธ์ ตามลำดับ

3. จำนวนตำแหน่งที่น้อยที่สุดที่เพียงพอในการบ่งชี้อัตลักษณ์ของโลมาอิรวดีจากอ่าวไทย คือ 6 ตำแหน่ง โดยมีค่า PIsibs เท่ากับ 2.0×10^{-3} หรือ 2 ตัวใน 1,000 ตัว ระดับความหลากหลายทางพันธุกรรมของกลุ่มตัวอย่างส่วนใหญ่ ยกเว้นตัวอย่างจากอันดามันมีค่าในระดับปานกลาง และอยู่ในระดับใกล้เคียงกันระหว่างกลุ่มโลมาอิรวดีโดยโดยมีค่า allelic richness เฉลี่ยทุกตำแหน่ง (จำนวนอัลลิลต่อตำแหน่ง ที่ปรับตามจำนวนตัวอย่างที่เท่ากันในทุกกลุ่ม) อยู่ในช่วง 3.18 ถึง 3.92 (Gulf-C) และค่า observed heterozygosity อยู่ในช่วง 0.58 ถึง 0.69 (Gulf-C) ส่วนกลุ่ม Andaman มีค่า allelic richness เฉลี่ยทุกตำแหน่ง น้อยที่สุดคือ 2.73

4. ตัวอย่างจากอันดามัน มีแนวโน้มที่จะต่างทางพันธุกรรมกับตัวอย่างจากอ่าวไทย

5. ตัวอย่างจากต่างแหล่งภายในอ่าวไทย มีความแตกต่างทางพันธุกรรม โดยตัวอย่างจากอ่าวไทยตอนกลางและตราด ต่างกับตัวอย่างจากอ่าวไทยตอนใน (ทั้งฝั่งตะวันออก และฝั่งตะวันตก) ส่วนความต่างทางพันธุกรรมระหว่างอ่าวไทยตอนกลางและตราด และระหว่างอ่าวไทยตอนในฝั่งตะวันออก และฝั่งตะวันตก ยังไม่สามารถหาข้อสรุปได้อย่างแน่ชัดเนื่องจากวิธีการทดสอบยังให้คำตอบที่ไม่ตรงกัน

6. การวิเคราะห์ DAPC โดยการจัดกลุ่มตัวอย่างใหม่ตามระดับความคล้ายกันของจีโนไทป์ของแต่ละตัวสัตว์ แบ่งกลุ่มได้ 2 – 3 กลุ่ม โดยแบ่งเป็น (1) ตัวอย่างส่วนใหญ่อ่าวตราด+อ่าวไทยตอนกลาง (2) ตัวอย่างส่วนใหญ่จากอ่าวไทยตอนในทั้งสองฝั่ง และ (3) คละ

จำนวนจากตราด ชลบุรี และจันทบุรี ซึ่งอาจบ่งชี้แหล่งพันธุกรรมอื่นที่แตกต่างจาก 2 กลุ่มข้างต้น

ข้อเสนอแนะ

1. เพิ่มจำนวนตัวอย่างต่อแหล่ง โดยเฉพาะอย่างยิ่งบริเวณทะเลอันดามัน
2. เพิ่มตัวอย่างจากอ่าวไทยตอนล่างโดยเฉพาะอย่างยิ่งในบริเวณทะเลสาบสงขลา
3. พัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์จากโลมาอิรวดี เพิ่มเติม เพื่อเป็นตัวเลือกในการวิเคราะห์ทางพันธุกรรมในอนาคต
3. ค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ได้จากการศึกษานี้สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานวางแผนเพื่อจัดการในการอนุรักษ์ความหลากหลายของโลมาอิรวดีในการติดตามระดับความหลากหลายทางพันธุกรรมและสถานภาพที่ส่งผลต่อความหลากหลายของประชากรได้ในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

กาญจนา อดุลยานุโกศล และ ก้องเกียรติ กิตติวัฒนาวงศ์. 2547. คู่มือจำแนกชนิดโลมาและวาฬในประเทศไทย. สถาบันวิจัยพัฒนาทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง กรมทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติ และสิ่งแวดล้อม

กาญจนา อดุลยานุโกศล. (2550). *สถานภาพสัตว์ทะเลหายากในอ่าวไทย ปี 2550.* สถาบันวิจัยและ พัฒนาทรัพยากรทางทะเลชายฝั่งทะเลและป่าชายเลน กรมทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง.

นิติกร ผิวผ่อง และ อังสุนีย์ ชุณหปราณ. 2545. โลมาอิรวดี (*Orcella brevirostris*, Gray, 1866) ในทะเลสาบสงขลา. วารสารการประมง 55: 437 – 441.

วิชัย บุญแสง, อัญชลี ทัศนาขจร, ชัยณรงค์ วงศ์ธีรทรัพย์, นุสรา สิทธิดิลกรัตน์ และสกล พันธุ์ยิ้ม. (2541). *ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากสารพันธุกรรมสู่เทคโนโลยีพิสูจน์บุคคล.* กรุงเทพฯ: สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโนยีแห่งชาติ.

สุพจน์ จันทราภรณ์ศิลป์, กาญจนา อดุลยานุโกศล และ ก้องเกียรติ กิตติวัฒนาวงศ์. 2539. โลมาและวาฬในน่านน้ำไทย. วารสารการประมง 49(3): 229 – 247.

สุรศักดิ์ ทองสุกดี และ สุชาติ สว่างอารีย์รักษ์. 2548. การสำรวจโลมาและวาฬบริเวณแนวชายฝั่งทะเลอ่าวไทยตอนใน วารสารการประมง 58(5): 449 – 456.

สุรศักดิ์ ทองสุกดี สุชาติ สว่างอารีย์รักษ์ และนัฐวุฒิ ทองสินธุ์. 2550. โลมาอิรวดีบริเวณปากแม่น้ำบางปะกง วารสารมหาวิทยาลัยทักษิณ 10, 65 – 71.

Aljanabi, S.M. and I. Martinez. 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. Nucleic Acid Research, 25: 4692-4693

Antoro S., U. Na-Nakorn and W. Koedprang. 2006. Study of genetic diversity of orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides* from Thailand and Indonesia using microsatellite markers. Marine Biotechnology 8, 17-26.

Beasley, I., K.M. Robertson and P. Arnold. 2005. Description of a new dolphin, the Australian snubfin dolphin *Orcaella heinsohni* sp. n. (Cetacea: Delphinidae). Marine Mammal Science 21(3), 356-400.

Bourret, V., M. Mace, M. Bonhomme and B. Crouau-Roy. 2008. Microsatellite in Cetaceans: an overview. The Open Marine Biology Journal 2, 38-42.

Buranapratheprat, A. 2008. Circulation in the upper gulf of Thailand: a review. Burapha Science Journal 13, 75-83

Camerlengo A. and M. I. Demmler. 1997. Wind-driven circulation of Peninsular Malaysia's eastern continental shelf. SCIENTIA MARINA 61, 203-211

Chen, L. and G. Yang. 2008. Development of tetranucleotide microsatellite loci for the finless porpoise (Neophocaena phocaenoides). Conservation Genetics 9:1033–1035.

Chen, L. and G. Yang. 2009. A set of polymorphic dinucleotide and tetranucleotide microsatellite markers for the Indo-Pacific humpback dolphin (Sousa chinensis) and cross amplification with other cetacean species. Conservation Genetics 10, 697-700.

Chen, L., M.W. Bruford, S. Xu, K. Zhou, and G. Yang.2010. Microsatellite variation and significant population genetic structure of endangered finless porpoises (*Neophocaena phocaenoides*) in Chinese coastal waters and the Yangtze River. Marine Biology 157,1453-1462.

Cunha, H.A., and P.C. Watts. 2007. Twelve microsatellite loci for marine and riverine tucuxi dolphins (Sotalia guianensis and S. fluviatilis). Molecular Ecology Notes 7, 1229-1231.

Dieringer, D. and C. Schlötterer. 2003. Microsatellite analyser (MSA): a platform independent analysis tool for large microsatellite data sets. Molecular Ecology Notes 3,167-169.

Farro, A.P.C., M.M. Rollo Jr , J. M. Silva Jr, and C. L. Marino. 2007. Isolation and characterization of microsatellite DNA markers for spinner dolphin (Stenella longirostris). Conservation Genetics 9,1319–1321.

Felsenstein, J. 1993. *PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.5c*. Distributed by the author. Department of Genetics, University of Washington, Seattle.

Fisher, S.J. and R.R. Reeves. 2005. The global trade in live Cetaceans: implications for conservation. Journal of International Wildlife Law and Policy 8: 315-340.

Foulley, J. L., and L. Ollivier. 2006. Estimating allelic richness and its diversity. Livestock Science 101, 150–158.

Guo, S., and E. Thomson. 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg Proportion for multiple all. Biometrics 48, 361-372.

Hollatz, C., Torres Vilaça, S., Redondo, R.A.F., Marmontel, M., Baker, C.S., & Santos, F.R. (2011). The Amazon River system as an ecological barrier driving genetic differentiation of the pink dolphin (*Inia geoffrensis*). *Biological Journal of the Linnaen Society, 102,* 812-827.

Jombart T.2008. adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. Bioinformatics 24, 1403-1405.

Jombart, T., S. Devillard and F. Balloux, F. 2010. Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. BMC Genetics 11(*94*). doi:10.1186/1471-2156-11-94.

Kittiwattanawong, K., S. Mananunsap, M. Kinoshita, and Kouji Nakayama. 2004. No genetic divergence of green turtle Chelonia mydas nesting populations between the Andaman

Sea and the Gulf of Thailand. Preceedings on the 4th SEASTAR2000 Workshop. December 11-13, 2003.

Krützen M, E. Valsecchi, R.C. Connor, and W.B. Sherwin. 2001. Characterization of microsatellite loci in *Tursiops aduncus*. Molecular Ecology Notes 1, 170–172

Ludwig, A. and D. Lieckfeldt. 2010. Genetic structure of the Mekong population of the Irrawaddy River dolphin (*Orcaella brevirostris*). Institute for Zoo and Wildlife Research Berlin. 16 pp.

Mirimin, L., J. Coughlan, E. Rogan, T.F. Cross. 2006. Tetranucleotide microsatellite loci from the striped dolphin (*Stenella coeruleoalba* Meyen, 1833). Molecular Ecology Notes 6(2), 493–495.

Nater, A., A.M. Kopps, M. Krützen. 2009. New polymorphic tetranucleotide microsatellites improve scoring accuracy in the bottlenose dolphin *Tursiops aduncus.* Molecular Ecology Resources 9, 531-534.

Nunome, T., S. Negoro, K. Miyatake, H. Yamaguchi and H. Fukuoka. 2006. A Protocol for the Construction of Microsatellite Enriched Genomic Library. Plant Molecular Biology Reporter 24, 305–312

Page, R.D.M. 1996. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. Computer Applications in the Biosciences 12, 357-358.

Parra, G.J. 2005. Behavioural ecology of Irrawaddy, *Orcaella brevirostris* (Owen in Gray, 1866), and Indo-Pacific humpback dolphins, *Sousa chinensis* (Osbeck, 1765), in northeast Queensland, Australia: a comparative study. Ph.D. Thesis, James Cook University, Townsville.

Peakall, R., and P.E. Smouse. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Molecular Ecology Notes *6*, 288–295.

Promega, 2012. *E. coli* Competent Cells. Promega Technical Bulletin. USA.

Rice, W. R. 1989. Analyzing tables of statistical test. Evolution *43*(1), 223-225.

Rosel, P.E., V. Forgetta, and K. Dewar. 2005. Isolation and characterization of twelve polymorphic microsatellite markers in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). Molecular Ecology Notes 5: 830–833

Rousset, F. 2008. GENEPOP'007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. Molecular Ecology Resources *8*, 103-106.

Smith, B.D., R.G. Shore, and A. Lopez. (eds.). In Press. Status and conservation of freshwater populations of Irrawaddy dolphins. WCS Working Paper Series.

Smith, T.B., and R.K. Wayne (eds). 1996. Molecular Genetic Approaches in Conservation. Oxford University Press, New York.

Supungul P., P. Sootanan, S. Klinbunga, W. Kamonrat, P. Jarayabhand and A. Tassanakajon. 2000. Microsatellite polymorphism and the population structure of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) in Thailand. Marine Biotechnology 2, 339–347.

Waits, L. P., G. Luikart, and P. Taberlet. 2001. Estimating the probability of identity among genotypes in natural populations: cautions and guidelines. Molecular Ecology 10: 249-256.

Weir, B.C. 2007. Forensics. Pages 1368-1393 in D.J. Balding, M. Bishop and Chris Cannings (Editors). Handbook of Statistical Genetics, 3rd Edition. John Wiley & Sons, Ltd. West Sussex.

Zane, L. 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. Molecular Ecology 13, 1-16

Zheng, J.S., X.L. Liao, J.G. Tong, H.J. Du, M.C. Milinkovitch and D. Wang. 2008. Development and characterization of polymorphic microsatellite loci in the endangered Yangtze finless porpoise (*Neophocaena phocaenoides asiaeorientalis*). Conservation Genetics 9: 1007-1009.

Output จากโครงการวิจัย

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ (ระบุชื่อผู้แต่ง ชื่อเรื่อง ชื่อวารสาร ปี เล่มที่ เลขที่ และหน้า) หรือผลงานตามที่คาดไว้ในสัญญาโครงการ
   ขณะนี้กำลังเตรียมบทความสำหรับตีพิมพ์ (จะส่งไปให้สกอ. ภายหลัง)
2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์
   - เชิงสาธารณะ (มีเครือข่ายความร่วมมือ/สร้างกระแสความสนใจในวงกว้าง)
     - เกิดความร่วมมือทางวิชาการระหว่างมหาวิทยาลัยบูรพา และหน่วยงานในกรมทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง หลายหน่วยงาน
   - เชิงวิชาการ (มีการพัฒนาการเรียนการสอน/สร้างนักวิจัยใหม่)
     - ได้สร้างนักวิจัยใหม่ที่ทำงานด้านนี้ 1 คน (นางสาวสุภาพร สอนแก้ว)
     - ได้สร้างความตื่นตัวในการทำวิจัยด้านพันธุกรรมสัตว์หายาก ในกรมทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง
     - มีการใช้ข้อมูลสำหรับการเรียนการสอนวิชา Genetics for aquaculture and fisheries management และ Conservation genetics ซึ่งเป็นวิชาระดับบัณฑิตศึกษา