

อัตลักษณ์ทางโมเลกุลของตะโขง *Tomistoma schlegelii* ในสถานเพาะเลี้ยง
จากยีน cytochrome c oxidase subunit I ในไมโทคอนเดรีย

Molecular identity of captive false gharial *Tomistoma schlegelii* based on
mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I gene

นางสาวชยาภรณ์ หาญวิชัยวัฒนา

อาจารย์ที่ปรึกษา
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชิตชัย จันทร์ตั้งสี

โครงการวิทยาศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชาสัตววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2562

โครงการวิทยาศาสตร์ฉบับนี้ได้รับการสนับสนุนจาก
โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการ	: อัตลักษณ์ทางโมเลกุลของตะโขง <i>Tomistoma schlegelii</i> ในสถานเพาะเลี้ยงจากยีน cytochrome c oxidase subunit I ในไมโทคอนเดรีย
นิสิตผู้ดำเนินโครงการ	: นางสาวชยาภรณ์ หาญวิชัยวัฒนา
อาจารย์ที่ปรึกษา	: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชิตชัย จันทร์ตั้งสี
ภาควิชา	: ชีววิทยา

บทคัดย่อ

การขาดข้อมูลทางพันธุกรรมของตะโขง *Tomistoma schlegelii* ที่มีถิ่นกำเนิดในประเทศไทย อาจเป็นหนึ่งในปัจจัยที่ทำให้การระบุชนิดและขยายพันธุ์ รวมไปถึงการอนุรักษ์สัตว์เลื้อยคลานชนิดนี้เป็นไปได้ยาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งหากเกิดข้อจำกัดในการเข้าถึงข้อมูลทางสัณฐานวิทยา กอปรกับแนวโน้มที่เพิ่มสูงขึ้นต่อการสูญพันธุ์ไปจากธรรมชาติของประเทศ งานวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อสร้างข้อมูลทางพันธุกรรมของตะโขงที่มีถิ่นกำเนิดในประเทศไทย โดยอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน cytochrome c oxidase subunit I (COI) จากไมโทคอนเดรีย และคัดเลือกช่วงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมาะสม ในการใช้เป็นรหัสพันธุกรรมหรือดีเอ็นเอบาร์โค้ด เพื่อการระบุอัตลักษณ์ของสัตว์สายพันธุ์นี้ จากการเก็บตัวอย่างและสกัดดีเอ็นเอจากเลือดหลังการฟักของลูกตะโขง สำหรับใช้เป็นแม่พิมพ์ดีเอ็นเอในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส เพื่อเพิ่มปริมาณยีน COI ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน COI ของตะโขงจำนวน 2 เส้น ความยาวเส้นละ 1,584 คู่เบส ซึ่งมีลำดับที่เหมือนกันตลอดทั้งสาย เมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับลำดับในฐานข้อมูลของ NCBI พบว่า มีจำนวนตำแหน่งของนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกันเพียง 2–3 ตำแหน่ง และมีค่าความเหมือนกันสูงถึง 99.87% การวิเคราะห์ความห่างทางพันธุกรรมระหว่างตะโขงและตัวแทนสัตว์เลื้อยคลานในอันดับ Crocodylia อีก 12 ชนิด ได้ค่าความห่างระหว่างชนิดเฉลี่ยอยู่ในช่วง 13.333–15.390% และ 13.707–15.834% เมื่อใช้ยีนตลอดทั้งสาย และช่วงต้นของยีนที่มีความยาว 645 คู่เบส ในการคำนวณ ตามลำดับ ค่าที่แตกต่างกันนี้แสดงให้เห็นถึงความแปรผันของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สูงกว่าในบริเวณช่วงต้นของยีน และความเหมาะสมของยีน COI บริเวณนี้ในการใช้เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ด เมื่อทำการวิเคราะห์เพิ่มเติมระหว่างตะโขงและสัตว์เลื้อยคลานกลุ่มจระเข้ชนิดอื่น ๆ ในฐานข้อมูลรวมทั้งหมด 45 สายพันธุ์ โดยใช้ยีนบริเวณเดียวกันพบว่า ความห่างทางพันธุกรรมภายในชนิดของตะโขงมีค่าต่ำเพียง 0.311% แต่มีค่าความห่างระหว่างชนิดเฉลี่ยที่สูงถึง 12.907–22.588% แสดงให้เห็นว่าลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณช่วงต้นของยีน COI ความยาว 645 คู่เบส ที่ถูกคัดเลือกนี้สามารถใช้เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดในการระบุชนิดของตะโขงได้จริง การศึกษาครั้งนี้นอกจากจะเปิดเผยข้อมูลทางพันธุกรรมของตะโขงที่มีถิ่นกำเนิดในประเทศไทยเป็นครั้งแรกแล้ว ยังแสดงให้เห็นถึงการประยุกต์ใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ความยาว 645 คู่เบส ของยีน COI เพื่อการระบุอัตลักษณ์ของสัตว์เลื้อยคลานที่ใกล้จะสูญพันธุ์ชนิดนี้ได้อีกด้วย

คำสำคัญ: การระบุชนิด, ความห่างทางพันธุกรรม, ดีเอ็นเอบาร์โค้ด, วงศ์ตะโขง, อันดับจระเข้

Research Title : Molecular identity of captive false gharial *Tomistoma schlegelii*
based on mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I gene
Student name : Miss Chayaporn Harnvichaivattana
Advisor : Assistant Professor Chitchai Chantangsi, Ph.D.
Department of : Biology

Abstract

Lack of genetic data on false gharial *Tomistoma schlegelii* native to Thailand is possibly one of several factors, hindering identification, propagation, and conservation of this reptile species. Such difficulty is evident when the accessibility to its morphological data is limited and the increasing trend to its extinction from nature of the country is approaching. As a consequence, the aim of this study was to generate genetic information of false gharial *T. schlegelii* indigenous to Thailand based on mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I (COI) and to select an appropriate nucleotide region, which can be used as a genetic code or DNA barcode for identification of the taxonomic identity of this animal species. Immediately after hatching, blood samples of newborn false gharials were collected and later used for genomic DNA extraction. Amplification of false gharial COI gene using polymerase chain reaction was performed utilizing the extracted DNA as templates. Two complete sequences of the gene, each with 1,584 bp long, were generated and both of them were identical for the entire length. Comparison between the sequences obtained from this study and the *T. schlegelii* ones retrieved from the NCBI database showed only 2–3 positions of nucleotide difference and exhibited high sequence similarity of 99.87%. Analysis of genetic distance between the *T. schlegelii* and 12 crocodylian species representatives demonstrated mean interspecific sequence divergence ranges of 13.333–15.390% and 13.707–15.834% based on the calculation from the full-length and the 645-bp 5' half of the COI gene, respectively. Such genetic differences indicate higher nucleotide variation of the 5' portion of the gene and highlight the suitability of this region for serving as a DNA barcode. Using the same region, further analysis between *T. schlegelii* sequences derived from this study and those of other crocodylians available from the NCBI database, giving a total of 45 taxa included, showed a low intraspecific distance of only 0.311%, but an average high interspecific divergence of 12.907–22.588%. This result confirms the potential utilization of the chosen 645-bp 5' fragment of the COI gene as a DNA barcode for identifying *T. schlegelii* species. This study not only reveals, for the first time, the genetic data of Thai false gharial *T. schlegelii*, but also illustrates the application of the 645-bp COI gene for diagnosing the taxonomic identity of this vulnerable reptile species.

Keywords: identification, genetic distance, DNA barcode, Gavialidae, Crocodylia

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชิตชัย จันทร์ตั้งสี อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ ที่กรุณา สละเวลาอันมีค่ามาเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาในโครงการนี้ คอยให้คำปรึกษา ให้ความอนุเคราะห์ด้านการเงินใน การทำปฏิบัติการ ให้ความช่วยเหลือในสิ่งต่าง ๆ ด้าน ไม่เคยทอดทิ้งนิสิต ทั้งยังคอยอบรมสั่งสอนให้นิสิต เติบโตเป็นบุคคลที่มีคุณภาพ และเป็นทุก ๆ อย่างที่อาจารย์คนหนึ่งจะสามารถเป็นให้นิสิตได้ รวมทั้งให้การ สนับสนุนนิสิตเสมอมาจนทำให้โครงการนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ซึ่งโครงการนี้จะไม่มีความสำเร็จได้เลยถ้าหาก นิสิตไม่ได้รับความใส่ใจและความกรุณาจากอาจารย์

ขอกราบขอบพระคุณ ร้อยเอก นายแพทย์ปัญญา ยังประภากร และสัตวแพทย์หญิงจิตราภรณ์ ชาญ ราชกิจ ที่กรุณาให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างเลือดตะโง่งในการศึกษาครั้งนี้ ให้คำปรึกษาและคำชี้แนะจนนิสิต สามารถริเริ่มโครงการนี้ขึ้นมาได้

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อัมพร วิเวกแก้ว ที่ให้คำแนะนำต่าง ๆ แก่นิสิต คอย สอบถามความคืบหน้า รวมทั้งให้กำลังใจนิสิตเสมอมา

ขอขอบพระคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ให้ความอนุเคราะห์ สถานที่และเงินทุนในการทำวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณ นายวศิน หาญวิชัยวัฒนา และนางรัตนา หาญวิชัยวัฒนา บิดา-มารดาของนิสิต ที่เลี้ยงดู ให้การสนับสนุนนิสิตในทุกด้าน และส่งเสริมให้นิสิตเติบโตไปข้างหน้าอย่างมั่นคง

ขอขอบคุณนายณรงค์ธร ศิริโรจนสกุลชัย ที่ให้กำลังใจ ความช่วยเหลือ และคำปรึกษาแก่นิสิตตลอด มาทั้งในด้านการทำปฏิบัติการต่าง ๆ ไปจนถึงการเขียนรูปเล่มของโครงการฉบับนี้

ขอขอบคุณนางสาวทินัดดา เข้มรัมย์, นางสาวมนต์สวรรค์ ปัญควณิช และนายพีระพงศ์ มุสิกรัตน์ ที่ คอยเป็นกำลังใจที่สำคัญ ช่วยให้นิสิตสามารถก้าวพ้นปัญหาและจุดที่มีดมนของชีวิตมาได้

สุดท้ายนี้ ขอขอบคุณบุคคลที่สำคัญของนิสิตทุกคนเหล่านี้ที่เชื่อมั่นในตัวนิสิตเสมอมาจนกระทั่งนิสิต สามารถทำโครงการนี้ให้สำเร็จลุล่วงได้

ชยาภรณ์ หาญวิชัยวัฒนา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ง
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ฉ
สารบัญภาพ.....	ฉ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจในการเสนอโครงการ.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ.....	2
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม.....	3
2.1 ข้อมูลโดยทั่วไปของตะโขง.....	3
2.1.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของตะโขง.....	3
2.1.2 พฤติกรรมการกินของตะโขง.....	4
2.1.3 พฤติกรรมการสืบพันธุ์ของตะโขง.....	4
2.1.4 การกระจายพันธุ์และแหล่งที่อยู่อาศัยของตะโขง.....	5
2.1.5 สถานะการอนุรักษ์ตะโขง.....	6
2.1.6 การจัดจำแนกตะโขง.....	7
2.2 ดีเอ็นเอบาร์โค้ด.....	8
2.3 ยีน cytochrome c oxidase subunit I.....	9
2.4 การศึกษาที่เกี่ยวข้องกับตะโขง.....	10
2.4.1 การศึกษาที่มีการเผยแพร่ในฐานข้อมูลต่าง ๆ.....	10
2.4.2 การศึกษาเชิงอนุชีวโมเลกุลของตะโขงโดยใช้ยีน COI เป็นเครื่องหมายโมเลกุล.....	11
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	12
3.1 การขออนุมัติการใช้สัตว์ทดลอง.....	12
3.2 สิ่งมีชีวิตที่ใช้ศึกษา.....	12
3.3 การเก็บตัวอย่าง.....	12
3.4 การเตรียมไพรเมอร์.....	14
3.4.1 การละลายไพรเมอร์.....	14
3.4.2 การเจือจางไพรเมอร์.....	14
3.5 การสกัดดีเอ็นเอ.....	14

3.5.1 การสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีสกัดดีเอ็นเอของชุด <i>AccuPrep® Genomic DNA extraction</i>	15
3.5.2 การสกัดดีเอ็นเอด้วยน้ำยาสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป.....	15
3.6 การหาสถานะที่เหมาะสมของการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน.....	16
3.6.1 การหาอุณหภูมิสำหรับการเข้าเกาะระหว่างไพรเมอร์กับยีน COI ที่เหมาะสม	17
3.6.2 การหาความเข้มข้นของแม่พิมพ์ดีเอ็นเอที่เหมาะสม	18
3.6.3 การหาชนิดของน้ำยาพีซีอาร์สำเร็จรูปที่เหมาะสม	19
3.7 การทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันภายใต้สภาวะที่เหมาะสม	20
3.7.1 การทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน	20
3.7.2 การทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันด้วยเทคนิค semi-nested PCR.....	20
3.8 การตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันที่ได้ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis	22
3.9 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์.....	22
3.10 การวิเคราะห์ความแปรผันทางพันธุกรรมของตะไคร่.....	23
บทที่ 4 ผลการศึกษา	25
4.1 การหาสถานะที่เหมาะสมของการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน.....	25
4.1.1 การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเข้าเกาะระหว่างไพรเมอร์กับยีน cytochrome c oxidase subunit I (COI)	25
4.1.2 การหาความเข้มข้นของแม่พิมพ์ดีเอ็นเอที่เหมาะสม.....	26
4.1.3 การหาชนิดของน้ำยาพีซีอาร์สำเร็จรูปที่เหมาะสม	26
4.2 การทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันภายใต้สภาวะที่เหมาะสม	28
4.2.1 การทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน	28
4.2.2 การทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันด้วยเทคนิค semi-nested PCR.....	28
4.3 การวิเคราะห์ความแปรผันทางพันธุกรรมของตะไคร่.....	29
4.3.1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน cytochrome c oxidase subunit I (COI) ของตะไคร่.....	31
4.3.2 การวิเคราะห์ความแปรผันทางพันธุกรรมของยีน COI ที่สมบูรณ์ตลอดทั้งสาย ระหว่างตะไคร่ที่มีถิ่นกำเนิดในประเทศไทยและตะไคร่ที่มีการเผยแพร่ในฐานข้อมูลของ NCBI ...	34
4.3.3 การวิเคราะห์ความแปรผันทางพันธุกรรมของยีน COI บางส่วน (partial gene) ระหว่างตะไคร่ที่มีถิ่นกำเนิดในประเทศไทยและตะไคร่ทั้งหมดที่มีการเผยแพร่ในฐานข้อมูลของ NCBI	35

4.3.4 การวิเคราะห์ความแปรผันทางพันธุกรรมของยีน COI ระหว่างตะโขงที่มีถิ่นกำเนิดในประเทศไทย, ตะโขงที่มีการเผยแพร่ในฐานะข้อมูลของ NCBI และตัวแทนสัตว์เลื้อยคลานในอันดับ Crocodylia ชนิดอื่น ๆ ที่มีการเผยแพร่ในฐานะข้อมูลของ NCBI	42
4.3.5 การวิเคราะห์ความแปรผันทางพันธุกรรมของยีน COI เฉพาะบริเวณดีเอ็นเอบาร์โค้ดระหว่างตะโขงที่มีถิ่นกำเนิดในประเทศไทย, ตะโขงที่มีการเผยแพร่ในฐานะข้อมูลของ NCBI และตัวแทนสัตว์เลื้อยคลานในอันดับ Crocodylia ชนิดอื่น ๆ ที่มีการเผยแพร่ในฐานะข้อมูลของ NCBI	53
4.3.6 การเปรียบเทียบความห่างทางพันธุกรรมจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI	63
4.3.7 การวิเคราะห์ความแปรผันทางพันธุกรรมของยีน COI เฉพาะบริเวณดีเอ็นเอบาร์โค้ดระหว่างตะโขงที่มีถิ่นกำเนิดในประเทศไทย, ตะโขงที่มีการเผยแพร่ในฐานะข้อมูลของ NCBI และสัตว์เลื้อยคลานในอันดับ Crocodylia ชนิดอื่น ๆ ทั้งหมดที่มีการเผยแพร่ในฐานะข้อมูลของ NCBI	64
บทที่ 5 อภิปรายและสรุปผลการศึกษา	75
เอกสารอ้างอิง.....	78

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 3.1 วันที่เก็บตัวอย่างและรูปแบบน้ำยาที่ใช้รักษาสภาพตัวอย่าง	12
ตารางที่ 3.2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับเพิ่มปริมาณและหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ในการศึกษาครั้งนี้	16
ตารางที่ 3.3 สภาวะในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันสำหรับการหาอนุกรมวิธานสำหรับการเข้าเกาะระหว่างไพรเมอร์กับยีน COI ที่เหมาะสม.....	17
ตารางที่ 3.4 สภาวะในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันสำหรับการหาความเข้มข้นของแม่พิมพ์ดีเอ็นเอที่เหมาะสม	18
ตารางที่ 3.5 สภาวะในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันสำหรับการหาชนิดของน้ำยาพีซีอาร์สำเร็จรูปที่เหมาะสม เมื่อน้ำยามีความเข้มข้นเป็น 1.1X.....	19
ตารางที่ 3.6 สภาวะในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันสำหรับการหาชนิดของน้ำยาพีซีอาร์สำเร็จรูปที่เหมาะสม เมื่อน้ำยามีความเข้มข้นเป็น 2X	19
ตารางที่ 3.7 สภาวะในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันสำหรับตัวอย่างตะไคร่ที่ได้รับจากบริษัทปัญญาฟาร์ม กำแพงแสน จำกัด.....	20
ตารางที่ 3.8 สภาวะในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันด้วยเทคนิค semi-nested PCR ชุดที่ 1 เพื่อเพิ่มชิ้นส่วนยีน COI ทางด้าน 5' หรือ ประมาณ 1,200 คู่เบสแรก	21
ตารางที่ 3.9 สภาวะในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันด้วยเทคนิค semi-nested PCR ชุดที่ 2 เพื่อเพิ่มชิ้นส่วนยีน COI ทางด้าน 3' หรือ ประมาณ 1,200 คู่เบสหลัง	21
ตารางที่ 4.1 ค่าจำนวนตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกันเมื่อเปรียบเทียบเป็นคู่ในความยาวที่สามารถเปรียบเทียบกันได้ ซึ่งคำนวณจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ของตัวอย่างตะไคร่ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้และตะไคร่ที่มีอยู่ในฐานข้อมูลของ NCBI ความยาว 209 และ 1,584 คู่เบส จำนวนทั้งหมด 4 สาย	36
ตารางที่ 4.2 ค่าเปอร์เซ็นต์ความห่างทางพันธุกรรมเมื่อคำนวณด้วย <i>p</i> -distance และเปรียบเทียบเป็นคู่ในความยาวที่สามารถเปรียบเทียบกันได้จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ของตัวอย่างตะไคร่ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้และตะไคร่ที่มีอยู่ในฐานข้อมูลของ NCBI ความยาว 209 และ 1,584 คู่เบส จำนวนทั้งหมด 4 สาย	36
ตารางที่ 4.3 ค่าเปอร์เซ็นต์ความห่างทางพันธุกรรมเมื่อคำนวณด้วยแบบจำลอง Jukes-Cantor และเปรียบเทียบเป็นคู่ในความยาวที่สามารถเปรียบเทียบกันได้จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ของตัวอย่างตะไคร่ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้และตะไคร่ที่มีอยู่ในฐานข้อมูลของ NCBI ความยาว 209 และ 1,584 คู่เบส จำนวนทั้งหมด 4 สาย	36

- ตารางที่ 4.36 ค่าเปอร์เซ็นต์ความห่างทางพันธุกรรมเมื่อคำนวณด้วยแบบจำลอง LogDet และเปรียบเทียบ เป็นคู่ในความยาวที่สามารถเปรียบเทียบกันได้ จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI เฉพาะบริเวณดีเอ็นเอบาร์โค้ดของตัวอย่างตะโขงที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ และตัวแทนสัตว์เลื้อยคลานในอันดับ Crocodylia ความยาว 641 คู่เบส จำนวนทั้งหมด 15 สาย62
- ตารางที่ 4.37 ค่าเฉลี่ยความห่างทางพันธุกรรมเมื่อเปรียบเทียบระหว่างการวิเคราะห์ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ ของยีน COI ตลอดทั้งสาย และ เมื่อวิเคราะห์เฉพาะบริเวณดีเอ็นเอบาร์โค้ด ด้วยการคำนวณความ ห่างและใช้แบบจำลองการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์แบบต่าง ๆ63
- ตารางที่ 4.38 ค่าจำนวนตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกันเมื่อเปรียบเทียบเป็นคู่ในความยาวที่สามารถ เปรียบเทียบกันได้ ซึ่งคำนวณจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI เฉพาะบริเวณดีเอ็นเอบาร์โค้ดของ ตัวอย่างตะโขงที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ และตัวแทนสัตว์เลื้อยคลานในอันดับ Crocodylia ความ ยาว 639–645 คู่เบส จำนวนทั้งหมด 45 สาย 19 กลุ่ม ตามชนิดของสิ่งมีชีวิต66
- ตารางที่ 4.39 ค่าเปอร์เซ็นต์ความห่างทางพันธุกรรมเมื่อคำนวณด้วย p -distance และเปรียบเทียบเป็นคู่ใน ความยาวที่สามารถเปรียบเทียบกันได้ จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI เฉพาะบริเวณดีเอ็นเอ บาร์โค้ดของตัวอย่างตะโขงที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ และตัวแทนสัตว์เลื้อยคลานในอันดับ Crocodylia ความยาว 639–645 คู่เบส จำนวนทั้งหมด 45 สาย 19 กลุ่ม ตามชนิดของสิ่งมีชีวิต.....67
- ตารางที่ 4.40 ค่าเปอร์เซ็นต์ความห่างทางพันธุกรรมเมื่อคำนวณด้วยแบบจำลอง Jukes-Cantor และ เปรียบเทียบเป็นคู่ในความยาวที่สามารถเปรียบเทียบกันได้ จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI เฉพาะ บริเวณดีเอ็นเอบาร์โค้ดของตัวอย่างตะโขงที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ และตัวแทนสัตว์เลื้อยคลานใน อันดับ Crocodylia ความยาว 639–645 คู่เบส จำนวนทั้งหมด 45 สาย 19 กลุ่ม ตามชนิดของ สิ่งมีชีวิต68
- ตารางที่ 4.41 ค่าเปอร์เซ็นต์ความห่างทางพันธุกรรมเมื่อคำนวณด้วยแบบจำลอง Kimura two-parameter และเปรียบเทียบเป็นคู่ในความยาวที่สามารถเปรียบเทียบกันได้ จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI เฉพาะบริเวณดีเอ็นเอบาร์โค้ดของตัวอย่างตะโขงที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ และตัวแทน สัตว์เลื้อยคลานในอันดับ Crocodylia ความยาว 639–645 คู่เบส จำนวนทั้งหมด 45 สาย 19 กลุ่ม ตามชนิดของสิ่งมีชีวิต.....69
- ตารางที่ 4.42 ค่าเปอร์เซ็นต์ความห่างทางพันธุกรรมเมื่อคำนวณด้วยแบบจำลอง Tajima-Nei และ เปรียบเทียบเป็นคู่ในความยาวที่สามารถเปรียบเทียบกันได้ จากลำดับ นิวคลีโอไทด์ของยีน COI เฉพาะบริเวณดีเอ็นเอบาร์โค้ดของตัวอย่างตะโขงที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ และตัวแทน สัตว์เลื้อยคลานในอันดับ Crocodylia ความยาว 639–645 คู่เบส จำนวนทั้งหมด 45 สาย 19 กลุ่ม ตามชนิดของสิ่งมีชีวิต.....70
- ตารางที่ 4.43 ค่าเปอร์เซ็นต์ความห่างทางพันธุกรรมเมื่อคำนวณด้วยแบบจำลอง Tamura 3-parameter และ เปรียบเทียบเป็นคู่ในความยาวที่สามารถเปรียบเทียบกันได้จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI เฉพาะ

บริเวณดีเอ็นเอบาร์โค้ดของตัวอย่างตะโขงที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ และตัวแทนสัตว์เลื้อยคลานในอันดับ Crocodylia ความยาว 639–645 คู่เบส จำนวนทั้งหมด 45 สาย 19 กลุ่ม ตามชนิดของสิ่งมีชีวิต 71

ตารางที่ 4.44 ค่าเปอร์เซ็นต์ความห่างทางพันธุกรรมเมื่อคำนวณด้วยแบบจำลอง Tamura-Nei และเปรียบเทียบเป็นคู่ในความยาวที่สามารถเปรียบเทียบกันได้ จากลำดับ นิวคลีโอไทด์ของยีน COI เฉพาะบริเวณดีเอ็นเอบาร์โค้ดของตัวอย่างตะโขงที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ และตัวแทนสัตว์เลื้อยคลานในอันดับ Crocodylia ความยาว 639–645 คู่เบส จำนวนทั้งหมด 45 สาย 19 กลุ่ม ตามชนิดของสิ่งมีชีวิต..... 72

ตารางที่ 4.45 ค่าเปอร์เซ็นต์ความห่างทางพันธุกรรมเมื่อคำนวณด้วยแบบจำลอง Maximum composite likelihood และเปรียบเทียบเป็นคู่ในความยาวที่สามารถเปรียบเทียบกันได้ จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI เฉพาะบริเวณดีเอ็นเอบาร์โค้ดของตัวอย่างตะโขงที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ และตัวแทนสัตว์เลื้อยคลานในอันดับ Crocodylia ความยาว 639–645 คู่เบส จำนวนทั้งหมด 45 สาย 19 กลุ่ม ตามชนิดของสิ่งมีชีวิต..... 73

ตารางที่ 4.46 ค่าเปอร์เซ็นต์ความห่างทางพันธุกรรมเมื่อคำนวณด้วยแบบจำลอง LogDet และเปรียบเทียบเป็นคู่ในความยาวที่สามารถเปรียบเทียบกันได้ จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI เฉพาะบริเวณดีเอ็นเอบาร์โค้ดของตัวอย่างตะโขงที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ และตัวแทนสัตว์เลื้อยคลานในอันดับ Crocodylia ความยาว 639–645 คู่เบส จำนวนทั้งหมด 45 สาย 19 กลุ่ม ตามชนิดของสิ่งมีชีวิต.... 74

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 2.1 ตะโขงโตเต็มวัยที่มีรูปร่างเพรียว ลำตัวสีน้ำตาลแดงสลับน้ำตาลเข้ม ด้านท้องมีสีอ่อน ด้านข้างลำตัวมีลายต่างสีเข้มพาด (ที่มา: โปสต์ทูเคย์ (นามแฝง), 2562).....3

ภาพที่ 2.2 ตะโขงวัยเยาว์แสดงปากที่มีรูปร่างเรียวยาวแหลม ฟันมีลักษณะคล้ายเข็มเรียงเป็นระเบียบ ลำตัวสีน้ำตาลออกเหลือง สีอ่อนกว่าตะโขงในระยะโตเต็มวัย (ที่มา: Flach, 2018; Gruný, 2017).....4

ภาพที่ 2.3 ตะโขงเพศผู้ที่อาศัยอยู่ในสวนสัตว์กำลังกินเต่าปากเหลือง *Melanochelys trijuga* ที่อาศัยอยู่ในกรงเดียวกัน โดยทำการจับเต่าดังกล่าวจากบนบก และคาบลงไปกินในน้ำแล้วใช้ฟันกัดกระดองเต่าให้แตก (ที่มา: Selvaraj, 2012)..... 4

ภาพที่ 2.4 สถานะการกระจายพันธุ์ของตะโขงในธรรมชาติ [สีฟ้า: พบตะโขงอาศัยอยู่ตามธรรมชาติ; สีเขียว: มีความเป็นไปได้สูงที่จะสูญพันธุ์ไปจากธรรมชาติ; สีส้ม: สถานะไม่แน่ชัดเนื่องจากขาดข้อมูล; และ สีดำ: สูญพันธุ์ไปแล้วจากธรรมชาติ] (ที่มา: Bezuijen et al., 2014)6

ภาพที่ 2.5 แผนที่ไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอของตะโขง (*Tomistoma schlegelii*) แสดงตำแหน่งยีน โดยดีเอ็นเอในออร์แกเนลล์นี้มีลักษณะเป็นวงกลมเดี่ยวสายคู่ ขนาดประมาณ 16 กิโลเบส (Man et al., 2011) 10

ภาพที่ 3.1 การฉีกเปลือกไข่ตะโขงที่พร้อมจะฟักออกจากไข่เพื่อช่วยลูกตะโขงให้สามารถฟักออกมาจากไข่ได้อย่างสมบูรณ์..... 13

ภาพที่ 3.2 การใช้กรรไกรตัดหลอดเลือดที่เชื่อมระหว่างตัวลูกตะโขงและถุงไข่แดง..... 13

ภาพที่ 3.3 การเก็บตัวอย่างเลือดตะโขง โดยการนำหลอดไมโครเซ็นติฟิวก์ที่มีน้ำยารักษาสภาพมารองเลือดของลูกตะโขงที่ไหลออกมาจากหลอดเลือดที่ถูกตัด หลังจากการฟักออกมาจากไข่..... 14

ภาพที่ 3.4 ตำแหน่งของไพรเมอร์ที่เข้าเกาะกับยีน cytochrome c oxidase subunit I (COI) ของตะโขงซึ่งมีความยาว 1,584 คู่เบส ลูกศรในภาพแสดงทิศทางการวิ่งของไพรเมอร์ 17

ภาพที่ 4.1 แผ่นวุ้นอะกาโรสแสดงการตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีน COI ขนาดประมาณ 1,800 คู่เบส โดยใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอของตะโขงหมายเลข 9 เป็นแม่พิมพ์ เพื่อหาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเข้าเกาะระหว่างไพรเมอร์ COITSF1 และ COITSR1 กับยีน COI [ช่องที่ 1 และ 9: molecular marker ชนิด 1 kb; ช่องที่ 2–8 และ 10: ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ทำปฏิกิริยาด้วย annealing temperature ที่ 47.0, 48.0, 49.8, 52.7, 56.2, 58.9, 60.8 และ 62.0 องศาเซลเซียส ตามลำดับ; และช่องที่ 11: negative control] 25

ภาพที่ 4.2 แผ่นวุ้นอะกาโรสแสดงการตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีน COI ขนาดประมาณ 1,800 คู่เบส โดยใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอของตะโขงหมายเลข 9 (ช่องที่ 2–4), หมายเลข 10 (ช่องที่ 5–7), หมายเลข 14 (ช่องที่ 8 และ 10–11) และ หมายเลข 16 (ช่องที่ 12–14) เป็นแม่พิมพ์ และไพรเมอร์ COITSF1–COITSR1 เพื่อหาความเข้มข้นของแม่พิมพ์ดีเอ็นเอที่เหมาะสม [ช่องที่ 1 และ 9: molecular marker ชนิด 1 kb; ช่องที่ 2, 5, 8 และ 12: ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่มีความเข้มข้นของแม่พิมพ์ดีเอ็นเอเป็น 2X;

- ช่องที่ 3, 6, 10 และ 13: ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่มีความเข้มข้นของแม่พิมพ์ดีเอ็นเอเป็น 4X; ช่องที่ 4, 7, 11 และ 14: ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่มีความเข้มข้นของแม่พิมพ์ดีเอ็นเอเป็น 6X; และช่องที่ 15: negative control].....26
- ภาพที่ 4.3 แผ่นวุ้นอะกาโรสแสดงการตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีน COI ขนาดประมาณ 1,800 คู่เบส โดยใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอของตะโขงหมายเลข 9 (ช่องที่ 1-5) และ หมายเลข 11 (ช่องที่ 7-11) เป็นแม่พิมพ์ และไพรเมอร์ COITSF1-COITSR1 เพื่อหาน้ำยาพีซีอาร์สำเร็จรูปที่เหมาะสม [ช่องที่ 1 และ 7: ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ทำปฏิกิริยาด้วยน้ำยา OnePCR™ Supermix; ช่องที่ 2 และ 8: น้ำยา OnePCR Plus™ Supermix; ช่องที่ 3 และ 9: น้ำยา MyTaq™ HS Red Mix; ช่องที่ 4 และ 10: น้ำยา GeNei™ PCR Master Mix; ช่องที่ 5 และ 11: น้ำยา EmeraldAmp™ GT PCR Master Mix; และช่องที่ 6 negative control] หมายเหตุ: ไม่ได้มีการใส่ molecular marker เนื่องจากความผิดพลาดของผู้ศึกษา27
- ภาพที่ 4.4 แผ่นวุ้นอะกาโรสแสดงการตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีน COI ขนาดประมาณ 1,800 คู่เบส ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมด้วยไพรเมอร์ COITSF1 และ COITSR1 [ช่องที่ 1 และ 7: molecular marker ชนิด 1 kb plus; ช่องที่ 2-6 และ 8-11: ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ทำปฏิกิริยาโดยใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอของตะโขงหมายเลข 1, 9-16 เป็นแม่พิมพ์ ตามลำดับ; และช่องที่ 12: negative control] ..28
- ภาพที่ 4.5 แผ่นวุ้นอะกาโรสแสดงการตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีน COI ขนาดประมาณ 1,200 คู่เบส ด้วยเทคนิค semi-nested PCR และคู่ไพรเมอร์ COITSF1-COITS1172R [ช่องที่ 1: molecular marker ชนิด 1 kb plus; ช่องที่ 2-7: ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ทำปฏิกิริยาโดยใช้ดีเอ็นเอของตัวอย่างตะโขงหมายเลข 9, 12-16 เป็นแม่พิมพ์ ตามลำดับ; และช่องที่ 8: negative control].....29
- ภาพที่ 4.6 แผ่นวุ้นอะกาโรสแสดงการตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีน COI ขนาดประมาณ 1,200 คู่เบส ด้วยเทคนิค semi-nested PCR และไพรเมอร์ COITS400F-COITSR1 [ช่องที่ 1: molecular marker ชนิด 1 kb plus; ช่องที่ 2-7: ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ทำปฏิกิริยาโดยใช้ดีเอ็นเอของตัวอย่างตะโขงหมายเลข 9, 12-16 เป็นแม่พิมพ์ ตามลำดับ; และช่องที่ 8: negative control].....29

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจในการเสนอโครงการ

การสูญพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตทั้งที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติหรือที่เกิดขึ้นจากปัจจัยอันเกี่ยวเนื่องจากการกระทำของมนุษย์ เป็นหนึ่งในสาเหตุที่ทำให้เกิดการลดลงของความหลากหลายทางชีวภาพ ซึ่งถือเป็นหนึ่งในตัวชี้วัดถึงความอุดมสมบูรณ์และเสถียรภาพของระบบนิเวศ ถึงแม้ว่าในปัจจุบันจะมีสิ่งมีชีวิตสูญพันธุ์ไปแล้วกว่า 872 ชนิดก็ตาม และอีก 69 ชนิดเหลืออยู่เพียงในสถานเพาะเลี้ยงเท่านั้น สิ่งมีชีวิตอีกกว่า 5,826 ชนิดทั่วโลกกำลังประสบกับความเสี่ยงในขั้นวิกฤตต่อการสูญพันธุ์ (Bezuijen et al., 2014) โดยหนึ่งในจำนวนนั้นก็คือ ตะโขงหรือจระเข้ปากกระทุงเหว *Tomistoma schlegelii* ที่ถือเป็นสัตว์ที่เสี่ยงต่อการสูญพันธุ์จากธรรมชาติในอนาคต (vulnerable: VU) (Bezuijen et al., 2014)

ตะโขง เป็นสัตว์เลื้อยคลานในอันดับ Crocodylia ที่อาศัยอยู่ในน้ำจืดและมีปากเรียวยาวแหลม ตัวผู้โตเต็มที่สามารถยาวได้ถึง 5 เมตร (Bezuijen et al., 2010) ตัวสีน้ำตาลแดงมีลายสีน้ำตาลเข้ม (องค์การสวนสัตว์ในพระบรมราชูปถัมภ์, 2560) สัตว์เลื้อยคลานชนิดนี้มีรายงานการพบมากที่สุดมาตราตะวันตกของกาลิมันตันและชาวตะวันตกของประเทศอินโดนีเซีย ชาราวักและมาเลเซียตะวันตกของประเทศมาเลเซีย (Stuebing et al., 2006) และน่าจะมีจำนวนมากถึง 2,500 ตัว จากการสำรวจของ Yoshino และคณะ (2010) อย่างไรก็ตามการเพิ่มขึ้นของการลักลอบเผาป่า การบุกรุกพื้นที่โดยฝีมือมนุษย์ และการทำลายแหล่งอาศัยตามธรรมชาติ ทำให้มีการคาดการณ์ไว้ว่าจำนวนของตะโขงจะลดลงอย่างรวดเร็วในอนาคต (Staniewicz, 2012)

ในประเทศไทยตะโขงถูกระบุว่าสูญพันธุ์ไปหมดแล้วจากธรรมชาติ (Bezuijen et al., 2014) เนื่องจากการล่าอย่างหนักและการบุกรุกทำลายป่าที่เป็นแหล่งอาศัย กอปรกับช่วงอายุเมื่อถึงวัยเจริญพันธุ์และระยะเวลาการฟักไข่ที่นานกว่าจระเข้ชนิดอื่นเกือบเท่าตัว (Bezuijen et al., 2010) ส่งผลให้ถูกสัตว์ชนิดอื่นกินไข่ได้ง่าย อย่างไรก็ตามมีรายงานการพบตะโขงในธรรมชาติจากหลายพื้นที่ อาทิ ปากน้ำเพชรบุรี จังหวัดเพชรบุรี, เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าสิรินธร (ป่าพรุโต๊ะแดง) (สุธิดา พฤษ์อุดม, 2555) และ ฝายเก็บกักน้ำคลองลุมพินี อำเภอเสถียร จังหวัดชลบุรี (วรรณ อภิบาลศรี, 2550, อ้างถึงใน MGR Online (นามแฝง), 2550) จึงนำไปสู่ความพยายามในการอนุรักษ์สัตว์เลื้อยคลานสายพันธุ์นี้ให้คงอยู่ในประเทศต่อไป

รัฐบาลได้กำหนดให้ตะโขงเป็นสัตว์ป่าคุ้มครองประเภทสัตว์เลื้อยคลาน ลำดับที่ 42 (กำหนดให้สัตว์ป่าบางชนิดเป็นสัตว์ป่าคุ้มครอง, 2546) และมีความพยายามปกป้องไม่ให้ตะโขงสูญพันธุ์ เนื่องด้วยจำนวนของสัตว์เลื้อยคลานชนิดนี้ที่คาดว่ามียุ่อยู่น้อยมากในธรรมชาติของประเทศ จึงได้มีการตั้งศูนย์อนุรักษ์พันธุ์ตะโขงขึ้นหลายแห่ง อาทิ โครงการเพาะขยายพันธุ์ตะโขงนอกถิ่นอาศัยในพื้นที่สวนสัตว์นครราชสีมา (สวนสัตว์นครราชสีมา, ม.ป.ป.) ชมรมเกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงและอนุรักษ์จระเข้นครปฐม และ บริษัทปัญญาฟาร์ม กำแพงแสน จำกัด (อมร พุทธิสมา, 2558, อ้างถึงใน อานนท์ มุ่งลิ้ม, 2558) อย่างไรก็ตามข้อมูลทางพันธุกรรมของประชากรตะโขงในศูนย์เหล่านี้ หรือจากตัวอย่างตะโขงในธรรมชาติของประเทศไทยยังไม่มีปรากฏหรือได้รับการศึกษาในด้านใดเลย

ดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA barcode) เป็นการศึกษาทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต โดยอาศัยความสามารถในการจัดเรียงตัวของลำดับนิวคลีโอไทด์ในรูปแบบที่แตกต่างกัน และส่งผลให้เกิดความหลากหลายทางพันธุกรรมของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความจำเพาะต่อสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด รูปแบบที่แตกต่างกันเหล่านี้เปรียบเสมือนบาร์โค้ด (barcode) ของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด (สิรินารถ ชัยชนะทอง และคณะ, 2561) เช่นเดียวกับบาร์โค้ดของสินค้าในห้างสรรพสินค้าที่เมื่อตรวจสอบแล้วสามารถระบุชนิดของสินค้านั้นได้ แนวคิดนี้นำไปสู่การประยุกต์ใช้เพื่อประโยชน์ในด้านการระบุชนิดพันธุ์ของสิ่งมีชีวิต (species identification) รวมถึงอัตลักษณ์หรือคุณสมบัติที่มีความเฉพาะตัวของสิ่งมีชีวิตชนิดนั้น ๆ โดยการคัดเลือกช่วงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมาะสม เพื่อนำมาใช้เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดของสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่ง จำเป็นต้องอาศัยฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความถูกต้องและครบถ้วนเป็นพื้นฐาน

ยีน cytochrome c oxidase subunit I (COI) ในไมโทคอนเดรียถือเป็นหนึ่งในยีนที่ได้รับความนิยมในการใช้เพื่อเป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดของสิ่งมีชีวิต โดยเฉพาะอย่างยิ่งสิ่งมีชีวิตในอาณาจักรสัตว์ เนื่องจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนนี้มีความแตกต่างของลำดับในสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันต่ำ แต่มีความแตกต่างระหว่างสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกันสูง โดยสัตว์เลื้อยคลานในกลุ่มจระเข้ก็เป็นอีกหนึ่งกลุ่มสิ่งมีชีวิตที่มีรายงานการศึกษาชนิดนี้อย่างแพร่หลาย (Eaton et al., 2009; Venegas–Anaya et al., 2008; Weaver et al., 2008) อย่างไรก็ตามจนถึงปัจจุบันพบว่าการเผยแพร่ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน COI ของตะโขง *Tomistoma schlegelii* เพียง 3 ชุดข้อมูลเท่านั้น โดยตัวอย่างทั้งหมดที่ได้มีการเผยแพร่ ไม่ได้มีการระบุที่มาของตัวอย่างว่ามีที่มาจากประเทศหรือภูมิภาคใด

งานวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อสร้างฐานข้อมูลทางพันธุกรรมระดับโมเลกุลของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน COI ของตะโขงในประเทศไทยขึ้นเป็นครั้งแรก โดยเริ่มจากตัวอย่างตะโขงที่ถูกเพาะเลี้ยงในศูนย์เพาะเลี้ยง และใช้ข้อมูลที่ได้เพื่อหาช่วงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมาะสม สำหรับการเป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดของสิ่งมีชีวิตชนิดนี้จากการใช้ยีน COI เป็นเครื่องหมายโมเลกุล ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน COI และดีเอ็นเอบาร์โค้ดที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ จะเป็นประโยชน์ต่อการใช้เป็นฐานข้อมูลเพื่อการศึกษา ระบุชนิด และเปรียบเทียบระหว่างตัวอย่างตะโขงที่มาจากศูนย์เพาะเลี้ยงในการศึกษารั้วนี้กับศูนย์เพาะเลี้ยงอื่น รวมถึงการระบุชนิดหรืออัตลักษณ์สำหรับตัวอย่างที่อาจพบได้จากในธรรมชาติต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ

1.2.1 เพื่อศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน cytochrome c oxidase subunit I จากตะโขงในศูนย์เพาะเลี้ยง

1.2.2 เพื่อหาช่วงดีเอ็นเอบาร์โค้ดที่เหมาะสมของตะโขงในศูนย์เพาะเลี้ยง โดยอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน cytochrome c oxidase subunit I เป็นเครื่องหมายโมเลกุล

1.2.3 เพื่อสร้างฐานข้อมูลทางพันธุกรรมระดับโมเลกุลจากยีน cytochrome c oxidase subunit I ของประชากรตะโขงที่มาจากศูนย์เพาะเลี้ยงของประเทศไทย

บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรม

2.1 ข้อมูลโดยทั่วไปของตะโขง

ตะโขง หรือ จระเข้ปากกระทุงเหว เป็นสัตว์เลื้อยคลานในอันดับ Crocodylia วงศ์ใหญ่ Gavialidae วงศ์ Tomistominae สกุล *Tomistoma* สปีชีส์ *T. schlegelii* เป็นจระเข้ขนาดกลาง อาศัยอยู่ในน้ำจืด มีปากเรียวแหลม หางแบนใหญ่ ตัวสีน้ำตาลแดงมีลายสีน้ำตาลเข้ม (องค์การสวนสัตว์ในพระบรมราชูปถัมภ์, 2560) มีรายงานการพบมากที่สุดมาตราตะวันออก กาลิมันตัน และชาวตะวันตกของประเทศอินโดนีเซีย เขตซาราวัก และมาเลเซียตะวันตกของประเทศมาเลเซีย (Stuebing et al., 2006) สัตว์เลื้อยคลานชนิดนี้กินอาหารจำพวก กุ้ง ปู ปลา แมลง และสัตว์เลื้อยลูกด้วยน้ำนมขนาดเล็ก

2.1.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของตะโขง

ตะโขงมีลำตัวสีน้ำตาลแดงลายสีน้ำตาลเข้มพาดขวางตลอดลำตัว ด้านท้องมีสีออกเทา-ขาว (ภาพที่ 2.1) ตะโขงวัยเยาว์จะมีลำตัวสีออกน้ำตาล-เหลืองลายสีน้ำตาลเข้ม มีจุดด่างสีดำเข้มพาดที่ด้านข้างของปากคาง ลำตัว และหาง ก่อนจะจางลงเมื่อโตขึ้นและเข้าสู่ระยะโตเต็มวัย ซึ่งรูปแบบของลายจุดเหล่านี้จะเป็นเอกลักษณ์จำเพาะของตะโขงแต่ละตัว (ภาพที่ 2.2) ปากของตะโขงจะมีลักษณะยาว ภายในมีฟันแหลมคล้ายเข็มเรียงตัวเป็นระเบียบ กะโหลกมีสัดส่วนความยาวเป็น 3.0–3.5 เท่าของความกว้างของฐานกะโหลก สามารถกล่าวได้ว่าตะโขงเป็นจระเข้ที่มีขนาดกะโหลกเฉลี่ยที่ยาวที่สุด โดย 6 ใน 8 อันดับของความยาวกะโหลกจระเข้ที่ยาวที่สุดที่มีบันทึกไว้ในพิพิธภัณฑ์ทั่วโลกเป็นของตะโขง

ตะโขงมีรูปร่างเพรียวยาว ตัวเต็มวัยโดยทั่วไปมีขนาด 2.5–3.0 เมตร อย่างไรก็ตามมีรายงานพบตะโขงตัวผู้สามารถโตได้ถึง 5 เมตร และตัวเมียโตได้ถึง 4 เมตรด้วยกัน (Bezuijen et al., 2010) เกล็ดที่หลังของตะโขงมีลักษณะแบนราบ ก่อนที่จะนูนเป็นสันแหลมที่ช่วงหลังจากขาหลังเป็นต้นไป โดยจะพบเกล็ดที่หลังหัวคู่พิเศษ 1 คู่ที่มีขนาดใหญ่กว่าคู่อื่น



ภาพที่ 2.1 ตะโขงโตเต็มวัยที่มีรูปร่างเพรียว ลำตัวสีน้ำตาลแดงสลับน้ำตาลเข้ม ด้านท้องมีสีอ่อน ด้านข้างลำตัวมีลายด่างสีเข้มพาด (ที่มา: โปสต์ทูเดย์ (นามแฝง), 2562)



ภาพที่ 2.2 ตะโขงวัยเยาว์แสดงปากที่มีรูปร่างเรียวยาวแหลม ฟันมีลักษณะคล้ายเข็มเรียงเป็นระเบียบ ลำตัวสีน้ำตาลออกเหลือง สีส่อนกว่าตะโขงในวัยโตเต็มวัย (ที่มา: Flach, 2018; Gruny, 2017)

2.1.2 พฤติกรรมการกินของตะโขง

เนื่องจากลักษณะปากที่เรียวยาวของตะโขง เป็นเหตุให้เชื่อว่าตะโขงมีอาหารหลักเป็นปลาและสัตว์เลื้อยคลานขนาดเล็กเท่านั้น อย่างไรก็ตามจากการศึกษาของ Rachmawan และ Brend (2009) พบว่า ตะโขงเป็นสัตว์ที่มีพฤติกรรมการกินแบบหลากหลาย (generalist species) กล่าวคือ ตะโขงมีการกินลิง กวาง นกน้ำ และ สัตว์เลื้อยคลานต่าง ๆ และพบเห็นว่ามี การกินเต่าเป็นประจำ (Selvaraj, 2012) (ภาพที่ 2.3) นอกจากนี้ยังมีรายงานการพบเห็นตะโขงกินวัวที่กาลิมันตันตะวันออกอีกด้วย (Bezuijen et al., 2010)



ภาพที่ 2.3 ตะโขงเพศผู้ที่อาศัยอยู่ในสวนสัตว์กำลังกินเต่าปากเหลือง *Melanochelys trijuga* ที่อาศัยอยู่ในกรงเดียวกัน โดยทำการจับเต่าดังกล่าวจากบนบก และคาบลงไปกินในน้ำแล้วใช้ฟันกัดกระดองเต่าให้แตก (ที่มา: Selvaraj, 2012)

2.1.3 พฤติกรรมการสืบพันธุ์ของตะโขง

ข้อมูลเกี่ยวกับการสืบพันธุ์ของตะโขงที่พบในปัจจุบันเกือบทั้งหมดเป็นข้อมูลที่ได้มาจากการศึกษาพฤติกรรมของตะโขงในสถานเพาะเลี้ยงหรือสวนสัตว์ต่าง ๆ โดยตะโขงทั้งสองเพศจะเจริญจนเป็นตัวเต็มวัย

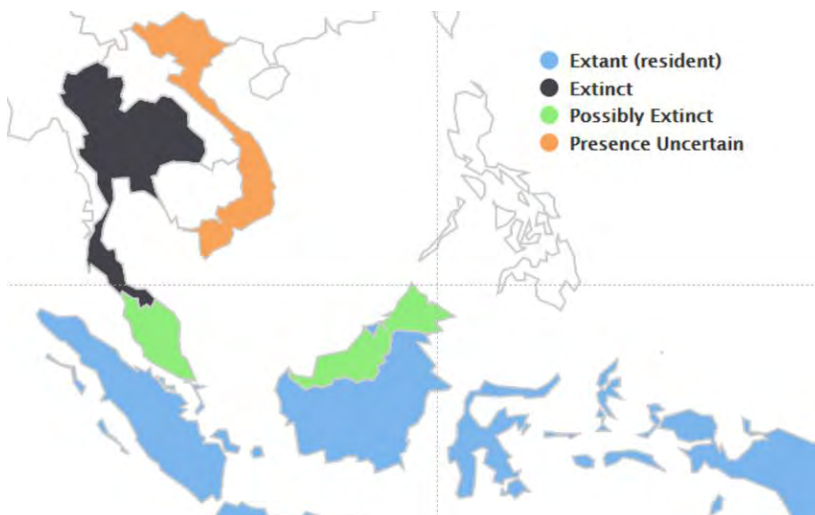
และเริ่มสืบพันธุ์เมื่อมีอายุ 20 ปี (ปัญญา ยังประภากร และคณะ, 2555) สัตว์เลี้ยงคลานชนิดนี้จะมีการจับคู่แบบผัวเดียวเมียเดียว (monogamous) ร่วมกับการแสดงพฤติกรรมเกี่ยวพาราสีและทำรังในช่วงฤดูฝน โดยตัวผู้จะเข้าไปหาตัวเมียขณะอยู่ในน้ำและว่ายน้ำไปรอบ ๆ ตัวเมีย จากการศึกษาการเข้าคู่ของตะโขงบางคู่พบว่า ตะโขงจะมีพฤติกรรมการใช้หางของพวกมันพาดกันและกัน ก่อนที่จะเกิดการผสมพันธุ์ขึ้น จากนั้นตะโขงตัวผู้จะขึ้นขี่ตัวเมียแล้วใช้หางพันรอบตัวเมีย ในการศึกษาของโครงการเพาะพันธุ์ตะโขงนอกถิ่นอาศัยของประเทศมาเลเซียที่ทำการเลี้ยงตะโขงเพศผู้ 3 ตัวร่วมกับตะโขงเพศเมีย 1 ตัว พบว่าตะโขงเพศเมียเลือกที่จะผสมพันธุ์กับตะโขงตัวผู้ที่มีขนาดใหญ่ที่สุด แต่เมื่อมีการเลี้ยงตะโขงเพศเมีย 2 ตัวร่วมกันกลับพบว่าไม่มีการผสมพันธุ์เกิดขึ้น ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากการยับยั้งการสืบพันธุ์ซึ่งกันและกันจากการที่มีตัวเมียอาศัยอยู่ใกล้กัน (Bezuijen et al., 1997; Mathew et al., 2011)

ตะโขงตัวเมียจะเริ่มสร้างรังตั้งแต่ช่วง 1 เดือนหลังจากการผสมพันธุ์เสร็จ ซึ่งรังของตะโขงมักพบสร้างจากดิน ทราช วัชพืช กิ่งไม้ และใบไม้แห้ง กองพูนขึ้นมาบนพื้นบริเวณใต้ต้นไม้ที่มีร่มเงา โดยตะโขงจะวางไข่หลังจากที่เริ่มสร้างรังเป็นเวลา 1-2 สัปดาห์ ครั้งละ 20-60 ฟอง ซึ่งไข่ของสัตว์เลี้ยงคลานชนิดนี้ถูกจัดว่าเป็นไขขนาดใหญ่ และมีรายงานว่าสามารถพบไข่ที่มีขนาดยาวถึง 9.5 เซนติเมตร กว้าง 6.2 เซนติเมตร ซึ่งเป็นขนาดใหญ่กว่าสัตว์เลี้ยงคลานชนิดอื่น ๆ ในกลุ่มจระเข้ถึงสองเท่า หลังจากการวางไข่ ตะโขงตัวเมียจะนำเศษใบไม้ต่าง ๆ มาคลุมไข่ที่อยู่ในรัง ทำให้รังของตะโขงมีขนาดใหญ่มาก โดยทั่วไปรังของตะโขงจะมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 90-110 เซนติเมตร และ สูง 45-60 เซนติเมตร และมีการรักษาอุณหภูมิของรังให้อยู่ในช่วง 26-32 องศาเซลเซียส เพื่อการฟักตัวจากไข่ในช่วงวันที่ 90-100 (Bezuijen et al., 2010; Mathew et al., 2011)

2.1.4 การกระจายพันธุ์และแหล่งที่อยู่อาศัยของตะโขง

การศึกษาพฤติกรรมและการเลือกแหล่งที่อยู่อาศัยของตะโขงโดย Bezuijen และคณะ (2010) ที่ประเทศมาเลเซีย พบว่าสัตว์เลี้ยงคลานชนิดนี้อาศัยอยู่มากตามบริเวณบึงน้ำจืด แม่น้ำ ไปจนถึงบริเวณปากแม่น้ำและป่าชายเลน โดยในช่วงปี พ.ศ. 2500 พบตะโขงอาศัยอยู่ตามแหล่งน้ำจืดเป็นจำนวนมากที่บริเวณเทือกเขาบาริสัน เขตสุมาตราตะวันออกของประเทศอินโดนีเซีย อย่างไรก็ตามในปัจจุบันกลับพบว่าตะโขงในบริเวณดังกล่าวกลับมีจำนวนลดน้อยลงกว่าร้อยละ 50 จากการถูกล่าและทำลายถิ่นที่อยู่อาศัย

ตะโขงพบมีการกระจายอยู่มากที่บริเวณแหลมมลายู โดยในปัจจุบันพื้นที่ที่ยังคงพบตะโขงอาศัยอยู่ในธรรมชาติ ได้แก่ ประเทศบรูไน อินโดนีเซีย และ รัฐซาราวักและมาเลเซียตะวันออกของประเทศมาเลเซีย ในขณะที่สถานะของตะโขงที่ประเทศเวียดนามและรัฐซาบะห์ของประเทศมาเลเซียนั้นยังคงไม่ทราบแน่ชัด (ภาพที่ 2.4)



ภาพที่ 2.4 สถานะการกระจายพันธุ์ของตะโขงในธรรมชาติ [สีฟ้า: พบตะโขงอาศัยอยู่ตามธรรมชาติ; สีเขียว: มีความเป็นไปได้สูงที่จะสูญพันธุ์ไปจากธรรมชาติ; สีส้ม: สถานะไม่แน่ชัดเนื่องจากขาดข้อมูล; และ สีดำ: สูญพันธุ์ไปแล้วจากธรรมชาติ] (ที่มา: Bezuijen et al., 2014)

สำหรับสถานะของตะโขงในประเทศไทยนั้น Bezuijen และคณะ (2014) ได้ระบุไว้อย่างชัดเจนว่าสูญพันธุ์ไปแล้วจากธรรมชาติ เนื่องจากขาดหลักฐานการปรากฏของตะโขงในประเทศไทย โดยพบเพียงหลักฐานจากรายงานการสำรวจประชากรตะโขงของ Smith (1916) และครั้งล่าสุดของ Taylor (1970) เท่านั้น อย่างไรก็ตามในความเป็นจริงยังคงมีรายงานการพบตะโขงจากชาวบ้านท้องถิ่นในหลายพื้นที่ อาทิ ปากน้ำเพชรบุรี จังหวัดเพชรบุรี, เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าสิรินธร (ป่าพรุโต๊ะแดง) (สุธิดา พฤษ์อุดม, 2555) และ ฝายเก็บกักน้ำคลองอุป อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี (วรรณ อภิบาลศรี, 2550, อ้างถึงใน MGR Online (นามแฝง), 2550) เป็นต้น

2.1.5 สถานะการอนุรักษ์ตะโขง

ในปัจจุบันสหภาพระหว่างประเทศเพื่อการอนุรักษ์ธรรมชาติ หรือ IUCN ได้ประเมินและกำหนดให้ตะโขงเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีสถานะการอนุรักษ์อยู่ในกลุ่มสิ่งมีชีวิตที่เกือบอยู่ในข่ายใกล้การสูญพันธุ์ (vulnerable: VU) อันได้แก่สิ่งมีชีวิตที่มีสถานะเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์จากธรรมชาติในอนาคตภายใต้ดัชนีบัญชีแดงไอยูซีเอ็น (IUCN Red List) เนื่องจากมีการประมาณจำนวนของตะโขงวัยโตเต็มวัยทั่วโลกแล้วพบว่ามีความอยู่ในช่วง 2,500–10,000 ตัว (Bezuijen et al., 2014) นอกจากนี้ตะโขงยังมีรายชื่ออยู่ในอนุสัญญาว่าด้วยการค้าระหว่างประเทศชนิดสัตว์ป่าและพืชป่าที่ใกล้สูญพันธุ์ในบัญชีรายชื่อหมายเลขหนึ่ง (Appendix I) กล่าวคือห้ามล่าหรือค้าโดยเด็ดขาด เว้นแต่เป็นไปเพื่อการศึกษาวิจัย ซึ่งต้องได้รับคำยินยอมจากประเทศที่จะนำเข้าเสียก่อน ประเทศต้นทางจึงจะออกใบอนุญาตส่งออกได้ อีกทั้งยังต้องคำนึงถึงความอยู่รอดของชนิดพันธุ์สิ่งมีชีวิตนั้น ๆ ด้วย

จากสถานการณ์ของตะโขงที่กล่าวมา หน่วยงานภาครัฐของประเทศมาเลเซียและอินโดนีเซียได้ร่วมมือกันก่อตั้งโครงการซึ่งมีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มจำนวนตะโขงในธรรมชาติและป้องกันไม่ให้ตะโขงสูญพันธุ์ โครงการดังกล่าวสามารถเพิ่มจำนวนตะโขงในธรรมชาติของทั้งสองประเทศได้ แต่ถึงกระนั้นรายงานจำนวนตะโขงที่เพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยนี้ ก็ได้ส่งผลให้การล่าและทำร้ายตะโขงในธรรมชาติโดยชาวบ้านที่อาศัยอยู่ในบริเวณใกล้เคียงเพิ่มขึ้นเนื่องจากความกลัวและความไม่เข้าใจ (Rachmawan and Brend, 2009) อย่างไรก็ตามยังมีองค์กร Ironwood Foundation ที่เป็นอีกกำลังหลักในการอนุรักษ์และรักษาพื้นที่ชุ่มน้ำบริเวณกาลิมันตัน ตะวันออก ซึ่งเป็นที่อยู่อาศัยหลักของตะโขงในประเทศอินโดนีเซียอีกด้วย (Stuebing, 2013)

ในประเทศไทย หน่วยงานภาครัฐและองค์กรเอกชนหลายองค์กรได้มีความพยายามในการเพาะพันธุ์ตะโขงในสถานเพาะเลี้ยง เพื่อป้องกันไม่ให้ตะโขงสูญพันธุ์ไปจากประเทศไทยอย่างแท้จริง โดยศูนย์เพาะเลี้ยงที่ประสบความสำเร็จของประเทศไทยมีเพียง 2 แห่งด้วยกัน คือ ฟาร์มจระเข้สมุทรปราการ (อมร พุทธสัมมา, 2558, อ้างถึงใน อานนท์ มุ่งลิ้ม, 2558) ที่ประสบความสำเร็จในการฟักตะโขงเป็นแห่งแรกของโลกเมื่อปี พ.ศ. 2548 ก่อนที่จะมีการเคลื่อนย้ายตะโขงพ่อพันธุ์-แม่พันธุ์มาเพาะเลี้ยงต่อที่บริษัทปัญญาฟาร์ม กำแพงแสน จำกัด ในปัจจุบัน และ สวนสัตว์นครราชสีมา ภายใต้โครงการเพาะขยายพันธุ์ตะโขงนอกถิ่นอาศัย ในพื้นที่สวนสัตว์นครราชสีมาที่ประสบความสำเร็จในการเพาะพันธุ์ตะโขงเป็นแห่งที่สองของประเทศไทยในปี พ.ศ. 2562 ที่ผ่านมา (พิทักษ์ อุณซอณ, 2562, อ้างถึงใน โปสต์ทูเดย์ (นามแฝง), 2562) ถึงกระนั้นยังคงมีข้อกังวลหลายประการที่ยังต้องพิจารณา ทั้งในด้านจำนวนรวมที่ต่ำมากของลูกตะโขงที่ศูนย์อนุรักษ์ในประเทศไทยสามารถฟักได้ในแต่ละปี รวมไปถึงการเฝ้าระวังต่อปัญหาการลดลงของความหลากหลายทางพันธุกรรมของตะโขงที่อาจเกิดขึ้นได้ในอนาคต เนื่องจากจำนวนพ่อพันธุ์-แม่พันธุ์ที่มีอยู่อย่างจำกัดอีกด้วย

2.1.6 การจัดจำแนกตะโขง

โดยทั่วไปการระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตในกลุ่มจระเข้สามารถทำได้โดยการใช้รูปวิธาน (pictorial key) ผ่านการเปรียบเทียบความเหมือนของตัวอย่างกับภาพของตะโขงตัวต้นแบบ หรือการใช้ dichotomous key ตามคู่มือในการจัดจำแนกจระเข้ที่ได้มีการเผยแพร่ เช่น The Identification of Living Crocodylian (Brazaitis, 1973) ซึ่งเป็นวิธีการที่อาศัยความแตกต่างของลักษณะรูปร่างหรือสัณฐานวิทยาของจระเข้แต่ละชนิด ทำให้สามารถจัดจำแนกตะโขงได้จากลักษณะภายนอก โดยตะโขงจะมีสัณฐานวิทยาที่เฉพาะ กล่าวคือ ปากที่มีลักษณะยาวเรียววางตัวขนานกันทั้งสองด้าน และมีความยาวเป็น 3.0–3.5 เท่าของความกว้างของฐานกะโหลก นอกจากนี้ที่ปลายจมูกของตะโขงจะไม่มีก้อนเนื้อพิเศษ บริเวณกลางลำตัวจะพบแผ่นเกล็ดขนาดใหญ่บนหลังซึ่งมีลักษณะยื่นยาวลงมาที่ด้านข้างของลำตัว โดยด้านข้างของลำตัวแต่ละข้างจะมีแถวของเกล็ดขนาดใหญ่ 6–8 อัน เรียงตัวอยู่ และพบมีพังผืดระหว่างนิ้ว ยิ่งไปกว่านั้นเรายังสามารถจัดจำแนกตะโขงโดยใช้สัณฐานวิทยาของฟัน กล่าวคือ การมีตำแหน่งของ mandibular symphysis ที่ฟันซี่ที่ 14–15 และมีรูปแบบของฟัน (dental formula) ดังนี้ $\frac{4-6 + 15-16}{19-20}$ หรือ $\frac{20-21}{19-20}$

อย่างไรก็ตามการระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตด้วยวิธีการเหล่านี้จะไม่สามารถทำได้เลย หากผู้ทำการจัดจำแนกไม่ได้ครอบครองตัวอย่าง หรืออยู่ในสถานการณ์ที่ขาดหลักฐานหรือรูปถ่ายของตัวอย่างที่ชัดเจน รวมไปถึงข้อจำกัดของตัวอย่างที่ไม่อยู่ในสภาพสมบูรณ์ที่สามารถใช้เพื่อระบุความแตกต่างของรูปร่างได้ เช่น พบการค้ำเนื้อและชิ้นส่วนของสัตว์ป่าอย่างผิดกฎหมาย ทำให้ไม่สามารถใช้การจัดจำแนกสิ่งมีชีวิตโดยอาศัยลักษณะภายนอกหรือสัณฐานวิทยาระบุชนิดสิ่งมีชีวิตที่สนใจจากหลักฐานที่มีอยู่ได้เลย ด้วยเหตุนี้ความรู้ทางด้านอนุชีววิทยาจึงเข้ามามีบทบาทสำคัญในการพัฒนาเครื่องมือชนิดใหม่เพื่อช่วยในการจัดจำแนกสิ่งมีชีวิต อย่างเช่น ดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA barcode) ที่สามารถใช้จำแนกสิ่งมีชีวิตได้โดยอาศัยความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์แทนการใช้สัณฐานวิทยา ทำให้สามารถระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตได้ แม้จะตกอยู่ภายใต้ข้อจำกัดต่าง ๆ ตามที่กล่าวมา

ในปัจจุบันนักชีววิทยาส่วนใหญ่นิยมระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตโดยใช้การจัดจำแนกจากลักษณะภายนอก เนื่องจากเป็นวิธีที่ทำได้สะดวก รวดเร็ว และสามารถทำได้ทันทีในภาคสนามโดยไม่ต้องอาศัยเครื่องมือในห้องปฏิบัติการ แต่ถึงกระนั้นปัจจัยอันนำมาซึ่งความหลากหลายทางชีวภาพของสิ่งมีชีวิตก็มิได้ถูกจำกัดอยู่แต่เพียงความหลากหลายทางสัณฐานวิทยาเท่านั้น หากแต่ยังคงรวมไปถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมซึ่งเป็นรากฐานของความหลากหลายทางสัณฐานที่เรามองเห็นจากภายนอกอีกประการหนึ่งด้วย และจะมีเพียงการนำเอาความรู้ทางอนุชีววิทยาเข้ามาประยุกต์ใช้เท่านั้นที่จะสามารถตรวจจับความแปรผันของสิ่งมีชีวิตอันลงลึกไปถึงระดับพันธุกรรมได้ อีกทั้งยังสามารถนำเอาความแตกต่างที่พบเหล่านี้ไปใช้ประโยชน์เพื่อการเปรียบเทียบและจัดจำแนกระหว่างสิ่งมีชีวิตทั้งในชนิดเดียวกันและต่างชนิดกันได้ต่อไป ยิ่งไปกว่านั้นข้อมูลทางด้านพันธุกรรมของประชากรตะโขงทั้งในศูนย์อนุรักษ์พันธุ์ตะโขงหรือในธรรมชาติของประเทศไทยพบว่ายังไม่ได้รับการศึกษามากมายนเลย การศึกษาทางด้านพันธุกรรมของตะโขงในประเทศไทยจึงเป็นสิ่งที่มีความจำเป็นอย่างยิ่ง เพื่อให้ได้มาซึ่งองค์ความรู้ที่ครบถ้วนสมบูรณ์ ถูกต้อง และครอบคลุมในทุกมิติ อันจะเป็นการเติมเต็มข้อมูลที่ขาดหายไปของสัตว์เลื้อยคลานที่ควรค่าแก่การอนุรักษ์ของชาติชนิดนี้ให้คงอยู่กับประเทศสืบไป

2.2 ดีเอ็นเอบาร์โค้ด

ดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA barcode) คือ แนวคิดในการศึกษาทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต โดยอาศัยความสามารถในการจัดเรียงตัวของลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้ง 4 ชนิดคือ A (adenine), T (thymine), C (cytosine) และ G (guanine) ในรูปแบบที่แตกต่างกัน และส่งผลให้เกิดความหลากหลายทางพันธุกรรมของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความจำเพาะต่อสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด โดยรูปแบบที่แตกต่างกันเหล่านี้เปรียบเสมือนเป็นบาร์โค้ด (barcode) ของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด (สิรินารถ ชัยชนะทอง และคณะ, 2561) เปรียบเสมือนบาร์โค้ดของสินค้าในห้างสรรพสินค้าที่เมื่อตรวจสอบแล้ว สามารถระบุได้ว่าเป็นสินค้าชนิดใด

แนวคิดเรื่องดีเอ็นเอบาร์โค้ดนี้ถูกนำเสนอโดย Hebert และคณะในปี ค.ศ. 2003 และเริ่มต้นโครงการที่มีชื่อว่า The Barcode of Life ซึ่งมีจุดมุ่งหมายในการสร้างเครื่องมือที่เป็นสากลสำหรับการระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตพวงยูแคริโอต โดยอาศัยข้อมูลทางชีววิทยาระดับโมเลกุล และจัดทำฐานข้อมูล The Barcode of Life Data System (BOLD) ด้วยความร่วมมือของ 150 สถาบันจาก 45 ประเทศทั่วโลก ก่อนที่จะมีการพัฒนา

เป็นโครงการ International Barcode of Life project (iBOL) ซึ่งมีจุดมุ่งหมายที่จะจัดทำฐานข้อมูลของสิ่งมีชีวิตให้ได้ 2.5 ล้านชนิดภายในปี พ.ศ. 2569 (โครงการ วนิชาชีวะ, 2555; International Barcode of Life, 2019)

สุชาดา สุขหรั่ง (2553) ได้ระบุคุณสมบัติหลักของบริเวณดีเอ็นเอที่เหมาะสมสำหรับการใช้เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดไว้ด้วยกัน 3 ข้อ คือ

(1) เป็นบริเวณดีเอ็นเอช่วงสั้น ๆ ที่มีขนาดประมาณ 400–800 คู่เบส เพื่อให้ง่ายต่อการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส (polymerase chain reaction: PCR)

(2) เป็นบริเวณดีเอ็นเอที่ต้องมีความแตกต่างทางพันธุกรรม (genetic variability) เหมาะสม กล่าวคือมีความแตกต่างทางพันธุกรรมมากเพียงพอที่จะใช้แยกสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกัน (species) ออกจากกันได้ แต่ต้องมีความแตกต่างภายในชนิด (intraspecific genetic distance) ต่ำมากหรือไม่มีเลย

(3) เป็นดีเอ็นเอที่มีบริเวณขนาบข้างแบบอนุรักษ์ (conserved region) เพื่อเอื้อต่อการใช้เป็นตำแหน่งเข้าเกาะของไพรเมอร์ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของบริเวณดังกล่าว

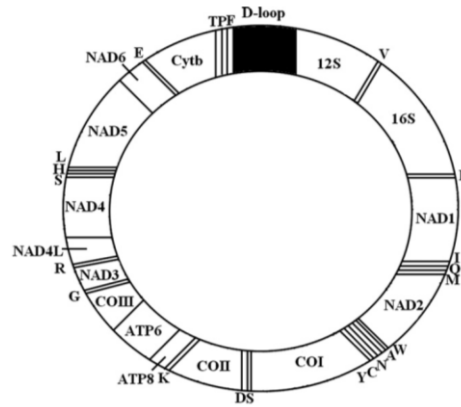
จากการศึกษาบริเวณดีเอ็นเอที่เหมาะสม สำหรับการนำมาใช้เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดของสิ่งมีชีวิตในอาณาจักรสัตว์พบว่า มียีนที่ได้รับความนิยมและใช้ในการศึกษาหลายยีนด้วยกัน อาทิ ยีน cytochrome *b* (cyt-*b*), ยีน NADH dehydrogenase subunit I (NDI) และ ยีน cytochrome *c* oxidase subunit I (COI) เป็นต้น อย่างไรก็ตามการเลือกใช้ยีนเพื่อการศึกษาในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดนั้นขึ้นอยู่กับความสนใจของผู้ทำวิจัย รวมไปถึงความเหมาะสมและผลที่ได้จากการศึกษายีนดังกล่าวต่อสิ่งมีชีวิตชนิดนั้น ๆ อีกด้วย

2.3 ยีน cytochrome *c* oxidase subunit I

ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ (Mitochondrial DNA: mtDNA) เป็นสารพันธุกรรมที่พบในออร์แกเนลล์ไมโทคอนเดรียประกอบไปด้วยยีนหลายยีนด้วยกัน โดยหนึ่งในนั้นก็คือยีน cytochrome *c* oxidase ซึ่งประกอบไปด้วย 3 หน่วยย่อย (subunit) ได้แก่ cytochrome *c* oxidase subunit I (COI), cytochrome *c* oxidase subunit II (COII) และ cytochrome *c* oxidase subunit III (COIII)

ยีน COI นี้ มีบทบาทในการกำหนดการสร้างโปรตีน ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่แทรกอยู่บนเยื่อหุ้มชั้นในของไมโทคอนเดรียที่บริเวณ complex IV และเกี่ยวข้องกับกระบวนการเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนในกระบวนการ oxidative phosphorylation ทำหน้าที่รับอิเล็กตรอนจากคอมเพล็กซ์ต่าง ๆ และส่งต่อให้ออกซิเจนเพื่อสร้างเป็นโมเลกุลของน้ำ (สกล สุนันทราภรณ์, 2557; Boore, 1999; Kirkness et al., 2010)

จากการศึกษายีนในไมโทคอนเดรียของตะโขงโดย Janke และคณะ (2005) ทำให้ทราบว่าไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอของตะโขงมีความยาว 16,345 คู่เบส และประกอบด้วยยีนทั้งหมด 37 ยีน โดยยีน COI ในตะโขงพบมีทั้งหมด 3 หน่วยย่อย เช่นเดียวกันและมีรูปแบบการเรียงตัวดังแสดงในภาพที่ 2.5



ภาพที่ 2.5 แผนที่ไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอของตะโขง (*Tomistoma schlegelii*) แสดงตำแหน่งยีน โดยดีเอ็นเอในออร์แกเนลล์นี้มีลักษณะเป็นวงกลมเดี่ยวสายคู่ ขนาดประมาณ 16 กิโลเบส (Man et al., 2011)

2.4 การศึกษาที่เกี่ยวข้องกับตะโขง

2.4.1 การศึกษาที่มีการเผยแพร่ในฐานข้อมูลต่าง ๆ

เมื่อทำการสืบค้นในฐานข้อมูลของ Google Scholar (<https://scholar.google.com>) ด้วยคำว่า *Tomistoma schlegelii* [สืบค้นเมื่อวันที่ 2 เมษายน พ.ศ. 2563] พบว่ามีการศึกษาที่เกี่ยวข้องทั้งหมด 904 ชิ้น ซึ่งส่วนใหญ่เป็นการศึกษาทางด้านวิวัฒนาการของสัตว์ในกลุ่มจระเข้ (Iijima and Kobayashi, 2019; Piras et al., 2010; Roos et al., 2007; Sadleir and Makovicky, 2008; Willis et al., 2007), การศึกษาทางด้านนิเวศวิทยาของตะโขง เช่น การตรวจสอบแหล่งอาศัยในธรรมชาติ การสำรวจจำนวนประชากรตะโขงที่ทำอยู่สม่ำเสมอโดยองค์กรเอกชนของประเทศอินโดนีเซียและรายงานข่าวที่เกี่ยวข้อง เป็นต้น (Bezuijen et al., 2001, 2010; Bonke et al., 2014; Rödder et al., 2010; Stuebing et al., 2006) และ การศึกษาที่เกี่ยวข้องกับระบบสืบพันธุ์ ซึ่งมีจุดมุ่งหมายหลักในการเพาะพันธุ์และอนุรักษ์ตะโขงนอกถิ่นอาศัย (Moore et al., 2020; Murray et al., 2020)

นอกจากนี้เมื่อทำการสืบค้นข้อมูลในฐานข้อมูล PubMed ของศูนย์ข้อมูลเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (National Center for Biotechnology Information: NCBI) ด้วยคำว่า *Tomistoma* [สืบค้นเมื่อวันที่ 2 เมษายน พ.ศ. 2563] พบว่ามีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับตะโขงเผยแพร่อยู่ในฐานข้อมูลทั้งหมด 25 ชิ้น และมีการศึกษาเพียง 11 ชิ้น ที่เป็นการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับอนุชีววิทยาของตะโขง โดยการศึกษา 6 ชิ้น จากทั้งหมดนั้นเป็นงานวิจัยที่มีวัตถุประสงค์เพื่อตอบคำถามเกี่ยวกับวิวัฒนาการของสัตว์เลื้อยคลานในกลุ่มจระเข้ โดยตัวอย่างตะโขงที่ใช้ในการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับตะโขงส่วนใหญ่ นั้น เป็นตัวอย่างที่มีที่มาหลักจากประเทศอินโดนีเซีย และมาเลเซีย และตัวอย่างตะโขงที่อาศัยอยู่ในสวนสัตว์ตามประเทศต่าง ๆ ทั่วโลก ซึ่งมีจำนวนมากที่ไม่สามารถสืบทราบแหล่งที่มาว่าจับมาจากที่ใด ยิ่งไปกว่านั้นในการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับตะโขงทั้งหมดที่พบมีการรายงานผ่านมา มีการศึกษาเพียง 2 ชิ้นเท่านั้นที่ได้ทำการศึกษาในประเทศไทย หรือทำการศึกษาในตัวอย่างตะโขงซึ่งมีถิ่นกำเนิดที่ประเทศไทย (กิริติ กันยา และคณะ, มปป.; ปัญญา ยังประภากร และคณะ, 2555) โดยการศึกษาทั้งสองนั้นเป็นการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงตะโขงในฟาร์มเพาะเลี้ยง

2.4.2 การศึกษาเชิงอนุชีวโมเลกุลของตะโขงโดยใช้ยีน COI เป็นเครื่องหมายโมเลกุล

เมื่อทำการสืบค้นข้อมูลในฐานข้อมูลของศูนย์ข้อมูลเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (NCBI) จนถึงปัจจุบัน [สืบค้นเมื่อวันที่ 1 เมษายน พ.ศ. 2563] พบว่ามีการเผยแพร่ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน COI ของตะโขง *Tomistoma schlegelii* เพียง 3 ชุดข้อมูลเท่านั้น (Janke et al., 2005 [GenBank accession number: NC_011074]; Gilbert et al., 2011 [JN090129]; Yan and Li, 2018 [MH161364]) โดย Janke และคณะ (2005) ได้เผยแพร่ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของตะโขงทั้งเส้น ซึ่งมีความยาวทั้งหมด 16,345 คู่เบส และมีขนาดของยีน COI เท่ากับ 1,584 คู่เบส ในขณะที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหลืออีก 2 สายนั้น เป็นเพียงลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีนนี้ และมีความยาวเพียง 324 และ 209 คู่เบส ตามลำดับ โดยข้อมูลทั้งหมดที่ได้มีการเผยแพร่นั้น ไม่ได้มีการระบุที่มาของตัวอย่างตะโขงว่ามีที่มาจากประเทศหรือภูมิภาคใด เช่นเดียวกัน

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การขออนุมัติการใช้สัตว์ทดลอง

ยื่นเรื่องขออนุมัติการใช้สัตว์ทดลองต่อคณะกรรมการควบคุมดูแลการเลี้ยงสัตว์ทดลองและการใช้สัตว์ทดลองทางวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งมีเลขที่โครงการคือ 1923023 ได้รับการพิจารณาในวันที่ 24 กันยายน พ.ศ. 2562 มีระยะเวลาดำเนินการตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม พ.ศ. 2562 ถึง 31 กรกฎาคม พ.ศ. 2563

3.2 สิ่งมีชีวิตที่ใช้ศึกษา

ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของตะโขงที่มาจาก 1 แหล่งตัวอย่าง ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากร้อยเอก นายแพทย์ปัญญา ยังประภากร ศูนย์ฝึกจับและอบรมวิชาการเพื่อการอนุรักษ์จระเข้ บริษัทปัญญาฟาร์ม กำแพงแสน จำกัด เลขที่ 88 หมู่ 2 ตำบลวังน้ำเขียว อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม ซึ่งมีพ่อ-แม่พันธุ์ต้นกำเนิดจากตะโขงที่จับได้จากธรรมชาติในประเทศไทย

3.3 การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างสารพันธุกรรมของตะโขงจากตัวอย่างเลือดหลังจากการพักของลูกตะโขง จำนวน 20 ตัว รักษาสภาพตัวอย่างในหลอดไมโครเซ็นทริฟิวก์ที่ปราศจากเชื้อขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มีเอทิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 100% จำนวน 11 ตัว และ binding buffer (GC) จากชุดสกัดดีเอ็นเอ AccuPrep® Genomic DNA extraction (BIONEER corp., Republic of Korea, Cat. No. 1405F) จำนวน 9 ตัว โดยร้อยเอก นายแพทย์ปัญญา ยังประภากร และ สัตวแพทย์หญิงจิตราภรณ์ ชาญราชกิจ (ตารางที่ 3.1; ภาพที่ 3.1–3.3) จากนั้นเก็บตัวอย่างไว้ในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 3.1 วันที่เก็บตัวอย่างและรูปแบบน้ำยาที่ใช้รักษาสภาพตัวอย่าง

หมายเลขตัวอย่าง	วันที่เก็บตัวอย่าง	ชนิดของน้ำยาที่ใช้รักษาสภาพ
1	ไม่ได้ระบุวันที่	binding buffer (GC)
2	5 กันยายน พ.ศ. 2562	เอทิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 100%
3	5 กันยายน พ.ศ. 2562	เอทิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 100%
4	6 กันยายน พ.ศ. 2562	เอทิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 100%
5	7 กันยายน พ.ศ. 2562	เอทิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 100%
6	7 กันยายน พ.ศ. 2562	เอทิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 100%
7	8 กันยายน พ.ศ. 2562	เอทิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 100%

ตารางที่ 3.1 (ต่อ) วันที่เก็บตัวอย่างและรูปแบบน้ำยาที่ใช้รักษาสภาพตัวอย่าง

หมายเลขตัวอย่าง	วันที่เก็บตัวอย่าง	ชนิดของน้ำยาที่ใช้รักษาสภาพ
8	8 กันยายน พ.ศ. 2562	เอทิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 100%
9	8 กันยายน พ.ศ. 2562	binding buffer (GC)
10	8 กันยายน พ.ศ. 2562	binding buffer (GC)
11	8 กันยายน พ.ศ. 2562	binding buffer (GC)
12	8 กันยายน พ.ศ. 2562	binding buffer (GC)
13	8 กันยายน พ.ศ. 2562	binding buffer (GC)
14	8 กันยายน พ.ศ. 2562	binding buffer (GC)
15	8 กันยายน พ.ศ. 2562	binding buffer (GC)
16	9 กันยายน พ.ศ. 2562	binding buffer (GC)
17	9 กันยายน พ.ศ. 2562	เอทิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 100%
18	9 กันยายน พ.ศ. 2562	เอทิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 100%
19	9 กันยายน พ.ศ. 2562	เอทิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 100%
20	9 กันยายน พ.ศ. 2562	เอทิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 100%



ภาพที่ 3.1 การฉีกเปลือกไข่ตะโขงที่พร้อมจะฟักออกจากไข่เพื่อช่วยลูกตะโขงให้สามารถฟักออกมาจากไข่ได้อย่างสมบูรณ์



ภาพที่ 3.2 การใช้กรรไกรตัดหลอดเลือดที่เชื่อมระหว่างตัวลูกตะโขงและถุงไข่แดง



ภาพที่ 3.3 การเก็บตัวอย่างเลือดตะโขง โดยการนำหลอดไมโครเซ็นติพิวก์ที่มีน้ำยารักษาสภาพมารองเลือดของลูกตะโขงที่ไหลออกมาจากหลอดเลือดที่ถูกตัด หลังจากการฟีกออกมาจากไข

3.4 การเตรียมไพรเมอร์

3.4.1 การละลายไพรเมอร์

ทำการละลายไพรเมอร์เพื่อให้พร้อมใช้งาน โดยมีขั้นตอนดังนี้

- (1) นำหลอดบรรจุไพรเมอร์ที่ได้รับไปปั่นเหวี่ยงเพื่อให้ไพรเมอร์ตกลงไปอยู่ที่ก้นหลอดบรรจุ
- (2) เติมน้ำกลั่นชนิด molecular grade ปริมาตรตามที่ระบุไว้ที่ข้างหลอดไพรเมอร์ ทำการเคาะ (tap)

หลอดไพรเมอร์เพื่อให้ไพรเมอร์ละลายอย่างสมบูรณ์

- (3) นำหลอดไพรเมอร์ไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว 13,500 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที จะได้ไพรเมอร์ตั้งต้นที่มีความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์
- (4) เก็บรักษาไพรเมอร์ที่ละลายแล้วในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.4.2 การเจือจางไพรเมอร์

ทำการเจือจางไพรเมอร์ให้มีความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ โดยมีขั้นตอนดังนี้

- (1) ดูดไพรเมอร์ตั้งต้นความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ออกมาใส่ในหลอดไมโครเซ็นติพิวก์อีกหลอดที่มีน้ำกลั่นชนิด molecular grade ปริมาตร 90 ไมโครลิตร อยู่ภายใน
- (2) ทำการเคาะหลอดไพรเมอร์ เพื่อให้ไพรเมอร์ผสมเข้ากันดี จะได้ไพรเมอร์ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร
- (3) เก็บรักษาไพรเมอร์ที่เจือจางแล้วในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.5 การสกัดดีเอ็นเอ

แบ่งรูปแบบการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างออกเป็น 2 รูปแบบตามชนิดของน้ำยาที่ใช้รักษาสภาพตัวอย่าง สำหรับตัวอย่างที่เก็บรักษาใน binding buffer (GC) ทำการสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอ AccuPrep® Genomic DNA extraction และสำหรับตัวอย่างที่เก็บรักษาในเอทิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 100% ทำการสกัดดีเอ็นเอด้วยน้ำยาสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป (DNA extraction buffer)

3.5.1 การสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีสกัดดีเอ็นเอของชุด AccuPrep® Genomic DNA extraction

(1) ใส่เอนไซม์ proteinase K ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงในหลอดไมโครเซ็นติพิวก์ที่มีตัวอย่างเลือดตะโงซึ่งทำการรักษาสภาพไว้ใน binding buffer (GC) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นทำการบ่ม (incubate) หลอดไมโครเซ็นติพิวก์ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อย่อยโปรตีน

(2) เติม isopropanol ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้วทำการผสมสารในหลอดไมโครเซ็นติพิวก์ให้เป็นเนื้อเดียวกัน เทสารผสมในหลอดลงไปในเส้นใยแก้ว (glass fiber) ของ binding column ที่อยู่ในหลอดไมโครเซ็นติพิวก์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เนื่องจากตัวอย่างมีลักษณะเป็นเมือกเหนียว จึงนำหลอดไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที เพื่อช่วยให้ตัวอย่างผ่าน binding column ลงมาได้ดีขึ้น จากนั้นย้าย binding column ไปประกอบใส่ลงในหลอดไมโครเซ็นติพิวก์หลอดใหม่

(3) เติมน้ำยา W1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงในหลอด binding column แล้วปิดฝา จากนั้นนำหลอดไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายที่ไหลผ่าน binding column ลงมาในหลอดไมโครเซ็นติพิวก์ด้านล่างทิ้ง

(4) เติมน้ำยา W2 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงในหลอด binding column จากนั้นนำหลอดไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที อีกครั้ง เทสารละลายที่ไหลผ่าน binding column ลงมาในหลอดไมโครเซ็นติพิวก์ด้านล่างทิ้ง

(5) นำหลอดไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้ binding column แห้ง จากนั้นย้าย binding column ไปประกอบใส่ลงในหลอดไมโครเซ็นติพิวก์หลอดใหม่

(6) ละลายดีเอ็นเอที่ติดอยู่ที่เส้นใยแก้วด้วยการเติม elution buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ที่บริเวณกึ่งกลางของเส้นใยแก้ว ตั้งหลอดทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที

(7) นำหลอดไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำ binding column ออกจากหลอดไมโครเซ็นติพิวก์เพื่อนำไปทิ้ง

(8) เก็บรักษาตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดแล้วไว้ในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.5.2 การสกัดดีเอ็นเอด้วยน้ำยาสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป

(1) ใช้เครื่องเขย่า (vortex mixer) ผสมตัวอย่างเลือดภายในหลอดไมโครเซ็นติพิวก์ที่เก็บรักษาสภาพไว้ในเอทิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 100% ให้รวมเป็นเนื้อเดียวกัน

(2) ปิเปตต์ตัวอย่างขึ้นมา 20 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดพีซีอาร์ผนังบาง (thin-wall PCR tube) ขนาด 0.2 มิลลิลิตร จากนั้นนำหลอดไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,500 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที

(3) ปิเปตต์เอทิลแอลกอฮอล์ที่อยู่ชั้นบนออกให้หมด

(4) เติมน้ำยาสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป (DNA extraction buffer) ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ลงในหลอด

(5) นำหลอดตัวอย่างไปบ่มในเครื่อง T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Inc.) ภายใต้สภาวะดังนี้

- 1) บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 นาที
 - 2) บ่มที่อุณหภูมิ 98 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที
 - 3) ลดอุณหภูมิลงที่ 25 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำตัวอย่างออกจากเครื่อง
- (6) เก็บรักษาตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดแล้วไว้ในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.6 การหาสภาวะที่เหมาะสมของการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

ทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสม (optimal condition) ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (polymerase chain reaction: PCR) โดยการนำตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเป็นแม่พิมพ์ (template) เพื่อเพิ่มปริมาณยีน cytochrome c oxidase subunit I (COI) ซึ่งเป็นยีนที่สนใจ โดยใช้ไพรเมอร์ไปข้างหน้า (forward primer) และไพรเมอร์ถอยกลับ (reverse primer) ที่ออกแบบใหม่ในการศึกษาครั้งนี้ (ตารางที่ 3.2) และมีรูปแบบการเข้าเกาะกับยีน COI ดังภาพที่ 3.4 จากนั้นตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาด้วยวิธี agarose gel electrophoresis รวมทั้งสภาวะที่เหมาะสมเพื่อใช้เป็นสภาวะในการทำปฏิกิริยากับตัวอย่างอื่น ๆ ต่อไป

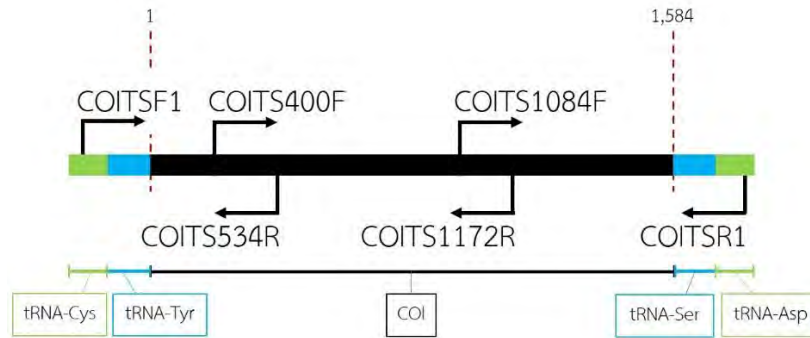
ตารางที่ 3.2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับเพิ่มปริมาณและหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ในการศึกษาครั้งนี้

ไพรเมอร์	ทิศทาง	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'-3')	ตำแหน่งที่ไพรเมอร์เข้าเกาะ
COITSF1	ไปข้างหน้า	5'-TTCGYCGTGAATTTCACTACA-3'	42-62 ¹
COITS400F	ไปข้างหน้า	5'-GGAAACCTAGCCCACGC-3'	400-416 ²
COITS534R	ถอยกลับ	5'-TTGTGAYATTGCTGGKGGTTT-3'	534-514 ²
COITS1084F	ไปข้างหน้า	5'-TCACTAGACATTATTCTCCACGA-3'	1084-1106 ²
COITS1172R	ถอยกลับ	5'-CTTATRATKCGAATACTGC-3'	1172-1153 ²
COITSR1	ถอยกลับ	5'-CCTATATTYCGCCCTTGAC-3'	51-33 ³

¹ ยีน tRNA-Cys

² ยีน cytochrome c oxidase subunit I (COI)

³ ยีน tRNA-Asp



ภาพที่ 3.4 ตำแหน่งของไพรเมอร์ที่เข้าเกาะกับยีน cytochrome c oxidase subunit I (COI) ของตะโขงซึ่งมีความยาว 1,584 คู่เบส ลูกศรในภาพแสดงทิศทางการวิ่งของไพรเมอร์

3.6.1 การหาอุณหภูมิสำหรับการเข้าเกาะระหว่างไพรเมอร์กับยีน COI ที่เหมาะสม

ทดสอบหาอุณหภูมิสำหรับการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสในขั้นตอนที่ไพรเมอร์จะเข้าเกาะกับยีน COI หรือที่เรียกว่า annealing temperature ที่เหมาะสม โดยเปรียบเทียบอุณหภูมิในช่วง 47.0–62.0 องศาเซลเซียส โดยใช้ตัวอย่างตะโขงหมายเลข 9 เป็นแม่พิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA template) และน้ำยาพีซีอาร์สำเร็จรูป OnePCR™ Supermix (GeneDireX, Taiwan) ภายใต้สภาวะในการทำปฏิกิริยาดังต่อไปนี้ (ตารางที่ 3.3)

ตารางที่ 3.3 สภาวะในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสสำหรับการหาอุณหภูมิสำหรับการเข้าเกาะระหว่างไพรเมอร์กับยีน COI ที่เหมาะสม

รายการ	ปริมาณ (ไมโครลิตร)
1. สารละลายแม่พิมพ์ดีเอ็นเอ	0.50
2. OnePCR™ Supermix (1.1X)	9.00
3. forward primer: COITSF1 ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์	0.25
4. reverse primer: COITSR1 ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์	0.25
ปริมาตรสุทธิ	10.00

ผสมสารต่าง ๆ ในหลอดพีซีอาร์ผนังบางขนาด 0.2 มิลลิลิตร จากนั้นนำหลอดที่ผสมสารต่าง ๆ เรียบร้อยแล้วใส่ลงในเครื่อง T100™ Thermal Cycler โดยใช้โปรแกรม TS1 และตั้งค่าให้เครื่องทำการไล่ระดับอุณหภูมิที่ใช้ในขั้นตอน annealing โดยอัตโนมัติ ซึ่งจะได้อุณหภูมิสำหรับการทดสอบทั้งหมด 8 อุณหภูมิ ได้แก่ 47.0, 48.0, 49.8, 52.7, 56.2, 58.9, 60.8 และ 62.0 องศาเซลเซียส

โปรแกรม TS1

40 รอบ	{	(1) heat	94 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 5 นาที
		(2) denaturation step	94 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 1 นาที
		(3) annealing step	47–62 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 1 นาที
		(4) extension step	72 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 2 นาที

- (5) final extension step 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
 (6) hold step 25 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำปฏิกิริยาออกจากเครื่อง

3.6.2 การหาความเข้มข้นของแม่พิมพ์ดีเอ็นเอที่เหมาะสม

ทดสอบหาความเข้มข้นของแม่พิมพ์ดีเอ็นเอที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาแลงซ์พอลิเมอเรส โดยใช้ตัวอย่างตะโงงหมายเลข 9, 10, 14 และ 16 ตัวอย่างละ 3 ความเข้มข้น ได้แก่ 2 เท่า, 4 เท่า และ 6 เท่า ร่วมกับน้ำยาพีซีอาร์สำเร็จรูป OnePCR Plus™ Supermix (GeneDireX, Taiwan) ภายใต้สภาวะในการทำปฏิกิริยาดังต่อไปนี้ (ตารางที่ 3.4)

ตารางที่ 3.4 สภาวะในการทำปฏิกิริยาแลงซ์พอลิเมอเรสสำหรับการหาความเข้มข้นของแม่พิมพ์ดีเอ็นเอที่เหมาะสม

รายการ	ปริมาณ (ไมโครลิตร)		
	ความเข้มข้น เป็น 2 เท่า	ความเข้มข้น เป็น 4 เท่า	ความเข้มข้น เป็น 6 เท่า
1. สารละลายแม่พิมพ์ดีเอ็นเอ	1.0	2.0	3.0
2. OnePCR Plus™ Supermix (2X)	5.0	5.0	5.0
3. forward primer: COITSF1 ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์	0.5	0.5	0.5
4. reverse primer: COITSR1 ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์	0.5	0.5	0.5
5. น้ำกลั่นชนิด molecular grade	3.0	2.0	1.0
ปริมาณสุทธิ	10.0	10.0	10.0

ผสมสารต่าง ๆ ลงในหลอดพีซีอาร์ผนังบางขนาด 0.2 มิลลิลิตร จากนั้นนำหลอดที่เติมสารต่าง ๆ เรียบร้อยจำนวนทั้งหมด 12 หลอด ใส่ลงในเครื่อง T100™ Thermal Cycler โดยใช้โปรแกรม TS2 ที่กำหนดอุณหภูมิในขั้น annealing ที่ 58 องศาเซลเซียส

โปรแกรม TS2

- 40 รอบ {
- (1) heat 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที
- (2) denaturation step 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที
- (3) annealing step 58 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที
- (4) extension step 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที
- (5) final extension step 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
- (6) hold step 25 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำปฏิกิริยาออกจากเครื่อง

3.6.3 การหาชนิดของน้ำยาพีซีอาร์สำเร็จรูปที่เหมาะสม

ทดสอบหาชนิดของน้ำยาพีซีอาร์สำเร็จรูป (PCR master mix) ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้ตัวอย่างตะโขงหมายเลข 9 และ 11 เป็นแม่พิมพ์ดีเอ็นเอ และทำการทดสอบน้ำยาทั้งหมด 5 ยี่ห้อ ได้แก่

- (1) OnePCR™ Supermix (GeneDireX, Taiwan)
- (2) OnePCR Plus™ Supermix (GeneDireX, Taiwan)
- (3) MyTaq™ HS Red Mix (BIOLINE, United Kingdom)
- (4) GeNei™ PCR Master Mix (GeNei, India)
- (5) EmeraldAmp™ GT PCR Master Mix (Takara Bio Inc., Japan)

ภายใต้สภาวะในการทำปฏิกิริยาดังต่อไปนี้ (ตารางที่ 3.5 และ 3.6)

ตารางที่ 3.5 สภาวะในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสสำหรับการหาชนิดของน้ำยาพีซีอาร์สำเร็จรูปที่เหมาะสม เมื่อน้ำยามีความเข้มข้นเป็น 1.1X

รายการ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
1. สารละลายแม่พิมพ์ดีเอ็นเอ	0.50
2. PCR master mix (1.1X)	9.00
3. forward primer: COITSF1 ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์	0.25
4. reverse primer: COITSR1 ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์	0.25
5. น้ำกลั่นชนิด molecular grade	-
ปริมาตรสุทธิ	10.00

ตารางที่ 3.6 สภาวะในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสสำหรับการหาชนิดของน้ำยาพีซีอาร์สำเร็จรูปที่เหมาะสม เมื่อน้ำยามีความเข้มข้นเป็น 2X

รายการ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
1. สารละลายแม่พิมพ์ดีเอ็นเอ	0.5
2. PCR master mix (2X)	5.0
3. forward primer: COITSF1 ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์	0.5
4. reverse primer: COITSR1 ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์	0.5
5. น้ำกลั่นชนิด molecular grade	3.5
ปริมาตรสุทธิ	10.0

นำหลอดพีซีอาร์ผนังบางขนาด 0.2 มิลลิลิตร ที่เติมสารต่าง ๆ เรียบร้อยจำนวนทั้งหมด 10 หลอด ใส่ลงในเครื่อง T100™ Thermal Cycler โดยใช้โปรแกรม TS2

3.7 การทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันภายใต้สภาวะที่เหมาะสม

นำตัวอย่างดีเอ็นเอของตะโขงที่สกัดได้มาใช้เป็นแม่พิมพ์ (template) สำหรับการเพิ่มจำนวนยีน COI ซึ่งเป็นยีนที่สนใจ ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันภายใต้สภาวะที่เหมาะสมตามที่ได้ทดสอบในขั้นตอนก่อนหน้า (อธิบายรายละเอียดในหัวข้อที่ 3.7.1) ซึ่งจะได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สนใจขนาดประมาณ 1,800 คู่เบส จากนั้นนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ไปทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันด้วยเทคนิค semi-nested PCR (อธิบายรายละเอียดในหัวข้อที่ 3.7.2) โดยในการทำ semi-nested PCR สำหรับหนึ่งตัวอย่างจะต้องทำปฏิกิริยาจำนวน 2 ชุดด้วยกัน และจะได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สนใจ 2 ชิ้น ขนาดประมาณชิ้นละ 1,200 คู่เบส หลังการทำปฏิกิริยาเสร็จแล้ว จะตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis และส่งผลิตภัณฑ์ไปวิเคราะห์เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป

3.7.1 การทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน

นำตัวอย่างดีเอ็นเอของตะโขงที่สกัดได้ทั้งหมดมาใช้เป็นแม่พิมพ์ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันเพื่อเพิ่มจำนวนยีน COI โดยใช้รีเอเจนต์ MyTaq™ HS Red Mix ด้วยเครื่อง T100™ Thermal Cycler ซึ่งตั้งโปรแกรม TS2 ภายใต้สภาวะในการทำปฏิกิริยาดังต่อไปนี้ (ตารางที่ 3.7)

ตารางที่ 3.7 สภาวะในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันสำหรับตัวอย่างตะโขงที่ได้รับจากบริษัทปัญญาฟาร์ม กำแพงแสน จำกัด

รายการ	ปริมาณ (ไมโครลิตร)
1. สารละลายแม่พิมพ์ดีเอ็นเอ	2.0
2. MyTaq™ HS Red Mix (2X)	20.0
3. forward primer: COITSF1 ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์	2.0
4. reverse primer: COITSR1 ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์	2.0
5. น้ำกลั่นชนิด molecular grade	14.0
ปริมาณสุทธิ	40.0

3.7.2 การทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันด้วยเทคนิค semi-nested PCR

เจือจางผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันในข้อ 3.7.1 ด้วยการเติมน้ำกลั่นชนิด molecular grade ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ต่อผลิตภัณฑ์ที่ได้จากข้อ 3.7.1 ปริมาตร 5 ไมโครลิตร จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่เจือจางแล้วมาใช้เป็นแม่พิมพ์ดีเอ็นเอสำหรับการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันอีกครั้งเพื่อเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของยีน COI ด้วยเทคนิค semi-nested PCR และรีเอเจนต์ MyTaq™ HS Red Mix โดยในแต่ละตัวอย่างจะทำปฏิกิริยาทั้งหมด 2 ชุดต่อตัวอย่าง และให้สภาวะในการทำปฏิกิริยาดังต่อไปนี้ (ตารางที่ 3.8 และ 3.9)

ตารางที่ 3.8 สภาวะในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันด้วยเทคนิค semi-nested PCR ชุดที่ 1 เพื่อเพิ่มชิ้นส่วนยีน COI ทางด้าน 5' หรือ ประมาณ 1,200 คู่เบสแรก

รายการ	ปริมาณ (ไมโครลิตร)
1. สารละลายแม่พิมพ์ดีเอ็นเอ	3.0
2. MyTaq™ HS Red Mix (2X)	20.0
3. forward primer: COITSF1 ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์	3.0
4. reverse primer: COITS1172R ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์	3.0
5. น้ำกลั่นชนิด molecular grade	11.0
ปริมาตรสุทธิ	40.0

ตารางที่ 3.9 สภาวะในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันด้วยเทคนิค semi-nested PCR ชุดที่ 2 เพื่อเพิ่มชิ้นส่วนยีน COI ทางด้าน 3' หรือ ประมาณ 1,200 คู่เบสหลัง

รายการ	ปริมาณ (ไมโครลิตร)
1. สารละลายแม่พิมพ์ดีเอ็นเอ	3.0
2. MyTaq™ HS Red Mix (2X)	20.0
3. forward primer: COITS400F ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์	3.0
4. reverse primer: COITSR1 ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์	3.0
5. น้ำกลั่นชนิด molecular grade	11.0
ปริมาตรสุทธิ	40.0

นำหลอดพีซีอาร์ผนังบางขนาด 0.2 ไมโครลิตร ที่เติมสารทุกอย่างเรียบร้อยแล้วใส่ลงในเครื่อง T100™ Thermal Cycler ซึ่งตั้งโปรแกรม EM45-50 ไว้

โปรแกรม EM45-50

	(1) heat	95 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 3 นาที
5 รอบ ครบแล้วเข้าสู่ ขั้นตอนที่ (5)	(2) denaturation step 1	95 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 30 วินาที
	(3) annealing step 1	45 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 1 นาที
	(4) extension step 1	72 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 1:30 นาที
	(5) denaturation step 2	95 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 30 วินาที
35 รอบ	(6) annealing step 2	50 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 1 นาที
	(7) extension step 2	72 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 1:30 นาที
	(8) final extension step	72 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 10 นาที
	(9) hold step	25 องศาเซลเซียส	จนกว่าจะนำปฏิกิริยาออกจากเครื่อง

3.8 การตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันที่ได้ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis

ทำการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันด้วยวิธี agarose gel electrophoresis ตามขั้นตอนต่อไปนี้

(1) เตรียมบัฟเฟอร์อะกาโรสความเข้มข้น 0.8% โดยใช้ผงบัฟเฟอร์อะกาโรส 1.2 กรัม ต่อบัฟเฟอร์ที่เออี (Tris-acetate-EDTA: TAE buffer) 150 มิลลิลิตร ใส่ผงบัฟเฟอร์และบัฟเฟอร์ลงในขวดแก้วทนความร้อน อุณหภูมิอะกาโรสให้เดือดด้วยการนำไปให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟ ตวงบัฟเฟอร์ที่ละลายแล้วปริมาตร 17 มิลลิลิตร ด้วยกระบอกตวงทนความร้อนที่สะอาด

(2) ใช้ปิเปตต์ดูดสีย้อม RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution (iNtRON Bio, South Korea) แล้วผสมกับบัฟเฟอร์อะกาโรสในกระบอกตวง โดยใช้แผ่นพาราฟิล์มพันปิดปากกระบอกตวง แล้วพลิกกระบอกตวงกลับไปมาเพื่อให้สีย้อมและบัฟเฟอร์อะกาโรสผสมเข้าเป็นเนื้อเดียวกัน

(3) ติดตั้งแม่พิมพ์แผ่นวุ้นของเครื่อง Horizon® 58 (LIFE TECHNOLOGIES™) ให้เรียบร้อย จากนั้นเทบัฟเฟอร์อะกาโรสลงในแม่พิมพ์ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนแผ่นวุ้นแข็งตัว จากนั้นจึงแกะแม่พิมพ์ออก

(4) เทบัฟเฟอร์ที่เออีลงในเครื่อง Horizon® 58 จนท่วมแผ่นวุ้น

(5) ปิเปตต์ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ต้องการตรวจสอบใส่ลงในช่องของแผ่นวุ้นช่องละ 1 ตัวอย่าง จากนั้นปิเปตต์ molecular marker ชนิด 1 kb (New England Biolabs, USA) หรือ molecular marker 1 kb plus (Invitrogen, USA) ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ลงในช่องของแผ่นวุ้น 1 ช่อง เพื่อใช้เป็นตัวเปรียบเทียบกับขนาดของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ต้องการจะตรวจสอบ

(6) ต่อดวงจรไฟฟ้าเข้ากับเครื่อง Horizon® 58 โดยตั้งค่าแรงเคลื่อนไฟฟ้าที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 25 นาที และทำการเปิดกระแสไฟฟ้า

(7) เมื่อครบกำหนดเวลา นำแผ่นวุ้นออกจากเครื่อง และตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันภายใต้แสงยูวี พร้อมบันทึกภาพตัวอย่าง

3.9 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์

ส่งผลิตภัณฑ์จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันที่ได้ไปยังบริษัท U2Bio เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ที่ต้องการ ด้วยเทคนิค normal automatic sequencing โดยการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์แต่ละปฏิกิริยาจะใช้ไพรเมอร์ปฏิกิริยาละ 1 ชนิด ที่ตำแหน่งต่าง ๆ กัน

สำหรับตัวอย่างตะโขงหนึ่งตัว เมื่อทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันด้วยเทคนิค semi-nested PCR เสร็จแล้วจะมีชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สนใจ 2 ชิ้น มีขนาดชิ้นละประมาณ 1,200 คู่เบส ซึ่งจะทำให้การอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ขั้นละ 3 ปฏิกิริยา โดยชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาชุดที่ 1 จะทำการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยไพรเมอร์ COITSF1, COITS534R และ COITS1172R สำหรับชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาชุดที่ 2 จะใช้ไพรเมอร์ COITS400F, COITS1084F และ COITSR1 (ตารางที่ 3.2) เพื่อให้ได้ลำดับเบสคู่สมทั้งด้านไปและด้านกลับของยีนครบทั้งเส้น

3.10 การวิเคราะห์ความแปรผันทางพันธุกรรมของตะโขง

(1) ทำการรวมลำดับนิวคลีโอไทด์ของตะโขงแต่ละตัวอย่างที่ได้จากการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ในข้อ 3.9 ไว้ให้เป็นเส้นเดียวกันที่สมบูรณ์ จากนั้นจัดเรียง (align) และตรวจทานความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ ด้วยโปรแกรม BioEdit เวอร์ชัน 7.2.5 (Hall, 1999)

(2) ทำการเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ด้วยโปรแกรม Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Boratyn et al., 2019) เพื่อเลือกลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมาะสมสำหรับการสร้างชุดข้อมูล (dataset) จำนวนทั้งหมด 5 ชุด ด้วยโปรแกรม Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) เวอร์ชัน X (Kumar et al., 2018) ดังนี้

- 1) ชุดข้อมูลที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ที่สมบูรณ์ตลอดทั้งสาย จำนวนทั้งหมด 3 เส้น ซึ่งประกอบด้วย
 - 1) ลำดับนิวคลีโอไทด์จากตัวอย่างตะโขงในศูนย์เพาะเลี้ยงที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ จำนวน 2 เส้น
 - 2) ลำดับนิวคลีโอไทด์จากตัวอย่างตะโขงที่มีอยู่ในฐานข้อมูลของศูนย์ข้อมูลเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (National Center for Biotechnology Information: NCBI) จำนวน 1 เส้น
- 2) ชุดข้อมูลที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI บางส่วน (partial gene) จำนวนทั้งหมด 5 เส้น ซึ่งประกอบด้วย
 - 1) ลำดับนิวคลีโอไทด์จากตัวอย่างตะโขงในศูนย์เพาะเลี้ยงที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ จำนวน 2 เส้น
 - 2) ลำดับนิวคลีโอไทด์จากตัวอย่างตะโขงทั้งหมดที่มีอยู่ในฐานข้อมูลของ NCBI จำนวน 3 เส้น
- 3) ชุดข้อมูลที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ที่สมบูรณ์ตลอดทั้งสาย จำนวนทั้งหมด 15 เส้น ซึ่งประกอบด้วย
 - 1) ลำดับนิวคลีโอไทด์จากตัวอย่างตะโขงในศูนย์เพาะเลี้ยงที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ จำนวน 2 เส้น
 - 2) ลำดับนิวคลีโอไทด์จากตัวอย่างตะโขงที่มีอยู่ในฐานข้อมูลของ NCBI จำนวน 1 เส้น
 - 3) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของสัตว์เลื้อยคลานในอันดับ Crocodylia ชนิดอื่น ๆ ที่มีอยู่ในฐานข้อมูลของ NCBI ชนิดละ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ จำนวนทั้งหมด 12 เส้น
- 4) ชุดข้อมูลที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI เฉพาะบริเวณดีเอ็นเอบาร์โค้ด จำนวนทั้งหมด 15 เส้น ซึ่งประกอบด้วย
 - 1) ลำดับนิวคลีโอไทด์จากตัวอย่างตะโขงในศูนย์เพาะเลี้ยงที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ จำนวน 2 เส้น
 - 2) ลำดับนิวคลีโอไทด์จากตัวอย่างตะโขงที่มีอยู่ในฐานข้อมูลของ NCBI จำนวน 1 เส้น
 - 3) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของสัตว์เลื้อยคลานในอันดับ Crocodylia ชนิดอื่น ๆ ที่มีอยู่ในฐานข้อมูลของ NCBI ชนิดละ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ จำนวนทั้งหมด 12 เส้น

หมายเหตุ: ชุดข้อมูลที่ 4 คือ ชุดข้อมูลที่ 3 ที่เลือกเฉพาะบริเวณดีเอ็นเอบาร์โค้ดเท่านั้น

5) ชุดข้อมูลที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI เฉพาะบริเวณดีเอ็นเอบาร์โค้ด จำนวนทั้งหมด 45 เส้น และทำการจัดกลุ่มข้อมูลออกเป็น 19 กลุ่ม ตามชนิดของสิ่งมีชีวิต ซึ่งประกอบด้วย

- 1) ลำดับนิวคลีโอไทด์จากตัวอย่างตะโขงในศูนย์เพาะเลี้ยงที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ จำนวน 2 เส้น (1 กลุ่ม)
- 2) ลำดับนิวคลีโอไทด์จากตัวอย่างตะโขงที่มีอยู่ในฐานข้อมูลของ NCBI จำนวน 1 เส้น (1 กลุ่ม)
- 3) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของสัตว์เลื้อยคลานในอันดับ Crocodylia ชนิดอื่น ๆ ทั้งหมดที่มีอยู่ในฐานข้อมูลของ NCBI จำนวนทั้งหมด 42 เส้น (17 กลุ่ม ตามชนิดของสิ่งมีชีวิต)

(3) ทำการวิเคราะห์ความแปรผันทางพันธุกรรม (genetic variation analysis) ของชุดข้อมูลข้างต้น โดยการคำนวณหาจำนวนตำแหน่งของนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกัน (number of nucleotide difference) และ ค่าเปอร์เซ็นต์ความห่างทางพันธุกรรมระหว่างนิวคลีโอไทด์เปรียบเทียบเป็นคู่ (pairwise genetic distance) ผ่านการคำนวณความห่างและใช้แบบจำลองการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ (nucleotide substitution model) รวมทั้งหมด 8 ประเภท ดังนี้ *p*-distance, Jukes-Cantor (Jukes and Cantor, 1969), Kimura two-parameter (Kimura, 1980), Tajima-Nei (Tajima and Nei, 1984), Tamura 3-parameter (Tamura, 1992), Tamura-Nei (Tamura and Nei, 1993), Maximum composite likelihood (Tamura et al, 2004) และ LogDet (Tamura and Kumar, 2002) ด้วยโปรแกรม MEGA X จากนั้นทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความห่างทางพันธุกรรมที่ได้จากการคำนวณเพื่อพิจารณาความเหมาะสมของดีเอ็นเอบาร์โค้ดที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้

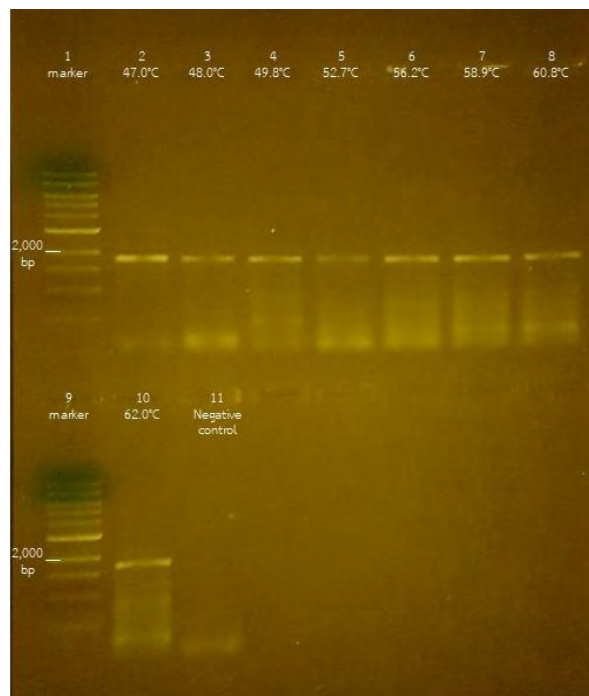
บทที่ 4

ผลการศึกษา

4.1 การหาสภาวะที่เหมาะสมของการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

4.1.1 การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเข้าเกาะระหว่างไพรเมอร์กับยีน cytochrome c oxidase subunit I (COI)

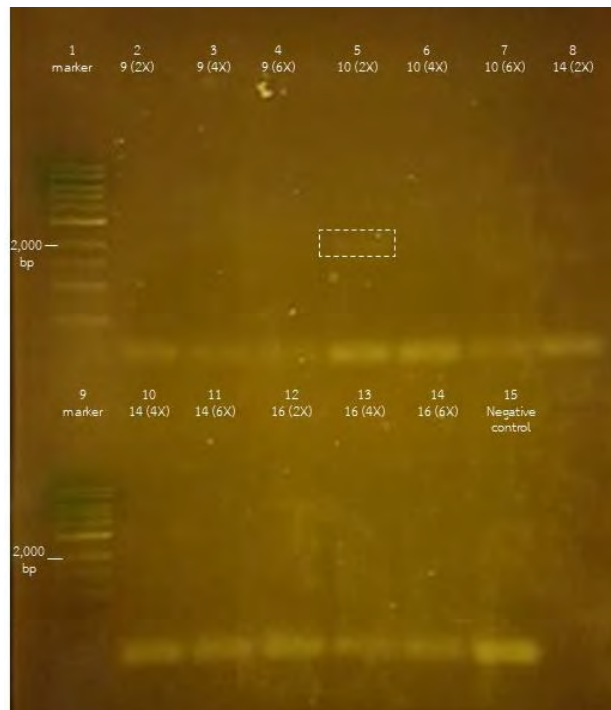
ตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณยีน COI ภายใต้สภาวะในการทำปฏิกิริยาตามตารางที่ 3.3 เพื่อทำการทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเข้าเกาะระหว่างไพรเมอร์ COITSF1 และ COITSR1 กับยีน COI หรือ annealing temperature ทั้งหมด 8 อุณหภูมิ ได้แก่ 47.0, 48.0, 49.8, 52.7, 56.2, 58.9, 60.8 และ 62.0 องศาเซลเซียส โดยใช้ดีเอ็นเอจากตัวอย่างตะโขงหมายเลข 9 เป็นแม่พิมพ์ จากการศึกษาพบว่ามีแถบของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาดประมาณ 1,800 คู่เบส เกิดขึ้นในทุก annealing temperature ที่ทำการศึกษา (ภาพที่ 4.1) โดยผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ทำที่ annealing temperature ที่ 48.0 และ 52.7 องศาเซลเซียสจะพบมีสีจางกว่าที่อุณหภูมิอื่น



ภาพที่ 4.1 แผ่นวุ้นอะกาโรสแสดงการตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีน COI ขนาดประมาณ 1,800 คู่เบส โดยใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอของตะโขงหมายเลข 9 เป็นแม่พิมพ์ เพื่อหาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเข้าเกาะระหว่างไพรเมอร์ COITSF1 และ COITSR1 กับยีน COI [ช่องที่ 1 และ 9: molecular marker ชนิด 1 kb; ช่องที่ 2–8 และ 10: ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ทำปฏิกิริยาด้วย annealing temperature ที่ 47.0, 48.0, 49.8, 52.7, 56.2, 58.9, 60.8 และ 62.0 องศาเซลเซียส ตามลำดับ; และช่องที่ 11: negative control]

4.1.2 การหาความเข้มข้นของแม่พิมพ์ดีเอ็นเอที่เหมาะสม

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณยีน COI ภายใต้สภาวะในการทำปฏิกิริยาตามตารางที่ 3.4 เพื่อทำการทดสอบหาความเข้มข้นของแม่พิมพ์ดีเอ็นเอที่เหมาะสม โดยใช้ดีเอ็นเอจากตัวอย่างตะโขงหมายเลข 9, 10, 14 และ 16 ตัวอย่างละ 3 ความเข้มข้น ได้แก่ 2 เท่า, 4 เท่า และ 6 เท่า เป็นแม่พิมพ์ ร่วมกับไพรเมอร์ COITSF1–COITSR1 จากการศึกษาพบว่า มีแถบของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาดประมาณ 1,800 คู่เบส เกิดขึ้นเพียง 1 แถบ กล่าวคือ ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการใช้ตัวอย่างตะโขงหมายเลข 10 เป็นแม่พิมพ์ดีเอ็นเอ และมีความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอเป็น 2X (ภาพที่ 4.2)

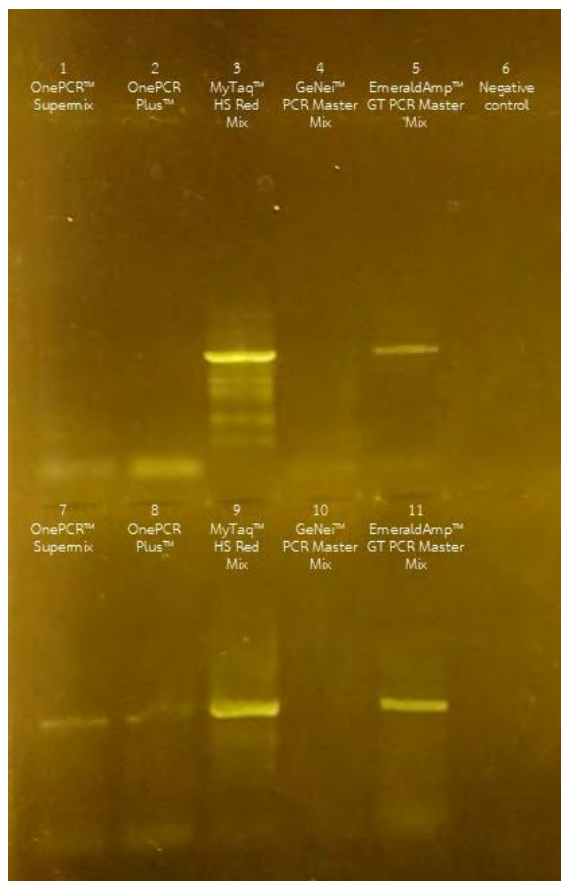


ภาพที่ 4.2 แผ่นวุ้นอะกาโรสแสดงการตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีน COI ขนาดประมาณ 1,800 คู่เบส โดยใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอของตะโขงหมายเลข 9 (ช่องที่ 2–4), หมายเลข 10 (ช่องที่ 5–7), หมายเลข 14 (ช่องที่ 8 และ 10–11) และ หมายเลข 16 (ช่องที่ 12–14) เป็นแม่พิมพ์ และไพรเมอร์ COITSF1–COITSR1 เพื่อหาความเข้มข้นของแม่พิมพ์ดีเอ็นเอที่เหมาะสม [ช่องที่ 1 และ 9: molecular marker ชนิด 1 kb; ช่องที่ 2, 5, 8 และ 12: ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่มีความเข้มข้นของแม่พิมพ์ดีเอ็นเอเป็น 2X; ช่องที่ 3, 6, 10 และ 13: ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่มีความเข้มข้นของแม่พิมพ์ดีเอ็นเอเป็น 4X; ช่องที่ 4, 7, 11 และ 14: ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่มีความเข้มข้นของแม่พิมพ์ดีเอ็นเอเป็น 6X; และช่องที่ 15: negative control]

4.1.3 การหาชนิดของน้ำยาพีซีอาร์สำเร็จรูปที่เหมาะสม

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณยีน COI ภายใต้สภาวะในการทำปฏิกิริยาตามตารางที่ 3.5 และ 3.6 โดยใช้ดีเอ็นเอจากตัวอย่างตะโขงหมายเลข 9 และ 11 เป็นแม่พิมพ์ ร่วมกับไพรเมอร์ COITSF1–COITSR1 เพื่อหาชนิดของน้ำยาพีซีอาร์สำเร็จรูป (PCR master mix) ที่เหมาะสม โดยใช้น้ำยา

ทั้งหมด 5 ชนิด ได้แก่ OnePCR™ Supermix, OnePCR Plus™ Supermix, MyTaq™ HS Red Mix, GeNei™ PCR Master Mix และ EmeraldAmp™ GT PCR Master Mix จากการศึกษพบว่า มีแถบของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาดประมาณ 1,800 คู่เบส เกิดขึ้นเมื่อใช้น้ำยาพีซีอาร์สำเร็จรูปยี่ห้อ MyTaq™ HS Red Mix และ EmeraldAmp™ GT PCR Master Mix ในการทำปฏิกิริยาในทั้งสองตัวอย่าง (ภาพที่ 4.3) โดยแถบของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากน้ำยาพีซีอาร์สำเร็จรูปยี่ห้อ MyTaq™ HS Red Mix จะมีความเข้มและชัดเจนมากที่สุด นอกจากนี้ยังปรากฏแถบของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จาง ๆ ของตัวอย่างตะโงงหมายเลข 11 เมื่อใช้น้ำยาพีซีอาร์สำเร็จรูปยี่ห้อ OnePCR™ Supermix และ OnePCR Plus™ Supermix ในขณะที่น้ำยาพีซีอาร์สำเร็จรูปยี่ห้อ GeNei™ PCR Master Mix ไม่ปรากฏแถบของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์เมื่อทำปฏิกิริยาด้วยตัวอย่างใดเลย (ภาพที่ 4.3)

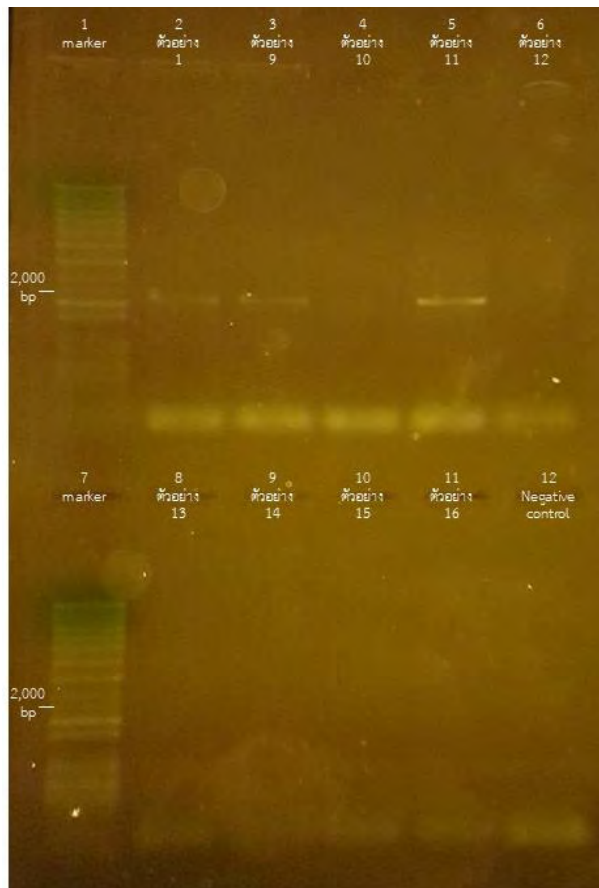


ภาพที่ 4.3 แผ่นวุ้นอะกาโรสแสดงการตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีน COI ขนาดประมาณ 1,800 คู่เบส โดยใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอของตะโงงหมายเลข 9 (ช่องที่ 1–5) และ หมายเลข 11 (ช่องที่ 7–11) เป็นแม่พิมพ์ และไพรเมอร์ COITSF1–COTSR1 เพื่อหาน้ำยาพีซีอาร์สำเร็จรูปที่เหมาะสม [ช่องที่ 1 และ 7: ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ทำปฏิกิริยาด้วยน้ำยา OnePCR™ Supermix; ช่องที่ 2 และ 8: น้ำยา OnePCR Plus™ Supermix; ช่องที่ 3 และ 9: น้ำยา MyTaq™ HS Red Mix; ช่องที่ 4 และ 10: น้ำยา GeNei™ PCR Master Mix; ช่องที่ 5 และ 11: น้ำยา EmeraldAmp™ GT PCR Master Mix; และช่องที่ 6 negative control] หมายเหตุ: ไม่ได้มีการใส่ molecular marker เนื่องจากความผิดพลาดของผู้ศึกษา

4.2 การทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรสึภายใต้สภาวะที่เหมาะสม

4.2.1 การทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรสึ

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาเพื่อเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของยีน COI ภายใต้สภาวะในการทำปฏิกิริยาตามตารางที่ 3.7 โดยใช้ดีเอ็นเอจากตัวอย่างตะโขงหมายเลข 1 และ 9-16 ร่วมกับไพรเมอร์ COITSF1-COITSR1 จากการศึกษาพบว่า มีแถบของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์เกิดขึ้นในปฏิกิริยาที่ใช้ดีเอ็นเอของตัวอย่างตะโขงหมายเลข 1, 9 และ 11 เป็นแม่พิมพ์ และได้ผลิตภัณฑ์ความยาวประมาณ 1,800 คู่เบส (ภาพที่ 4.4)

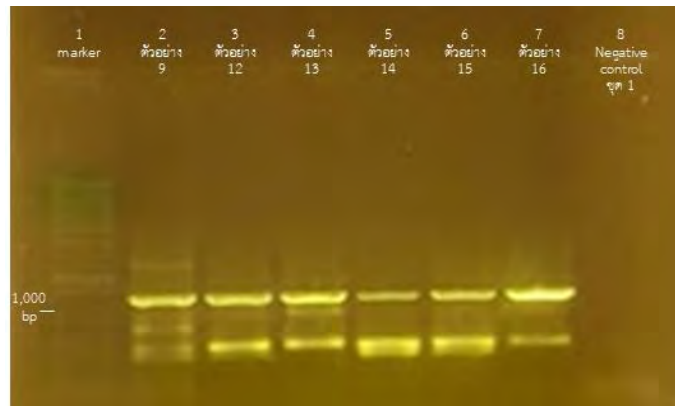


ภาพที่ 4.4 แผ่นวุ้นอะกาโรสแสดงการตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีน COI ขนาดประมาณ 1,800 คู่เบส ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมด้วยไพรเมอร์ COITSF1 และ COITSR1 [ช่องที่ 1 และ 7: molecular marker ชนิด 1 kb plus; ช่องที่ 2-6 และ 8-11: ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ทำปฏิกิริยาโดยใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอของตะโขงหมายเลข 1, 9-16 เป็นแม่พิมพ์ ตามลำดับ; และช่องที่ 12: negative control]

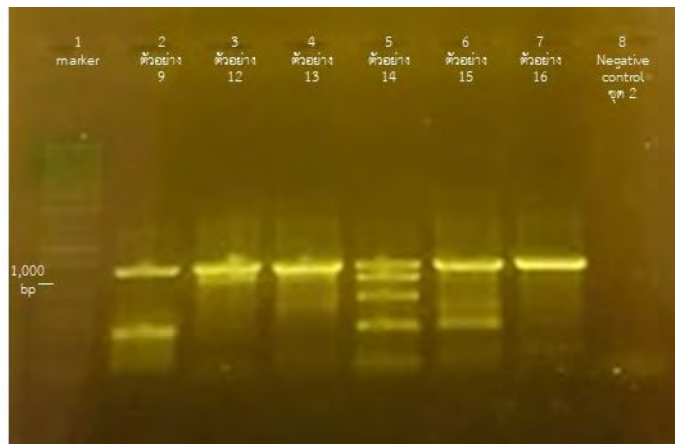
4.2.2 การทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรสึด้วยเทคนิค semi-nested PCR

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์เพื่อเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของยีน COI ด้วยเทคนิค semi-nested PCR ภายใต้สภาวะในการทำปฏิกิริยาตามตารางที่ 3.8 (คู่ไพรเมอร์ COITSF1 และ COITS1172R) และ 3.9 (คู่ไพรเมอร์ COITS400F และ COITSR1) โดยใช้ดีเอ็นเอจากตัวอย่างตะโขงหมายเลข 9 และ 12-16 เป็นแม่พิมพ์

จากการศึกษาพบว่าเกิดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาดความยาวประมาณ 1,200 คู่เบส เมื่อทำปฏิกิริยาด้วยไพรเมอร์ทั้งสองชุด (ภาพที่ 4.5 และ 4.6)



ภาพที่ 4.5 แผ่นวุ้นอะกาโรสแสดงการตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีน COI ขนาดประมาณ 1,200 คู่เบส ด้วยเทคนิค semi-nested PCR และคู่ไพรเมอร์ COITSF1-COITS1172R [ช่องที่ 1: molecular marker ชนิด 1 kb plus; ช่องที่ 2-7: ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ทำปฏิกิริยาโดยใช้ดีเอ็นเอของตัวอย่างตะโขงหมายเลข 9, 12-16 เป็นแม่พิมพ์ ตามลำดับ; และช่องที่ 8: negative control]



ภาพที่ 4.6 แผ่นวุ้นอะกาโรสแสดงการตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีน COI ขนาดประมาณ 1,200 คู่เบส ด้วยเทคนิค semi-nested PCR และไพรเมอร์ COITS400F-COITSR1 [ช่องที่ 1: molecular marker ชนิด 1 kb plus; ช่องที่ 2-7: ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ทำปฏิกิริยาโดยใช้ดีเอ็นเอของตัวอย่างตะโขงหมายเลข 9, 12-16 เป็นแม่พิมพ์ ตามลำดับ; และช่องที่ 8: negative control]

4.3 การวิเคราะห์ความแปรผันทางพันธุกรรมของตะโขง

การทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรสเพื่อเพิ่มจำนวนยีน COI ของตัวอย่างตะโขงที่ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัทปัญญาฟาร์ม กำแพงแสน จำกัด ซึ่งมีพ่อ-แม่พันธุ์ต้นกำเนิดจากตะโขงที่จับได้จากธรรมชาติในประเทศไทย ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ที่สมบูรณ์ตลอดทั้งสาย (complete gene) จำนวนทั้งหมด 2

ตัวอย่าง จากนั้นทำการวิเคราะห์ความแปรผันทางพันธุกรรมของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน COI โดยการสร้างชุดข้อมูลจำนวนทั้งหมด 5 ชุด ดังนี้

- (1) ชุดข้อมูลที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ที่สมบูรณ์ตลอดทั้งสาย จำนวนทั้งหมด 3 เส้น ซึ่งประกอบด้วย
 - 1) ลำดับนิวคลีโอไทด์จากตัวอย่างตะโขงในศูนย์เพาะเลี้ยงที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ จำนวน 2 เส้น
 - 2) ลำดับนิวคลีโอไทด์จากตัวอย่างตะโขงที่มีอยู่ในฐานข้อมูลของศูนย์ข้อมูลเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (National Center for Biotechnology Information: NCBI) จำนวน 1 เส้น
- (2) ชุดข้อมูลที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI บางส่วน (partial gene) จำนวนทั้งหมด 5 เส้น ซึ่งประกอบด้วย
 - 1) ลำดับนิวคลีโอไทด์จากตัวอย่างตะโขงในศูนย์เพาะเลี้ยงที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ จำนวน 2 เส้น
 - 2) ลำดับนิวคลีโอไทด์จากตัวอย่างตะโขงทั้งหมดที่มีอยู่ในฐานข้อมูลของ NCBI จำนวน 3 เส้น
- (3) ชุดข้อมูลที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ที่สมบูรณ์ตลอดทั้งสาย จำนวนทั้งหมด 15 เส้น ซึ่งประกอบด้วย
 - 1) ลำดับนิวคลีโอไทด์จากตัวอย่างตะโขงในศูนย์เพาะเลี้ยงที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ จำนวน 2 เส้น
 - 2) ลำดับนิวคลีโอไทด์จากตัวอย่างตะโขงที่มีอยู่ในฐานข้อมูลของ NCBI จำนวน 1 เส้น
 - 3) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของสัตว์เลื้อยคลานในอันดับ Crocodylia ชนิดอื่น ๆ ที่มีอยู่ในฐานข้อมูลของ NCBI ชนิดละ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ จำนวนทั้งหมด 12 เส้น
- (4) ชุดข้อมูลที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI เฉพาะบริเวณดีเอ็นเอบาร์โค้ด จำนวนทั้งหมด 15 เส้น ซึ่งประกอบด้วย
 - 1) ลำดับนิวคลีโอไทด์จากตัวอย่างตะโขงในศูนย์เพาะเลี้ยงที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ จำนวน 2 เส้น
 - 2) ลำดับนิวคลีโอไทด์จากตัวอย่างตะโขงที่มีอยู่ในฐานข้อมูลของ NCBI จำนวน 1 เส้น
 - 3) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของสัตว์เลื้อยคลานในอันดับ Crocodylia ชนิดอื่น ๆ ที่มีอยู่ในฐานข้อมูลของ NCBI ชนิดละ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ จำนวนทั้งหมด 12 เส้น

หมายเหตุ: ชุดข้อมูลที่ 4 คือ ชุดข้อมูลที่ 3 ที่เลือกเฉพาะบริเวณดีเอ็นเอบาร์โค้ดเท่านั้น
- (5) ชุดข้อมูลที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI เฉพาะบริเวณดีเอ็นเอบาร์โค้ด จำนวนทั้งหมด 45 เส้น และทำการจัดกลุ่มข้อมูลออกเป็น 19 กลุ่ม ตามชนิดของสิ่งมีชีวิต ซึ่งประกอบด้วย
 - 1) ลำดับนิวคลีโอไทด์จากตัวอย่างตะโขงในศูนย์เพาะเลี้ยงที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ จำนวน 2 เส้น (1 กลุ่ม)

- 2) ลำดับนิวคลีโอไทด์จากตัวอย่างตะโขงที่มีอยู่ในฐานข้อมูลของ NCBI จำนวน 1 เส้น (1 กลุ่ม)
- 3) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของสัตว์เลื้อยคลานในอันดับ Crocodylia ชนิดอื่น ๆ ทั้งหมดที่มีอยู่ในฐานข้อมูลของ NCBI จำนวนทั้งหมด 42 เส้น (17 กลุ่ม ตามชนิดของสิ่งมีชีวิต)

ทำการวิเคราะห์ความแปรผันทางพันธุกรรม (genetic variation analysis) ของชุดข้อมูลข้างต้น โดยการคำนวณหาจำนวนตำแหน่งของนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกัน (number of nucleotide difference) และค่าเปอร์เซ็นต์ความห่างทางพันธุกรรมระหว่างนิวคลีโอไทด์เปรียบเทียบเป็นคู่ (pairwise genetic distance) ผ่านการคำนวณความห่างและใช้แบบจำลองการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ (nucleotide substitution model) รวมทั้ง 8 ประเภท ดังนี้ p -distance, Jukes-Cantor, Kimura two-parameter, Tajima-Nei, Tamura 3-parameter, Tamura-Nei, Maximum composite likelihood และ LogDet จากนั้นทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความห่างทางพันธุกรรมที่ได้จากการคำนวณเพื่อพิจารณาความเหมาะสมของดีเอ็นเอบาร์โค้ดที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้

4.3.1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน cytochrome c oxidase subunit I (COI) ของตะโขง

จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันภายใต้สภาวะที่เหมาะสมได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีน COI จากตัวอย่างตะโขงทั้งหมด 2 ตัวอย่าง ได้แก่ ตัวอย่างตะโขงหมายเลข 1 [TS01] และ หมายเลข 10 [TS10] ซึ่งมีความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์เส้นละ 1,584 คู่เบส และมีสัดส่วนของเบส A (adenine), C (cytosine), G (guanine) และ T (thymine) เท่ากับ 29.7, 27.3, 15.5 และ 27.5% ตามลำดับ โดยยีน COI จากตัวอย่างตะโขงทั้งสองมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกันตลอดทั้งสาย ดังแสดงด้านล่าง

	10	20	30	40	50	
TS01	GTGAACATTAATCGCTGACTTTTCTCCACCAACCACAAAGACATCGGCAC				
TS10					
	60	70	80	90	100	
TS01	CCTTTACTTTATCTTCGGAGCCTGAGCGGAATAGTTGGAACAGCCCTAA				
TS10					
	110	120	130	140	150	
TS01	GCCTCCTTATTTCGCACAGAACTAAGTCAACCCGGACCCCTCATAGGAGAC				
TS10					
	160	170	180	190	200	
TS01	GACCAAATCTATAATGTTATTGTTACCGCACATGCCTTTATTATGATTTT				
TS10					
	210	220	230	240	250	
TS01	CTTCATAGTAATACCTATTATAATTGGGGGATTTGGAACTGACTACTAC				
TS10					


```

                260      270      280      290      300
TS01  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
TS10  .....

                310      320      330      340      350
TS01  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
TS10  .....

                360      370      380      390      400
TS01  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
TS10  .....

                410      420      430      440      450
TS01  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
TS10  .....

                460      470      480      490      500
TS01  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
TS10  .....

                510      520      530      540      550
TS01  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
TS10  .....

                560      570      580      590      600
TS01  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
TS10  .....

                610      620      630      640      650
TS01  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
TS10  .....

                660      670      680      690      700
TS01  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
TS10  .....

                710      720      730      740      750
TS01  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
TS10  .....

                760      770      780      790      800
TS01  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
TS10  .....

                810      820      830      840      850
TS01  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
TS10  .....

```

```

      860      870      880      890      900
    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
TS01 GTTTCATTGTTTGGAGCTCATCACATATTTACAGTAGGAATAGACGTTGAT
TS10 .....

      910      920      930      940      950
    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
TS01 ACCCGAGCATATTTTACTTCCGCTACAATAGTAATCGCTATCCCCACCGG
TS10 .....

      960      970      980      990     1000
    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
TS01 AGTAAAAGTATTCAGCTGGCTAGCAACAATCTACGGAGGAATTATAAACT
TS10 .....

      1010     1020     1030     1040     1050
    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
TS01 GACAAGCCCCCATACTCTGAGCATTAGGCTTTATTTCTTATTACAGTA
TS10 .....

      1060     1070     1080     1090     1100
    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
TS01 GGAGGACTAACAGGAATCGTCTTAGCCAACCTCATCACTAGACATTATTCT
TS10 .....

      1110     1120     1130     1140     1150
    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
TS01 CCACGACACTTATTACGTAGTAGCACACTTCCACTACGTACTATCAATAG
TS10 .....

      1160     1170     1180     1190     1200
    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
TS01 GGGCAGTATTCGCCATTATAAGTGGATTTACCCACTGGTTCCCCCTATTC
TS10 .....

      1210     1220     1230     1240     1250
    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
TS01 ACAGGATTTACCCTTCACCCAGCATGAACAAAAGCCCAATTGCGCAATCAT
TS10 .....

      1260     1270     1280     1290     1300
    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
TS01 ATTCACAGGAGTAAATCTAACCTTCTTCCCACAACACTTCTTAGGCCTTT
TS10 .....

      1310     1320     1330     1340     1350
    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
TS01 CCGGGATGCCACGACGATATTCAGACTACCCAGACGCATATTCATTCTGA
TS10 .....

      1360     1370     1380     1390     1400
    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
TS01 AATATATTATCATCAATTGGGTCGTTAATTTCTATAGTCTCTGTAATTCT
TS10 .....

      1410     1420     1430     1440     1450
    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
TS01 CCTCATATTCATTGTATGAGAAGCATTCTCTTCAAAAACGTAAAAATTGAGA
TS10 .....

```

```

                1460      1470      1480      1490      1500
TS01  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
TS10  CACCAGAAATAACCATCACAAATATTGAGTGGCTCAACAACCTGCCACCA
                1510      1520      1530      1540      1550
TS01  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
TS10  TCTCACCACACTTACGAAGAACCAGTATTTGTCCAAGCACGGCTAAACC
                1560      1570      1580
TS01  ....|....|....|....|....|....|....|....|
TS10  AACAAAAACCCACCTCCTAACAACAAGGACAGG

```

4.3.2 การวิเคราะห์ความแปรผันทางพันธุกรรมของยีน COI ที่สมบูรณ์ตลอดทั้งสาย ระหว่างตะโขงที่มีถิ่นกำเนิดในประเทศไทยและตะโขงที่มีการเผยแพร่ในฐานข้อมูลของ NCBI

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชุดข้อมูลที่ 1 ซึ่งประกอบไปด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ตลอดทั้งสาย ของตัวอย่างตะโขงในศูนย์เพาะเลี้ยงที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ จำนวน 2 เส้น (ตัวอย่างตะโขงหมายเลข 1 [TS01] และ 10 [TS10]) และตะโขงที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลของ NCBI จำนวน 1 เส้น *Tomistoma schlegelii* [GenBank accession number: NC_011074.1] (Janke et al., 2005) พบว่า มีลำดับนิวคลีโอไทด์ยาวเท่ากันคือ 1,584 คู่เบส โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลมีสัดส่วนของเบส A, C, G และ T เท่ากับ 29.7, 27.2, 15.5 และ 27.6% ตามลำดับ ซึ่งตัวอย่างตะโขงในศูนย์เพาะเลี้ยงมีสัดส่วนของเบส C (27.3%) มากกว่าตะโขงในฐานข้อมูล แต่มีสัดส่วนของเบส T (27.5%) น้อยกว่าในฐานข้อมูล เมื่อทำการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์จากตัวอย่างตะโขงทั้งสองแหล่ง พบว่า มีความเหมือนสูงถึง 99.87% โดยพบตำแหน่งของนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกัน 2 ตำแหน่ง ได้แก่ ตำแหน่งที่ 391 และ 468 โดยตัวอย่างตะโขงที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้มีเบสเป็น C ทั้งสองตำแหน่ง ในขณะที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตะโขงจากฐานข้อมูลมีเบสเป็น G และ T ตามลำดับ ดังแสดงด้านล่าง

```

                360      370      380      390      400
TS01  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
TS10  CATCGAAACTGGGGCTGGAACCGGATGAACAGTCTATCCGCCCTTAGCAG
NC_011074.1  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
                410      420      430      440      450
TS01  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
TS10  GAAACCTAGCCCACGCCGGACCCTCCGTAGACTTAACCATTTTCTCCCTT
NC_011074.1  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
                460      470      480      490      500
TS01  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
TS10  CACCTCGCAGGAGTATCCTCAATCTTAGGGGCAATTAACCTTTATTACCAC
NC_011074.1  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|

```

จากการคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์ความห่างทางพันธุกรรมภายในชนิด (intraspecific genetic distance) ของตะโขงในชุดข้อมูลที่ 1 ด้วย p -distance, Jukes-Cantor, Kimura two-parameter, Tajima-Nei, Tamura 3-parameter, Tamura-Nei และ Maximum composite likelihood ให้ค่าเท่ากับ 0.126% ในขณะที่เมื่อคำนวณด้วย LogDet ให้ค่าสูงขึ้นเท่ากับ 0.135%

4.3.3 การวิเคราะห์ความแปรผันทางพันธุกรรมของยีน COI บางส่วน (partial gene) ระหว่างตะโขงที่มีถิ่นกำเนิดในประเทศไทยและตะโขงทั้งหมดที่มีการเผยแพร่ในฐานข้อมูลของ NCBI

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชุดข้อมูลที่ 2 ซึ่งประกอบไปด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ของตัวอย่างตะโขงในศูนย์เพาะเลี้ยงที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ จำนวน 2 เส้น (ตัวอย่างตะโขงหมายเลข 1 [TS01] และ 10 [TS10]) และ ตะโขงทั้งหมดที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์อยู่ในฐานข้อมูลของ NCBI จำนวน 3 เส้น *T. schlegelii* [NC_011074.1 (ความยาว 1,584 คู่เบส) (Janke et al., 2005), MH161364.1 (209 คู่เบส) (Yan and Li, 2018) และ JN090129.1 (324 คู่เบส) (Gilbert et al., 2011)]

เนื่องจากลำดับนิวคลีโอไทด์ MH161364.1 และ JN090129.1 ไม่มีช่วงของลำดับที่ซ้อนทับกัน ทำให้ไม่สามารถวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชุดข้อมูลที่ 2 ได้พร้อมกันทั้งหมด ดังนั้น จึงสร้างชุดข้อมูลแยกออกจากกันจำนวน 2 ชุดย่อย ชุดละ 4 สาย ซึ่งประกอบไปด้วย 2.1) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ TS01 และ TS10 จำนวน 2 เส้น และ *T. schlegelii* [NC_011074.1 และ MH161364.1] และ 2.2) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ TS01 และ TS10 จำนวน 2 เส้น และ *T. schlegelii* [NC_011074.1 และ JN090129.1] แล้วจึงนำลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดมาเปรียบเทียบเป็นคู่ (pairwise) ในความยาวที่สามารถเปรียบเทียบกันได้แบบ complete deletion

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของชุดข้อมูลที่ 2.1 มาเปรียบเทียบ แล้วคำนวณหาจำนวนตำแหน่งของนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกัน พบค่าความแตกต่างภายในชนิดอยู่ในช่วง 0–3 ตำแหน่ง และมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1.500 ตำแหน่ง (ตารางที่ 4.1) โดยเมื่อทำการคำนวณเปอร์เซ็นต์ความห่างทางพันธุกรรมภายในชนิดได้ค่า p -distance อยู่ในช่วง 0.000–1.435% (เฉลี่ย 0.718%) (ตารางที่ 4.2), Jukes-Cantor ให้ค่า 0.000–1.449% (เฉลี่ย 0.725%) (ตารางที่ 4.3), Kimura two-parameter ให้ค่า 0.000–1.451% (เฉลี่ย 0.726%) (ตารางที่ 4.4), Tajima-Nei ให้ค่า 0.000–1.456% (เฉลี่ย 0.728%) (ตารางที่ 4.5), Tamura 3-parameter ให้ค่า 0.000–1.452% (เฉลี่ย 0.726%) (ตารางที่ 4.6), Tamura-Nei ให้ค่า 0.000–1.458% (เฉลี่ย 0.729%) (ตารางที่ 4.7), Maximum composite likelihood ให้ค่า 0.000–1.458% (เฉลี่ย 0.729%) (ตารางที่ 4.8) และ LogDet ให้ค่า 0.000–1.279% (เฉลี่ย 0.639%) (ตารางที่ 4.9)

หมายเหตุ: ตัวเลขที่แสดงในตารางที่ 4.1–4.9 แทนสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ ดังนี้ 1) *T. schlegelii* (ตัวอย่างตะโขงหมายเลข 1 ข้อมูลที่ได้มาจากการศึกษาในครั้งนี้); 2) *T. schlegelii* (ตัวอย่างตะโขงหมายเลข 10 ข้อมูลที่ได้มาจากการศึกษาในครั้งนี้); 3) *T. schlegelii* [NC_011074.1]; และ 4) *T. schlegelii* [MH161364.1]

ตารางที่ 4.1 ค่าจำนวนตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกันเมื่อเปรียบเทียบเป็นคู่ในความยาวที่สามารถเปรียบเทียบกันได้ ซึ่งคำนวณจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ของตัวอย่างตะโขงที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้และตะโขงที่มีอยู่ในฐานข้อมูลของ NCBI ความยาว 209 และ 1,584 คู่เบส จำนวนทั้งหมด 4 สาย

ชนิด	1	2	3	4
1	-			
2	0	-		
3	0	0	-	
4	3	3	3	-

ตารางที่ 4.2 ค่าเปอร์เซ็นต์ความห่างทางพันธุกรรมเมื่อคำนวณด้วย p -distance และเปรียบเทียบเป็นคู่ในความยาวที่สามารถเปรียบเทียบกันได้จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ของตัวอย่างตะโขงที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้และตะโขงที่มีอยู่ในฐานข้อมูลของ NCBI ความยาว 209 และ 1,584 คู่เบส จำนวนทั้งหมด 4 สาย

ชนิด	1	2	3	4
1	-			
2	0.000	-		
3	0.000	0.000	-	
4	1.435	1.435	1.435	-

ตารางที่ 4.3 ค่าเปอร์เซ็นต์ความห่างทางพันธุกรรมเมื่อคำนวณด้วยแบบจำลอง Jukes-Cantor และเปรียบเทียบเป็นคู่ในความยาวที่สามารถเปรียบเทียบกันได้จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ของตัวอย่างตะโขงที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้และตะโขงที่มีอยู่ในฐานข้อมูลของ NCBI ความยาว 209 และ 1,584 คู่เบส จำนวนทั้งหมด 4 สาย

ชนิด	1	2	3	4
1	-			
2	0.000	-		
3	0.000	0.000	-	
4	1.449	1.449	1.449	-

ตารางที่ 4.4 ค่าเปอร์เซ็นต์ความห่างทางพันธุกรรมเมื่อคำนวณด้วยแบบจำลอง Kimura two-parameter และเปรียบเทียบเป็นคู่ในความยาวที่สามารถเปรียบเทียบกันได้จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ของตัวอย่างตะโขงที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้และตะโขงที่มีอยู่ในฐานข้อมูลของ NCBI ความยาว 209 และ 1,584 คู่เบส จำนวนทั้งหมด 4 สาย

ชนิด	1	2	3	4
1	-			
2	0.000	-		
3	0.000	0.000	-	
4	1.451	1.451	1.451	-

ตารางที่ 4.5 ค่าเปอร์เซ็นต์ความห่างทางพันธุกรรมเมื่อคำนวณด้วยแบบจำลอง Tajima-Nei และเปรียบเทียบเป็นคู่ในความยาวที่สามารถเปรียบเทียบกันได้จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ของตัวอย่างตะโขงที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้และตะโขงที่มีอยู่ในฐานข้อมูลของ NCBI ความยาว 209 และ 1,584 คู่เบส จำนวนทั้งหมด 4 สาย

ชนิด	1	2	3	4
1	-			
2	0.000	-		
3	0.000	0.000	-	
4	1.456	1.456	1.456	-

ตารางที่ 4.6 ค่าเปอร์เซ็นต์ความห่างทางพันธุกรรมเมื่อคำนวณด้วยแบบจำลอง Tamura 3-parameter และเปรียบเทียบเป็นคู่ในความยาวที่สามารถเปรียบเทียบกันได้จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ของตัวอย่างตะโขงที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้และตะโขงที่มีอยู่ในฐานข้อมูลของ NCBI ความยาว 209 และ 1,584 คู่เบส จำนวนทั้งหมด 4 สาย

ชนิด	1	2	3	4
1	-			
2	0.000	-		
3	0.000	0.000	-	
4	1.452	1.452	1.452	-

ตารางที่ 4.7 ค่าเปอร์เซ็นต์ความห่างทางพันธุกรรมเมื่อคำนวณด้วยแบบจำลอง Tamura-Nei และเปรียบเทียบเป็นคู่ในความยาวที่สามารถเปรียบเทียบกันได้จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ของตัวอย่างตะโขงที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้และตะโขงที่มีอยู่ในฐานข้อมูลของ NCBI ความยาว 209 และ 1,584 คู่เบส จำนวนทั้งหมด 4 สาย

ชนิด	1	2	3	4
1	-			
2	0.000	-		
3	0.000	0.000	-	
4	1.458	1.458	1.458	-

ตารางที่ 4.8 ค่าเปอร์เซ็นต์ความห่างทางพันธุกรรมเมื่อคำนวณด้วยแบบจำลอง Maximum composite likelihood และเปรียบเทียบเป็นคู่ในความยาวที่สามารถเปรียบเทียบกันได้จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ของตัวอย่างตะโขงที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้และตะโขงที่มีอยู่ในฐานข้อมูลของ NCBI ความยาว 209 และ 1,584 คู่เบส จำนวนทั้งหมด 4 สาย

ชนิด	1	2	3	4
1	-			
2	0.000	-		
3	0.000	0.000	-	
4	1.458	1.458	1.458	-

ตารางที่ 4.9 ค่าเปอร์เซ็นต์ความห่างทางพันธุกรรมเมื่อคำนวณด้วยแบบจำลอง LogDet และเปรียบเทียบเป็นคู่ในความยาวที่สามารถเปรียบเทียบกันได้จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ของตัวอย่างตะโขงที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้และตะโขงที่มีอยู่ในฐานข้อมูลของ NCBI ความยาว 209 และ 1,584 คู่เบส จำนวนทั้งหมด 4 สาย

ชนิด	1	2	3	4
1	-			
2	0.000	-		
3	0.000	0.000	-	
4	1.279	1.279	1.279	-

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของชุดข้อมูลที่ 2.2 มาเปรียบเทียบ แล้วคำนวณหาจำนวนตำแหน่งของนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกัน พบค่าความแตกต่างภายในชนิดอยู่ในช่วง 0–5 ตำแหน่ง และมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 2.500 ตำแหน่ง (ตารางที่ 4.10) โดยเมื่อทำการคำนวณเปอร์เซ็นต์ความห่างทางพันธุกรรมภายในชนิดได้ค่า p -distance อยู่ในช่วง 0.000–1.543% (เฉลี่ย 0.772%) (ตารางที่ 4.11), Jukes-Cantor ให้ค่า 0.000–1.559% (เฉลี่ย 0.777%) (ตารางที่ 4.12), Kimura two-parameter ให้ค่า 0.000–1.559% (เฉลี่ย 0.777%) (ตารางที่ 4.13), Tajima-Nei ให้ค่า 0.000–1.563% (เฉลี่ย 0.779%) (ตารางที่ 4.14), Tamura 3-parameter ให้ค่า 0.000–1.559% (เฉลี่ย 0.777%) (ตารางที่ 4.15), Tamura-Nei ให้ค่า 0.000–1.562% (เฉลี่ย 0.778%) (ตารางที่ 4.16), Maximum composite likelihood ให้ค่า 0.000–1.561% (เฉลี่ย 0.778%) (ตารางที่ 4.17) และ LogDet ให้ค่า 0.000–1.460% (เฉลี่ย 0.725%) (ตารางที่ 4.18)

หมายเหตุ: ตัวเลขที่แสดงในตารางที่ 4.10–4.18 แทนสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ ดังนี้ 1) *T. schlegelii* (ตัวอย่างตะโขงหมายเลข 1 ข้อมูลที่ได้มาจากการศึกษาในครั้งนี้); 2) *T. schlegelii* (ตัวอย่างตะโขงหมายเลข 10 ข้อมูลที่ได้มาจากการศึกษาในครั้งนี้); 3) *T. schlegelii* [NC_011074.1]; และ 4) *T. schlegelii* [JN090129.1]

ตารางที่ 4.10 ค่าจำนวนตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกันเมื่อเปรียบเทียบเป็นคู่ในความยาวที่สามารถเปรียบเทียบกันได้ ซึ่งคำนวณจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ของตัวอย่างตะโขงที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้และตะโขงที่มีอยู่ในฐานข้อมูลของ NCBI ความยาว 324 และ 1,584 คู่เบส จำนวนทั้งหมด 4 สาย

ชนิด	1	2	3	4
1	-			
2	0	-		
3	2	2	-	
4	3	3	5	-

ตารางที่ 4.11 ค่าเปอร์เซ็นต์ความห่างทางพันธุกรรมเมื่อคำนวณด้วย p -distance และเปรียบเทียบเป็นคู่ในความยาวที่สามารถเปรียบเทียบกันได้จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ของตัวอย่างตะโขงที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้และตะโขงที่มีอยู่ในฐานข้อมูลของ NCBI ความยาว 324 และ 1,584 คู่เบส จำนวนทั้งหมด 4 สาย

ชนิด	1	2	3	4
1	-			
2	0.000	-		
3	0.617	0.617	-	
4	0.926	0.926	1.543	-

ตารางที่ 4.12 ค่าเปอร์เซ็นต์ความห่างทางพันธุกรรมเมื่อคำนวณด้วยแบบจำลอง Jukes-Cantor และเปรียบเทียบเป็นคู่ในความยาวที่สามารถเปรียบเทียบกันได้จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ของตัวอย่างตะโขงที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้และตะโขงที่มีอยู่ในฐานข้อมูลของ NCBI ความยาว 324 และ 1,584 คู่เบส จำนวนทั้งหมด 4 สาย

ชนิด	1	2	3	4
1	-			
2	0.000	-		
3	0.620	0.620	-	
4	0.932	0.932	1.559	-

ตารางที่ 4.13 ค่าเปอร์เซ็นต์ความห่างทางพันธุกรรมเมื่อคำนวณด้วยแบบจำลอง Kimura two-parameter และเปรียบเทียบเป็นคู่ในความยาวที่สามารถเปรียบเทียบกันได้จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ของตัวอย่างตะโขงที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้และตะโขงที่มีอยู่ในฐานข้อมูลของ NCBI ความยาว 324 และ 1,584 คู่เบส จำนวนทั้งหมด 4 สาย

ชนิด	1	2	3	4
1	-			
2	0.000	-		
3	0.620	0.620	-	
4	0.932	0.932	1.559	-

ตารางที่ 4.14 ค่าเปอร์เซ็นต์ความห่างทางพันธุกรรมเมื่อคำนวณด้วยแบบจำลอง Tajima-Nei และเปรียบเทียบเป็นคู่ในความยาวที่สามารถเปรียบเทียบกันได้จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ของตัวอย่างตะโขงที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้และตะโขงที่มีอยู่ในฐานข้อมูลของ NCBI ความยาว 324 และ 1,584 คู่เบส จำนวนทั้งหมด 4 สาย

ชนิด	1	2	3	4
1	-			
2	0.000	-		
3	0.621	0.621	-	
4	0.933	0.933	1.563	-

ตารางที่ 4.15 ค่าเปอร์เซ็นต์ความห่างทางพันธุกรรมเมื่อคำนวณด้วยแบบจำลอง Tamura 3-parameter และเปรียบเทียบเป็นคู่ในความยาวที่สามารถเปรียบเทียบกันได้จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ของตัวอย่างตะโขงที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้และตะโขงที่มีอยู่ในฐานข้อมูลของ NCBI ความยาว 324 และ 1,584 คู่เบส จำนวนทั้งหมด 4 สาย

ชนิด	1	2	3	4
1	-			
2	0.000	-		
3	0.620	0.620	-	
4	0.932	0.932	1.559	-

ตารางที่ 4.16 ค่าเปอร์เซ็นต์ความห่างทางพันธุกรรมเมื่อคำนวณด้วยแบบจำลอง Tamura-Nei และเปรียบเทียบเป็นคู่ในความยาวที่สามารถเปรียบเทียบกันได้จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ของตัวอย่างตะโขงที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้และตะโขงที่มีอยู่ในฐานข้อมูลของ NCBI ความยาว 324 และ 1,584 คู่เบส จำนวนทั้งหมด 4 สาย

ชนิด	1	2	3	4
1	-			
2	0.000	-		
3	0.621	0.621	-	
4	0.932	0.932	1.562	-

ตารางที่ 4.17 ค่าเปอร์เซ็นต์ความห่างทางพันธุกรรมเมื่อคำนวณด้วยแบบจำลอง Maximum composite likelihood และเปรียบเทียบเป็นคู่ในความยาวที่สามารถเปรียบเทียบกันได้จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ของตัวอย่างตะโขงที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้และตะโขงที่มีอยู่ในฐานข้อมูลของ NCBI ความยาว 324 และ 1,584 คู่เบส จำนวนทั้งหมด 4 สาย

ชนิด	1	2	3	4
1	-			
2	0.000	-		
3	0.620	0.620	-	
4	0.933	0.933	1.561	-

ตารางที่ 4.18 ค่าเปอร์เซ็นต์ความห่างทางพันธุกรรมเมื่อคำนวณด้วยแบบจำลอง LogDet และเปรียบเทียบเป็นคู่ในความยาวที่สามารถเปรียบเทียบกันได้จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ของตัวอย่างตะโขงที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้และตะโขงที่มีอยู่ในฐานข้อมูลของ NCBI ความยาว 324 และ 1,584 คู่เบส จำนวนทั้งหมด 4 สาย

ชนิด	1	2	3	4
1	-			
2	0.000	-		
3	0.645	0.645	-	
4	0.801	0.801	1.460	-

4.3.4 การวิเคราะห์ความแปรผันทางพันธุกรรมของยีน COI ระหว่างตะโขงที่มีถิ่นกำเนิดในประเทศไทย, ตะโขงที่มีการเผยแพร่ในฐานข้อมูลของ NCBI และตัวแทนสัตว์เลื้อยคลานในอันดับ Crocodylia ชนิดอื่น ๆ ที่มีการเผยแพร่ในฐานข้อมูลของ NCBI

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชุดข้อมูลที่ 3 ซึ่งประกอบไปด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ตลอดทั้งสาย ของตัวอย่างตะโขงในศูนย์เพาะเลี้ยงที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ จำนวน 2 เส้น (ตัวอย่างตะโขงหมายเลข 1 และ 10), ตะโขงที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลของ NCBI จำนวน 1 เส้น *T. schlegelii* [NC_011074.1] และสัตว์เลื้อยคลานในอันดับ Crocodylia ชนิดอื่น ๆ ที่มีอยู่ในฐานข้อมูลของ NCBI จำนวน 12 เส้น ความยาว 1,555–1,593 คู่เบส โดยนำลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดมาเปรียบเทียบเป็นคู่ (pairwise) ในความยาวที่สามารถเปรียบเทียบกันได้แบบ pairwise deletion แล้วคำนวณหาจำนวนตำแหน่งของนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกัน พบค่าความแตกต่างระหว่างชนิด (interspecific genetic distance) อยู่ในช่วง 0–335 ตำแหน่ง และมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 207.800 ตำแหน่ง (ตารางที่ 4.19) โดยเมื่อทำการคำนวณเปอร์เซ็นต์ความห่างทางพันธุกรรมได้ค่า p -distance อยู่ในช่วง 0.000–21.543% (เฉลี่ย 13.333%) (ตารางที่ 4.20), Jukes-Cantor ให้ค่า 0.000–25.396% (เฉลี่ย 14.932%) (ตารางที่ 4.21), Kimura two-parameter ให้ค่า 0.000–25.852% (เฉลี่ย 15.186%) (ตารางที่ 4.22), Tajima-Nei ให้ค่า 0.000–26.307% (เฉลี่ย 15.390%) (ตารางที่ 4.23), Tamura 3-parameter ให้ค่า 0.000–25.892% (เฉลี่ย 15.214%) (ตารางที่ 4.24), Tamura-Nei ให้ค่า 0.000–26.031% (เฉลี่ย 15.297%) (ตารางที่ 4.25), Maximum composite likelihood ให้ค่า 0.000–26.742% (เฉลี่ย 15.365%) (ตารางที่ 4.26) และ LogDet ให้ค่า 0.000–24.899% (เฉลี่ย 14.852%) (ตารางที่ 4.27)

หมายเหตุ: ตัวเลขที่แสดงในตารางที่ 4.19–4.27 แทนสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ ดังนี้ 1) *T. schlegelii* (ตัวอย่างตะโขงหมายเลข 1 ข้อมูลที่ได้มาจากการศึกษาในครั้งนี้); 2) *T. schlegelii* (ตัวอย่างตะโขงหมายเลข 10 ข้อมูลที่ได้มาจากการศึกษาในครั้งนี้); 3) *T. schlegelii* [NC_011074.1]; 4) *Gavialis gangeticus* [AB079596.1]; 5) *Crocodylus porosus* [NC_008143.1]; 6) *Crocodylus siamensis* [DQ353946.1]; 7) *Crocodylus acutus* [HM636894.1]; 8) *Crocodylus palustris* [GU144286.1]; 9) *Crocodylus*

intermedius [HM636895.1]; 10) *Crocodylus novaeguineae* [HM636896.1]; 11) *Crocodylus moreletii* [HQ585889.1]; 12) *Crocodylus johnsoni* [HM488008.2]; 13) *Alligator sinensis* [AF511507.1]; 14) *Mecistops cataphractus* [EF551000.1]; และ 15) *Osteolaemus tetraspis* [AM493868.1]

ตารางที่ 4.19 ค่าจำนวนตำแหน่งนิวกลิโอไทด์ที่แตกต่างกันเมื่อเปรียบเทียบเป็นคู่ในความยาวที่สามารถเปรียบเทียบกันได้ ซึ่งคำนวณจากลำดับนิวกลิโอไทด์ของยีน COI ของตัวอย่างตะโขงที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ และตัวแทนสัตว์เลื้อยคลานในอันดับ Crocodylia ความยาว 1,555–1,593 คู่เบส จำนวนทั้งหมด 15 สาย

ชนิด	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	-														
2	0	-													
3	2	2	-												
4	193	193	193	-											
5	251	251	252	259	-										
6	252	252	253	258	12	-									
7	255	255	256	258	129	135	-								
8	241	241	242	240	124	132	114	-							
9	253	253	254	254	127	137	16	118	-						
10	254	254	255	255	134	144	129	114	127	-					
11	252	252	253	239	119	129	53	97	59	114	-				
12	257	257	259	252	121	130	129	120	131	122	110	-			
13	286	286	288	290	312	306	312	310	319	314	314	316	-		
14	280	280	281	265	202	210	182	177	179	192	175	193	326	-	
15	283	283	284	262	230	232	237	219	235	217	221	225	335	185	-

ตารางที่ 4.20 ค่าเปอร์เซ็นต์ความห่างทางพันธุกรรมเมื่อคำนวณด้วย p -distance และเปรียบเทียบเป็นคู่ในความยาวที่สามารถเปรียบเทียบกันได้ จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ของตัวอย่างตะโขงที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ และตัวแทนสัตว์เลื้อยคลานในอันดับ Crocodylia ความยาว 1,555–1,593 คู่เบส จำนวนทั้งหมด 15 สาย

ชนิด	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	-														
2	0.000	-													
3	0.126	0.126	-												
4	12.301	12.301	12.301	-											
5	16.121	16.121	16.185	16.635	-										
6	16.185	16.185	16.249	16.570	0.771	-									
7	16.378	16.378	16.442	16.570	8.285	8.671	-								
8	15.478	15.478	15.543	15.414	7.964	8.478	7.322	-							
9	16.249	16.249	16.313	16.313	8.157	8.799	1.028	7.579	-						
10	16.313	16.313	16.378	16.378	8.606	9.249	8.285	7.322	8.157	-					
11	16.237	16.237	16.302	15.399	7.668	8.312	3.415	6.250	3.802	7.345	-				
12	16.506	16.506	16.635	16.185	7.771	8.349	8.285	7.707	8.414	7.836	7.088	-			
13	18.170	18.170	18.297	18.542	20.039	19.653	20.039	19.910	20.488	20.167	20.232	20.295	-		
14	17.677	17.677	17.740	16.890	12.974	13.487	11.689	11.368	11.496	12.331	11.276	12.396	20.712	-	
15	18.199	18.199	18.264	16.849	14.791	14.920	15.241	14.084	15.113	13.955	14.258	14.469	21.543	11.897	-

ตารางที่ 4.21 ค่าเปอร์เซ็นต์ความห่างทางพันธุกรรมเมื่อคำนวณด้วยแบบจำลอง Jukes-Cantor และเปรียบเทียบเป็นคู่ในความยาวที่สามารถเปรียบเทียบกันได้ จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ของตัวอย่างตะโขงที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ และตัวแทนสัตว์เลื้อยคลานในอันดับ Crocodylia ความยาว 1,555–1,593 คู่เบส จำนวนทั้งหมด 15 สาย

ชนิด	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	-														
2	0.000	-													
3	0.126	0.126	-												
4	13.435	13.435	13.435	-											
5	18.150	18.150	18.232	18.807	-										
6	18.232	18.232	18.314	18.725	0.775	-									
7	18.478	18.478	18.560	18.725	8.780	9.214	-								
8	17.336	17.336	17.417	17.255	8.419	8.996	7.704	-							
9	18.314	18.314	18.396	18.396	8.635	9.359	1.035	7.990	-						
10	18.396	18.396	18.478	18.478	9.141	9.870	8.780	7.704	8.635	-					
11	18.298	18.298	18.381	17.237	8.088	8.810	3.495	6.526	3.901	7.730	-				
12	18.642	18.642	18.807	18.232	8.204	8.852	8.780	8.133	8.924	8.276	7.445	-			
13	20.807	20.807	20.975	21.300	23.314	22.790	23.314	23.139	23.930	23.490	23.579	23.666	-		
14	20.159	20.159	20.241	19.136	14.245	14.869	12.707	12.328	12.479	13.472	12.219	13.549	24.238	-	
15	20.846	20.846	20.930	19.083	16.475	16.635	17.038	15.599	16.877	15.441	15.814	16.075	25.396	12.954	-

ตารางที่ 4.22 ค่าเปอร์เซ็นต์ความห่างทางพันธุกรรมเมื่อกำหนดด้วยแบบจำลอง Kimura two-parameter และเปรียบเทียบเป็นคู่ในความยาวที่สามารถเปรียบเทียบกันได้ จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ของตัวอย่างตะโขงที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ และตัวแทนสัตว์เลื้อยคลานในอันดับ Crocodylia ความยาว 1,555–1,593 คู่เบส จำนวนทั้งหมด 15 สาย

ชนิด	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	-														
2	0.000	-													
3	0.126	0.126	-												
4	13.758	13.758	13.750	-											
5	18.425	18.425	18.505	19.104	-										
6	18.505	18.505	18.585	19.009	0.776	-									
7	18.738	18.738	18.819	19.039	8.960	9.413	-								
8	17.587	17.587	17.666	17.481	8.597	9.199	7.842	-							
9	18.557	18.557	18.637	18.680	8.814	9.572	1.038	8.136	-						
10	18.702	18.702	18.782	18.797	9.336	10.113	8.940	7.829	8.794	-					
11	18.581	18.581	18.661	17.486	8.230	8.981	3.519	6.619	3.931	7.856	-				
12	18.974	18.974	19.143	18.527	8.356	9.041	8.945	8.300	9.092	8.451	7.571	-			
13	21.121	21.121	21.293	21.580	23.651	23.082	23.643	23.515	24.296	23.822	23.931	24.038	-		
14	20.511	20.511	20.592	19.438	14.488	15.145	12.861	12.478	12.627	13.671	12.364	13.746	24.605	-	
15	21.348	21.348	21.430	19.447	16.860	17.025	17.460	15.933	17.277	15.749	16.163	16.437	25.852	13.240	-

ตารางที่ 4.23 ค่าเปอร์เซ็นต์ความห่างทางพันธุกรรมเมื่อกำหนดด้วยแบบจำลอง Tajima-Nei และเปรียบเทียบเป็นคู่ในความยาวที่สามารถเปรียบเทียบกันได้ จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ของตัวอย่างตะโขงที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ และตัวแทนสัตว์เลื้อยคลานในอันดับ Crocodylia ความยาว 1,555–1,593 คู่เบส จำนวนทั้งหมด 15 สาย

ชนิด	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	-														
2	0.000	-													
3	0.126	0.126	-												
4	13.915	13.915	13.907	-											
5	18.672	18.672	18.748	19.393	-										
6	18.754	18.754	18.831	19.289	0.777	-									
7	18.991	18.991	19.069	19.337	9.012	9.470	-								
8	17.854	17.854	17.932	17.747	8.643	9.252	7.884	-							
9	18.804	18.804	18.882	18.963	8.863	9.629	1.038	8.182	-						
10	18.961	18.961	19.037	19.102	9.398	10.181	8.999	7.875	8.850	-					
11	18.844	18.844	18.923	17.737	8.281	9.040	3.529	6.650	3.943	7.900	-				
12	19.230	19.230	19.402	18.793	8.407	9.096	9.000	8.342	9.149	8.500	7.612	-			
13	21.453	21.453	21.627	21.928	24.143	23.559	24.064	23.956	24.763	24.230	24.363	24.479	-		
14	20.828	20.828	20.907	19.714	14.662	15.332	12.981	12.600	12.744	13.819	12.479	13.897	25.042	-	
15	21.715	21.715	21.797	19.743	17.077	17.243	17.688	16.133	17.501	15.927	16.359	16.634	26.307	13.379	-

ตารางที่ 4.24 ค่าเปอร์เซ็นต์ความห่างทางพันธุกรรมเมื่อคำนวณด้วยแบบจำลอง Tamura 3-parameter และเปรียบเทียบเป็นคู่ในความยาวที่สามารถเปรียบเทียบกันได้ จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ของตัวอย่างตะโขงที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ และตัวแทนสัตว์เลื้อยคลานในอันดับ Crocodylia ความยาว 1,555–1,593 คู่เบส จำนวนทั้งหมด 15 สาย

ชนิด	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	-														
2	0.000	-													
3	0.126	0.126	-												
4	13.788	13.788	13.781	-											
5	18.456	18.456	18.537	19.139	-										
6	18.536	18.536	18.616	19.042	0.776	-									
7	18.778	18.778	18.859	19.082	8.972	9.426	-								
8	17.623	17.623	17.703	17.516	8.609	9.213	7.854	-							
9	18.596	18.596	18.677	18.722	8.826	9.586	1.038	8.149	-						
10	18.738	18.738	18.818	18.835	9.347	10.126	8.952	7.838	8.806	-					
11	18.622	18.622	18.703	17.523	8.240	8.993	3.521	6.627	3.933	7.865	-				
12	19.009	19.009	19.179	18.560	8.364	9.051	8.957	8.311	9.104	8.460	7.580	-			
13	21.143	21.143	21.315	21.603	23.671	23.100	23.670	23.544	24.327	23.844	23.961	24.059	-		
14	20.565	20.565	20.646	19.487	14.513	15.173	12.883	12.500	12.649	13.693	12.385	13.767	24.639	-	
15	21.416	21.416	21.499	19.500	16.898	17.062	17.510	15.975	17.327	15.782	16.206	16.474	25.892	13.274	-

ตารางที่ 4.25 ค่าเปอร์เซ็นต์ความห่างทางพันธุกรรมเมื่อคำนวณด้วยแบบจำลอง Tamura-Nei และเปรียบเทียบเป็นคู่ในความยาวที่สามารถเปรียบเทียบกันได้ จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ของตัวอย่างตะโขงที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ และตัวแทนสัตว์เลื้อยคลานในอันดับ Crocodylia ความยาว 1,555–1,593 คู่เบส จำนวนทั้งหมด 15 สาย

ชนิด	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	-														
2	0.000	-													
3	0.126	0.126	-												
4	13.873	13.873	13.862	-											
5	18.537	18.537	18.617	19.204	-										
6	18.632	18.632	18.713	19.101	0.776	-									
7	18.901	18.901	18.982	19.193	8.987	9.443	-								
8	17.843	17.843	17.924	17.664	8.632	9.239	7.865	-							
9	18.704	18.704	18.785	18.810	8.841	9.604	1.038	8.161	-						
10	18.831	18.831	18.912	18.965	9.365	10.147	8.964	7.857	8.818	-					
11	18.769	18.769	18.851	17.624	8.253	9.007	3.523	6.635	3.936	7.875	-				
12	19.091	19.091	19.265	18.647	8.378	9.067	8.969	8.330	9.118	8.483	7.591	-			
13	21.256	21.256	21.433	21.709	23.787	23.219	23.822	23.746	24.505	23.944	24.163	24.158	-		
14	20.722	20.722	20.804	19.584	14.593	15.257	12.909	12.552	12.675	13.759	12.425	13.837	24.805	-	
15	21.634	21.634	21.718	19.657	16.993	17.137	17.609	16.089	17.421	15.836	16.292	16.541	26.031	13.348	-

ตารางที่ 4.26 ค่าเปอร์เซ็นต์ความห่างทางพันธุกรรมเมื่อคำนวณด้วยแบบจำลอง Maximum composite likelihood และเปรียบเทียบเป็นคู่ในความยาวที่สามารถเปรียบเทียบกันได้ จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ของตัวอย่างตะโขงที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ และตัวแทนสัตว์เลื้อยคลานในอันดับ Crocodylia ความยาว 1,555–1,593 คู่เบส จำนวนทั้งหมด 15 สาย

ชนิด	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	-														
2	0.000	-													
3	0.126	0.126	-												
4	13.552	13.552	13.559	-											
5	18.754	18.754	18.848	19.470	-										
6	18.841	18.841	18.935	19.400	0.775	-									
7	19.123	19.123	19.217	19.329	8.799	9.235	-								
8	17.841	17.841	17.933	17.806	8.422	9.000	7.719	-							
9	18.970	18.970	19.065	19.012	8.651	9.374	1.034	8.007	-						
10	18.979	18.979	19.074	19.043	9.170	9.892	8.818	7.726	8.668	-					
11	18.883	18.883	18.977	17.766	8.121	8.844	3.504	6.542	3.912	7.759	-				
12	19.224	19.224	19.401	18.815	8.232	8.873	8.813	8.135	8.959	8.292	7.467	-			
13	21.672	21.672	21.855	22.296	24.523	23.990	24.516	24.219	25.160	24.743	24.765	24.880	-		
14	20.870	20.870	20.966	19.812	14.502	15.138	12.973	12.559	12.736	13.726	12.454	13.809	25.522	-	
15	21.430	21.430	21.528	19.648	16.762	16.940	17.335	15.856	17.183	15.735	16.082	16.360	26.742	13.072	-

ตารางที่ 4.27 ค่าเปอร์เซ็นต์ความห่างทางพันธุกรรมเมื่อกำหนดด้วยแบบจำลอง LogDet และเปรียบเทียบเป็นคู่ในความยาวที่สามารถเปรียบเทียบกันได้ จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ของตัวอย่างตะโขงที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ และตัวแทนสัตว์เลื้อยคลานในอันดับ Crocodylia ความยาว 1,555–1,593 คู่เบส จำนวนทั้งหมด 15 สาย

ชนิด	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	-														
2	0.000	-													
3	0.135	0.135	-												
4	13.536	13.536	13.550	-											
5	17.969	17.969	18.062	18.641	-										
6	18.024	18.024	18.118	18.563	0.788	-									
7	18.256	18.256	18.354	18.504	8.962	9.388	-								
8	17.095	17.095	17.192	16.905	8.534	9.128	7.846	-							
9	18.060	18.060	18.159	18.193	8.806	9.551	1.028	8.137	-						
10	18.331	18.331	18.425	18.306	9.454	10.261	8.931	7.737	8.777	-					
11	18.103	18.103	18.202	16.954	8.351	9.084	3.589	6.668	3.982	7.921	-				
12	18.704	18.704	18.885	18.074	8.433	9.158	8.971	8.289	9.079	8.685	7.700	-			
13	20.238	20.238	20.414	20.731	22.780	22.216	22.693	22.420	23.322	23.035	22.904	23.327	-		
14	19.974	19.974	20.075	18.950	14.118	14.778	12.639	12.163	12.416	13.365	12.135	13.380	23.521	-	
15	20.799	20.799	20.901	18.974	16.552	16.748	17.318	15.750	17.138	15.615	16.065	16.259	24.899	13.065	-

4.3.5 การวิเคราะห์ความแปรผันทางพันธุกรรมของยีน COI เฉพาะบริเวณดีเอ็นเอบาร์โค้ด ระหว่างตะโขงที่มีถิ่นกำเนิดในประเทศไทย, ตะโขงที่มีการเผยแพร่ในฐานะข้อมูลของ NCBI และตัวแทนสัตว์เลื้อยคลานในอันดับ Crocodylia ชนิดอื่น ๆ ที่มีการเผยแพร่ในฐานะข้อมูลของ NCBI

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชุดข้อมูลที่มี 4 ซึ่งประกอบไปด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI เฉพาะบริเวณดีเอ็นเอบาร์โค้ด ของตัวอย่างตะโขงในศูนย์เพาะเลี้ยงที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ จำนวน 2 เส้น (ตัวอย่างตะโขงหมายเลข 1 และ 10), ตะโขงที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานะข้อมูลของ NCBI จำนวน 1 เส้น *T. schlegelii* [NC_011074.1] และสัตว์เลื้อยคลานในอันดับ Crocodylia ชนิดอื่น ๆ ที่มีอยู่ในฐานข้อมูลของ NCBI จำนวน 12 เส้น ความยาว 645 คู่เบส ซึ่งได้มาจากการคัดเลือกลำดับนิวคลีโอไทด์เฉพาะบริเวณดีเอ็นเอบาร์โค้ดของชุดข้อมูลที่มี 3 โดยนำลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดมาเปรียบเทียบเป็นคู่ (pairwise) ในความยาวที่สามารถเปรียบเทียบกันได้แบบ pairwise deletion แล้วคำนวณหาจำนวนตำแหน่งของนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกัน พบค่าความแตกต่างระหว่างชนิดอยู่ในช่วง 0–144 ตำแหน่ง และมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 88.409 ตำแหน่ง (ตารางที่ 4.28) โดยเมื่อทำการคำนวณเปอร์เซ็นต์ความห่างทางพันธุกรรมได้ค่า *p*-distance อยู่ในช่วง 0.000–22.326% (เฉลี่ย 13.707%) (ตารางที่ 4.29), Jukes-Cantor ให้ค่า 0.000–26.502% (เฉลี่ย 15.400%) (ตารางที่ 4.30), Kimura two-parameter ให้ค่า 0.000–26.979% (เฉลี่ย 15.619%) (ตารางที่ 4.31), Tajima-Nei ให้ค่า 0.000–27.471% (เฉลี่ย 15.834%) (ตารางที่ 4.32), Tamura 3-parameter ให้ค่า 0.000–27.001% (เฉลี่ย 15.631%) (ตารางที่ 4.33), Tamura-Nei ให้ค่า 0.000–27.091% (เฉลี่ย 15.745%) (ตารางที่ 4.34), Maximum composite likelihood ให้ค่า 0.000–27.689% (เฉลี่ย 15.792%) (ตารางที่ 4.35) และ LogDet ให้ค่า 0.000–26.047% (เฉลี่ย 15.069%) (ตารางที่ 4.36)

หมายเหตุ: ตัวเลขที่แสดงในตารางที่ 4.28–4.36 แทนสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ ดังนี้ 1) *T. schlegelii* (ตัวอย่างตะโขงหมายเลข 1 ข้อมูลที่ได้มาจากการศึกษาในครั้งนี้); 2) *T. schlegelii* (ตัวอย่างตะโขงหมายเลข 10 ข้อมูลที่ได้มาจากการศึกษาในครั้งนี้); 3) *T. schlegelii* [NC_011074.1]; 4) *G. gangeticus* [AB079596.1]; 5) *C. porosus* [NC_008143.1]; 6) *C. siamensis* [DQ353946.1]; 7) *C. acutus* [HM636894.1]; 8) *C. palustris* [GU144286.1]; 9) *C. intermedius* [HM636895.1]; 10) *C. novaeguineae* [HM636896.1]; 11) *C. moreletii* [HQ585889.1]; 12) *C. johnsoni* [HM488008.2]; 13) *A. sinensis* [AF511507.1]; 14) *M. cataphractus* [EF551000.1]; และ 15) *O. tetraspis* [AM493868.1]

ตารางที่ 4.28 ค่าจำนวนตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกันเมื่อเปรียบเทียบเป็นคู่ในความยาวที่สามารถเปรียบเทียบกันได้ ซึ่งคำนวณจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI เฉพาะบริเวณดีเอ็นเอบาร์โค้ดของตัวอย่างตะโขงที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ และตัวแทนสัตว์เลื้อยคลานในอันดับ Crocodylia ความยาว 641 คู่เบส จำนวนทั้งหมด 15 สาย

ชนิด	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	-														
2	0	-													
3	2	2	-												
4	75	75	75	-											
5	107	107	108	112	-										
6	108	108	109	109	7	-									
7	110	110	111	108	53	56	-								
8	101	101	102	102	54	59	48	-							
9	111	111	112	108	54	61	7	53	-						
10	103	103	104	108	54	61	49	50	50	-					
11	105	105	106	106	47	52	20	45	25	43	-				
12	111	111	113	114	53	59	53	60	54	51	46	-			
13	106	106	108	115	138	134	132	126	136	131	133	129	-		
14	105	105	106	115	93	98	78	83	79	81	79	87	138	-	
15	123	123	124	106	103	104	107	108	107	98	104	103	144	91	-

ตารางที่ 4.29 ค่าเปอร์เซ็นต์ความห่างทางพันธุกรรมเมื่อคำนวณด้วย p -distance และเปรียบเทียบเป็นคู่ในความยาวที่สามารถเปรียบเทียบกันได้ จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI เฉพาะบริเวณดีเอ็นเอบาร์โค้ดของตัวอย่างตะโขงที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ และตัวแทนสัตว์เลื้อยคลานในอันดับ Crocodylia ความยาว 641 คู่เบส จำนวนทั้งหมด 15 สาย

ชนิด	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	-														
2	0.000	-													
3	0.310	0.310	-												
4	11.628	11.628	11.628	-											
5	16.589	16.589	16.744	17.364	-										
6	16.744	16.744	16.899	16.899	1.085	-									
7	17.054	17.054	17.209	16.744	8.217	8.682	-								
8	15.659	15.659	15.814	15.814	8.372	9.147	7.442	-							
9	17.209	17.209	17.364	16.744	8.372	9.457	1.085	8.217	-						
10	15.969	15.969	16.124	16.744	8.372	9.457	7.597	7.752	7.752	-					
11	16.279	16.279	16.434	16.434	7.287	8.062	3.101	6.977	3.876	6.667	-				
12	17.209	17.209	17.519	17.674	8.217	9.147	8.217	9.302	8.372	7.907	7.132	-			
13	16.434	16.434	16.744	17.829	21.395	20.775	20.465	19.535	21.085	20.310	20.620	20.000	-		
14	16.279	16.279	16.434	17.829	14.419	15.194	12.093	12.868	12.248	12.558	12.248	13.488	21.395	-	
15	19.070	19.070	19.225	16.434	15.969	16.124	16.589	16.744	16.589	15.194	16.124	15.969	22.326	14.109	-

ตารางที่ 4.30 ค่าเปอร์เซ็นต์ความห่างทางพันธุกรรมเมื่อคำนวณด้วยแบบจำลอง Jukes-Cantor และเปรียบเทียบเป็นคู่ในความยาวที่สามารถเปรียบเทียบกันได้ จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI เฉพาะบริเวณดีเอ็นเอบาร์โค้ดของตัวอย่างตะโขงที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ และตัวแทนสัตว์เลื้อยคลานในอันดับ Crocodylia ความยาว 641 คู่เบส จำนวนทั้งหมด 15 สาย

ชนิด	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	-														
2	0.000	-													
3	0.311	0.311	-												
4	12.635	12.635	12.635	-											
5	18.749	18.749	18.948	19.751	-										
6	18.948	18.948	19.148	19.148	1.093	-									
7	19.349	19.349	19.550	18.948	8.703	9.227	-								
8	17.564	17.564	17.760	17.760	8.877	9.755	7.837	-							
9	19.550	19.550	19.751	18.948	8.877	10.109	1.093	8.703	-						
10	17.957	17.957	18.154	18.948	8.877	10.109	8.010	8.182	8.182	-					
11	18.352	18.352	18.550	18.550	7.666	8.529	3.167	7.323	3.980	6.982	-				
12	19.550	19.550	19.953	20.156	8.703	9.755	8.703	9.932	8.877	8.356	7.494	-			
13	18.550	18.550	18.948	20.359	25.189	24.326	23.899	22.630	24.756	23.686	24.112	23.262	-		
14	18.352	18.352	18.550	20.359	16.013	16.978	13.187	14.117	13.372	13.744	13.372	14.870	25.189	-	
15	22.004	22.004	22.212	18.550	17.957	18.154	18.749	18.948	18.749	16.978	18.154	17.957	26.502	15.630	-

ตารางที่ 4.31 ค่าเปอร์เซ็นต์ความห่างทางพันธุกรรมเมื่อคำนวณด้วยแบบจำลอง Kimura two-parameter และเปรียบเทียบเป็นคู่ในความยาวที่สามารถเปรียบเทียบกันได้ จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI เฉพาะบริเวณดีเอ็นเอบาร์โค้ดของตัวอย่างตะโขงที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ และตัวแทนสัตว์เลื้อยคลานในอันดับ Crocodylia ความยาว 641 คู่เบส จำนวนทั้งหมด 15 สาย

ชนิด	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	-														
2	0.000	-													
3	0.311	0.311	-												
4	12.885	12.885	12.869	-											
5	18.996	18.996	19.191	20.028	-										
6	19.208	19.208	19.403	19.387	1.097	-									
7	19.567	19.567	19.764	19.208	8.868	9.420	-								
8	17.730	17.730	17.922	17.936	9.064	9.991	7.973	-							
9	19.764	19.764	19.961	19.191	9.064	10.367	1.096	8.868	-						
10	18.115	18.115	18.309	19.225	9.039	10.338	8.094	8.282	8.282	-					
11	18.530	18.530	18.725	18.769	7.773	8.674	3.187	7.427	4.011	7.056	-				
12	19.813	19.813	20.225	20.498	8.868	9.977	8.845	10.150	9.016	8.515	7.614	-			
13	18.754	18.754	19.159	20.514	25.580	24.652	24.157	22.897	25.052	23.948	24.403	23.515	-		
14	18.545	18.545	18.739	20.640	16.285	17.318	13.308	14.269	13.513	13.878	13.513	15.045	25.536	-	
15	22.475	22.475	22.677	18.769	18.312	18.525	19.167	19.361	19.146	17.247	18.545	18.312	26.979	16.042	-

ตารางที่ 4.32 ค่าเปอร์เซ็นต์ความห่างทางพันธุกรรมเมื่อกำหนดด้วยแบบจำลอง Tajima-Nei และเปรียบเทียบเป็นคู่ในความยาวที่สามารถเปรียบเทียบกันได้ จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI เฉพาะบริเวณดีเอ็นเอบาร์โค้ดของตัวอย่างตะโขงที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ และตัวแทนสัตว์เลื้อยคลานในอันดับ Crocodylia ความยาว 641 คู่เบส จำนวนทั้งหมด 15 สาย

ชนิด	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	-														
2	0.000	-													
3	0.311	0.311	-												
4	13.047	13.047	13.028	-											
5	19.262	19.262	19.442	20.312	-										
6	19.482	19.482	19.662	19.646	1.097	-									
7	19.868	19.868	20.051	19.501	8.916	9.472	-								
8	18.019	18.019	18.207	18.251	9.114	10.048	8.016	-							
9	20.079	20.079	20.262	19.477	9.110	10.424	1.097	8.922	-						
10	18.346	18.346	18.526	19.538	9.102	10.411	8.146	8.343	8.335	-					
11	18.801	18.801	18.984	19.062	7.819	8.723	3.194	7.464	4.023	7.093	-				
12	20.090	20.090	20.509	20.796	8.927	10.039	8.895	10.220	9.070	8.578	7.653	-			
13	19.027	19.027	19.437	20.814	26.165	25.231	24.661	23.338	25.597	24.401	24.938	23.946	-		
14	18.777	18.777	18.962	20.937	16.475	17.531	13.420	14.410	13.630	13.994	13.628	15.205	25.990	-	
15	22.885	22.885	23.081	19.014	18.540	18.756	19.421	19.648	19.395	17.450	18.777	18.548	27.471	16.236	-

ตารางที่ 4.33 ค่าเปอร์เซ็นต์ความห่างทางพันธุกรรมเมื่อคำนวณด้วยแบบจำลอง Tamura 3-parameter และเปรียบเทียบเป็นคู่ในความยาวที่สามารถเปรียบเทียบกันได้ จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI เฉพาะบริเวณดีเอ็นเอบาร์โค้ดของตัวอย่างตะโขงที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ และตัวแทนสัตว์เลื้อยคลานในอันดับ Crocodylia ความยาว 641 คู่เบส จำนวนทั้งหมด 15 สาย

ชนิด	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	-														
2	0.000	-													
3	0.311	0.311	-												
4	12.898	12.898	12.882	-											
5	19.013	19.013	19.209	20.046	-										
6	19.224	19.224	19.420	19.402	1.097	-									
7	19.585	19.585	19.782	19.226	8.873	9.425	-								
8	17.745	17.745	17.938	17.951	9.070	9.998	7.977	-							
9	19.784	19.784	19.983	19.211	9.070	10.375	1.096	8.875	-						
10	18.129	18.129	18.323	19.242	9.044	10.344	8.097	8.286	8.286	-					
11	18.546	18.546	18.741	18.786	7.777	8.678	3.188	7.430	4.013	7.059	-				
12	19.825	19.825	20.239	20.512	8.871	9.981	8.848	10.155	9.020	8.518	7.617	-			
13	18.762	18.762	19.168	20.521	25.591	24.660	24.166	22.907	25.065	23.956	24.413	23.519	-		
14	18.562	18.562	18.757	20.663	16.299	17.333	13.316	14.279	13.523	13.886	13.522	15.052	25.549	-	
15	22.514	22.514	22.718	18.791	18.334	18.546	19.193	19.390	19.175	17.265	18.570	18.327	27.001	16.065	-

ตารางที่ 4.34 ค่าเปอร์เซ็นต์ความห่างทางพันธุกรรมเมื่อคำนวณด้วยแบบจำลอง Tamura-Nei และเปรียบเทียบเป็นคู่ในความยาวที่สามารถเปรียบเทียบกันได้ จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI เฉพาะบริเวณดีเอ็นเอบาร์โค้ดของตัวอย่างตะโขงที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ และตัวแทนสัตว์เลื้อยคลานในอันดับ Crocodylia ความยาว 641 คู่เบส จำนวนทั้งหมด 15 สาย

ชนิด	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	-														
2	0.000	-													
3	0.311	0.311	-												
4	13.092	13.092	13.062	-											
5	19.115	19.115	19.311	20.147	-										
6	19.338	19.338	19.534	19.475	1.098	-									
7	19.751	19.751	19.950	19.323	8.895	9.460	-								
8	18.067	18.067	18.262	18.221	9.088	10.036	8.009	-							
9	19.950	19.950	20.149	19.280	9.100	10.422	1.096	8.905	-						
10	18.250	18.250	18.445	19.448	9.060	10.362	8.110	8.315	8.305	-					
11	18.744	18.744	18.940	18.944	7.786	8.688	3.189	7.445	4.014	7.065	-				
12	19.951	19.951	20.377	20.615	8.886	9.997	8.869	10.181	9.040	8.551	7.626	-			
13	18.904	18.904	19.324	20.637	25.769	24.837	24.373	23.219	25.288	24.049	24.791	23.612	-		
14	18.720	18.720	18.916	20.801	16.385	17.429	13.340	14.357	13.555	13.923	13.544	15.104	25.729	-	
15	22.901	22.901	23.108	18.903	18.391	18.584	19.336	19.600	19.303	17.366	18.710	18.359	27.091	16.218	-

ตารางที่ 4.35 ค่าเปอร์เซ็นต์ความห่างทางพันธุกรรมเมื่อคำนวณด้วยแบบจำลอง Maximum composite likelihood และเปรียบเทียบเป็นคู่ในความยาวที่สามารถเปรียบเทียบกันได้ จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI เฉพาะบริเวณดีเอ็นเอบาร์โค้ดของตัวอย่างตะโขงที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ และตัวแทนสัตว์เลื้อยคลานในอันดับ Crocodylia ความยาว 641 คู่เบส จำนวนทั้งหมด 15 สาย

ชนิด	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	-														
2	0.000	-													
3	0.311	0.311	-												
4	12.681	12.681	12.698	-											
5	19.280	19.280	19.505	20.350	-										
6	19.477	19.477	19.703	19.752	1.092	-									
7	19.956	19.956	20.185	19.487	8.705	9.219	-								
8	18.036	18.036	18.256	18.249	8.873	9.733	7.832	-							
9	20.185	20.185	20.415	19.526	8.864	10.078	1.093	8.700	-						
10	18.535	18.535	18.759	19.429	8.904	10.124	8.062	8.219	8.223	-					
11	18.908	18.908	19.133	19.080	7.696	8.548	3.169	7.334	3.985	7.018	-				
12	20.129	20.129	20.558	20.711	8.721	9.759	8.723	9.936	8.906	8.376	7.508	-			
13	19.108	19.108	19.531	21.216	26.258	25.375	24.986	23.500	25.893	24.804	25.118	24.329	-		
14	18.901	18.901	19.125	21.000	16.279	17.244	13.462	14.390	13.627	14.034	13.634	15.178	26.326	-	
15	22.509	22.509	22.746	19.100	18.306	18.519	19.063	19.265	19.090	17.323	18.445	18.335	27.689	15.715	-

ตารางที่ 4.36 ค่าเปอร์เซ็นต์ความห่างทางพันธุกรรมเมื่อคำนวณด้วยแบบจำลอง LogDet และเปรียบเทียบเป็นคู่ในความยาวที่สามารถเปรียบเทียบกันได้ จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI เฉพาะบริเวณดีเอ็นเอบาร์โค้ดของตัวอย่างตะโขงที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ และตัวแทนสัตว์เลื้อยคลานในอันดับ Crocodylia ความยาว 641 คู่เบส จำนวนทั้งหมด 15 สาย

ชนิด	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	-														
2	0.000	-													
3	0.324	0.324	-												
4	12.235	12.235	12.264	-											
5	18.305	18.305	18.533	19.251	-										
6	18.465	18.465	18.693	18.640	1.060	-									
7	18.696	18.696	18.933	18.353	8.714	9.203	-								
8	16.864	16.864	17.102	16.941	8.942	9.742	7.682	-							
9	18.901	18.901	19.141	18.430	8.880	10.143	1.057	8.571	-						
10	17.344	17.344	17.573	18.350	9.091	10.338	7.859	7.983	8.007	-					
11	17.726	17.726	17.963	17.800	7.892	8.667	3.155	7.217	3.990	7.057	-				
12	19.179	19.179	19.604	19.804	8.852	9.929	8.640	9.958	8.750	8.730	7.688	-			
13	17.837	17.837	18.244	19.582	24.577	23.675	23.103	21.700	23.980	23.060	23.303	22.762	-		
14	17.806	17.806	18.043	19.845	15.751	16.784	12.987	13.666	13.175	13.488	13.213	14.443	24.603	-	
15	21.668	21.668	21.919	17.942	17.823	18.097	18.708	18.705	18.718	16.801	18.098	17.908	26.047	15.587	-

4.3.6 การเปรียบเทียบความห่างทางพันธุกรรมจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI

เมื่อทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยความห่างทางพันธุกรรมที่ได้จากการคำนวณในหัวข้อ 4.3.4 และ 4.3.5 พบว่า ค่าเฉลี่ยจำนวนตำแหน่งของนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกันเมื่อวิเคราะห์ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ตลอดทั้งสายมีค่าเท่ากับ 207.800 ตำแหน่ง (ตารางที่ 4.37) และสูงกว่าเมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI เฉพาะบริเวณดีเอ็นเอบาร์โค้ด ซึ่งมีค่าเพียง 88.409 ตำแหน่ง เนื่องจากบริเวณนี้มีความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สั้นกว่า (1,584 และ 645 คู่เบส) นอกจากนี้เมื่อทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยความห่างทางพันธุกรรมจากการวิเคราะห์ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ตลอดทั้งสาย และยีน COI เฉพาะบริเวณดีเอ็นเอบาร์โค้ด จะได้ค่าอยู่ในช่วง 13.333–15.390% และ 13.707–15.834% ตามลำดับ (ตารางที่ 4.37) ซึ่งรูปแบบการวิเคราะห์ที่ให้ค่าความห่างทางพันธุกรรมเฉลี่ยสูงที่สุดและต่ำที่สุดในทั้งสองการวิเคราะห์ คือ Tajima-Nei และ *p*-distance ตามลำดับ ยิ่งไปกว่านั้นยังพบว่า เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI เฉพาะบริเวณดีเอ็นเอบาร์โค้ดจะให้ค่าสูงกว่าการวิเคราะห์ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ตลอดทั้งสาย ในทุกการคำนวณ ยกเว้นการวิเคราะห์จำนวนตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกัน อันเป็นผลมาจากความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกันของบริเวณทั้งสองนั่นเอง

ตารางที่ 4.37 ค่าเฉลี่ยความห่างทางพันธุกรรมเมื่อเปรียบเทียบระหว่างการวิเคราะห์ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ตลอดทั้งสาย และ เมื่อวิเคราะห์เฉพาะบริเวณดีเอ็นเอบาร์โค้ด ด้วยการคำนวณความห่างและใช้แบบจำลองการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์แบบต่าง ๆ

รูปแบบของการวิเคราะห์	ค่าเฉลี่ยความห่างทางพันธุกรรม เมื่อวิเคราะห์ด้วยยีน COI	
	ตลอดทั้งสาย	เฉพาะบริเวณ ดีเอ็นเอบาร์โค้ด
1. จำนวนตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ แตกต่างกัน	207.800 ตำแหน่ง	88.409 ตำแหน่ง
2. <i>p</i> -distance	13.333%	13.707%
3. Jukes-Cantor	14.932%	15.400%
4. Kimura two-parameter	15.186%	15.619%
5. Tajima-Nei	15.390%	15.834%
6. Tamura 3-parameter	15.214%	15.631%
7. Tamura-Nei	15.297%	15.745%
8. Maximum composite likelihood	15.365%	15.792%
9. LogDet	14.852%	15.069%

4.3.7 การวิเคราะห์ความแปรผันทางพันธุกรรมของยีน COI เฉพาะบริเวณดีเอ็นเอบาร์โค้ดระหว่างตะโขงที่มีถิ่นกำเนิดในประเทศไทย, ตะโขงที่มีการเผยแพร่ในฐานข้อมูลของ NCBI และสัตว์เลื้อยคลานในอันดับ Crocodylia ชนิดอื่น ๆ ทั้งหมดที่มีการเผยแพร่ในฐานข้อมูลของ NCBI

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชุดข้อมูลที่มี 5 ซึ่งประกอบไปด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI เฉพาะบริเวณดีเอ็นเอบาร์โค้ดของตัวอย่างตะโขงในศูนย์เพาะเลี้ยงที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ จำนวน 2 เส้น (ตัวอย่างตะโขงหมายเลข 1 และ 10) (1 กลุ่ม), ตะโขงที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลของ NCBI จำนวน 1 เส้น *T. schlegelii* [NC_011074.1] (1 กลุ่ม) และสัตว์เลื้อยคลานในอันดับ Crocodylia ชนิดอื่น ๆ ทั้งหมดที่มีอยู่ในฐานข้อมูลของ NCBI จำนวนทั้งหมด 42 เส้น (17 กลุ่ม ตามชนิดของสิ่งมีชีวิต) ความยาว 639–645 คู่เบส โดยนำลำดับนิวคลีโอไทด์ในกลุ่มสิ่งมีชีวิตทั้งหมดมาเปรียบเทียบเป็นคู่ (pairwise) ในความยาวที่สามารถเปรียบเทียบกันได้แบบ pairwise deletion แล้วคำนวณหาจำนวนตำแหน่งของนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกัน พบค่าความแตกต่างระหว่างชนิดอยู่ในช่วง 2.000–145.000 ตำแหน่ง และมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 82.172 ตำแหน่ง (ตารางที่ 4.38) โดยเมื่อทำการคำนวณเปอร์เซ็นต์ความห่างทางพันธุกรรมได้ค่า *p*-distance อยู่ในช่วง 0.310–22.481% (เฉลี่ย 12.764%) (ตารางที่ 4.39), Jukes-Cantor ให้ค่า 0.311–26.723% (เฉลี่ย 14.307%) (ตารางที่ 4.40), Kimura two-parameter ให้ค่า 0.311–27.221% (เฉลี่ย 14.480%) (ตารางที่ 4.41), Tajima-Nei ให้ค่า 0.311–27.723% (เฉลี่ย 14.686%) (ตารางที่ 4.42), Tamura 3-parameter ให้ค่า 0.311–27.243% (เฉลี่ย 14.490%) (ตารางที่ 4.43), Tamura-Nei ให้ค่า 0.311–27.327% (เฉลี่ย 14.579%) (ตารางที่ 4.44), Maximum composite likelihood ให้ค่า 0.242%–21.149% (เฉลี่ย 11.356%) (ตารางที่ 4.45) และ LogDet ให้ค่า 0.324%–26.319% (เฉลี่ย 13.969%) (ตารางที่ 4.46)

อย่างไรก็ดีการระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตในปัจจุบันโดยใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ด พบว่านิยมใช้การคำนวณค่าความห่างทางพันธุกรรมด้วยแบบจำลอง Kimura two-parameter เป็นหลัก (Hou et al., 2018; Kaur et al., 2013; Pappalardo et al., 2015) ทั้งนี้จากการเปรียบเทียบความห่างทางพันธุกรรมจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ในหัวข้อที่ 4.3.6 พบว่า ค่าความห่างทางพันธุกรรมที่ได้จากการคำนวณด้วย Kimura two-parameter เมื่อวิเคราะห์เฉพาะบริเวณดีเอ็นเอบาร์โค้ดมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 15.619% ซึ่งให้ค่าสูงกว่าค่าเฉลี่ยที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ตลอดทั้งสายที่มีค่าเท่ากับ 15.186% (ตารางที่ 4.37) แสดงให้เห็นว่าแบบจำลองดังกล่าวมีความเหมาะสมและสามารถใช้เปรียบเทียบกับการศึกษาอื่น ๆ ได้ โดยเมื่อพิจารณาค่าเปอร์เซ็นต์ความห่างทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่มผ่านการคำนวณด้วยแบบจำลองดังกล่าว พบว่า หากทำการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่ 1 *T. schlegelii* ข้อมูลที่ได้มาจากการศึกษาในครั้งนี้ กับกลุ่มที่ 2 *T. schlegelii* ทั้งหมดที่ได้มาจากรฐานข้อมูล จะได้ค่าต่ำที่สุดและมีค่าเท่ากับ 0.311% (ตารางที่ 4.41) เนื่องจากเป็นสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันจึงมีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมสูงและให้ค่าความห่างทางพันธุกรรมที่ต่ำที่สุด ในขณะที่เมื่อทำการเปรียบเทียบค่าความห่างทางพันธุกรรมระหว่างสิ่งมีชีวิตคนละชนิดคนละสกุล โดยทำการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่ 1 *T. schlegelii* ข้อมูลที่ได้มาจากการศึกษาในครั้งนี้ กับสัตว์เลื้อยคลานกลุ่มอื่น ๆ พบว่า ให้

ค่าที่สูงกว่าและอยู่ในช่วง 12.907–22.588% โดยค่าต่ำสุดมาจากการเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ 3 *Gavialis gangeticus* และ ค่าสูงสุดมาจากการเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ 14 *Osteolaemus tetraspis*

หมายเหตุ: ตัวเลขที่แสดงในตารางที่ 4.38–4.46 แทนสิ่งมีชีวิตกลุ่มต่าง ๆ ดังนี้ 1) *T. schlegelii* (ตัวอย่างตะโขงหมายเลข 1 และ 10 ข้อมูลที่ได้มาจากการศึกษาในครั้งนี้); 2) *T. schlegelii* [NC_011074.1]; 3) *Gavialis gangeticus* [AB079596.1, MH273966.1 และ HM490386.1]; 4) *Crocodylus porosus* [NC_008143.1, HM490361.1 และ AJ810453.1]; 5) *Crocodylus siamensis* [DQ353946.1, MH999467.1 และ EF581859.1]; 6) *Crocodylus acutus* [HM636894.1, MH273685.1, KY994090.1, GQ144571.1 และ NC_015647.1]; 7) *Crocodylus palustris* [GU144286.1, HM490342.1, HM488007.1 และ NC_014706.1]; 8) *Crocodylus intermedius* [HM636895.1 และ NC_015648.1]; 9) *Crocodylus novaeguineae* [HM636896.1 และ NC_015651.1]; 10) *Crocodylus moreletii* [HQ585889.1 และ KY994099.1]; 11) *Crocodylus johnsoni* [HM488008.2, HM490388.1 และ NC_015238.2]; 12) *Alligator sinensis* [AF511507.1]; 13) *Mecistops cataphractus* [EF551000.1 และ GQ144580.1]; 14) *Osteolaemus tetraspis* [AM493868.1 และ GQ144625.1]; 15) *Crocodylus niloticus* [HM490392.1 และ GQ144590.1]; 16) *Caiman latirostris* [JN311636.1 และ GQ144482.1]; 17) *Caiman yacare* [JN311662.1]; 18) *Crocodylus rhombifer* [MH273687 และ JX292787.1]; และ 19) *Melanosuchus niger* [JN313382.1, KU986330.1 และ GQ144602.1]

ตารางที่ 4.38 ค่าจำนวนตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกันเมื่อเปรียบเทียบเป็นคู่ในความยาวที่สามารถเปรียบเทียบกันได้ ซึ่งคำนวณจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI เฉพาะบริเวณดีเอ็นเอบาร์โค้ดของตัวอย่างตะโขงที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ และตัวแทนสัตว์เลื้อยคลานในอันดับ Crocodylia ความยาว 639-645 คู่เบส จำนวนทั้งหมด 45 สาย 19 กลุ่ม ตามชนิดของสิ่งมีชีวิต

ชนิด	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
1	-																		
2	2.000	-																	
3	75.000	75.000	-																
4	107.000	108.000	112.000	-															
5	105.333	106.333	103.000	36.333	-														
6	109.400	110.400	108.000	52.800	52.133	-													
7	101.750	102.750	101.500	54.500	45.500	49.600	-												
8	111.000	112.000	108.000	54.000	55.000	6.000	54.000	-											
9	103.000	104.000	108.000	54.000	50.333	48.800	49.750	50.000	-										
10	105.500	106.500	106.500	47.500	47.833	21.100	45.000	25.500	43.500	-									
11	111.000	113.000	114.000	53.000	59.000	52.600	60.000	54.000	51.000	46.500	-								
12	106.000	108.000	115.000	138.000	129.333	132.600	126.500	136.000	131.000	133.500	129.000	-							
13	110.000	111.500	116.500	90.000	86.667	77.300	88.250	78.500	81.500	82.000	87.000	140.000	-						
14	123.500	124.500	106.500	103.000	106.667	107.600	107.250	107.000	98.000	104.500	104.000	145.000	89.000	-					
15	109.500	110.500	112.000	50.500	49.167	25.200	46.750	28.500	42.000	25.000	48.000	138.500	79.250	103.000	-				
16	100.500	102.500	106.500	124.000	114.667	116.800	108.000	121.000	106.500	116.500	112.000	87.000	120.000	132.500	118.000	-			
17	111.000	113.000	118.000	127.000	123.333	119.200	112.500	120.000	114.000	120.500	117.000	90.000	120.000	133.500	121.000	47.500	-		
18	110.000	111.000	108.000	50.000	53.000	26.800	48.500	30.000	52.000	21.500	47.000	133.000	80.000	103.000	27.500	113.500	116.000	-	
19	113.333	115.333	113.333	124.000	118.333	124.200	111.500	126.000	115.333	125.500	121.000	96.333	124.500	128.500	122.500	48.333	51.333	121.000	-

ตารางที่ 4.39 ค่าเปอร์เซ็นต์ความห่างทางพันธุกรรมเมื่อคำนวณด้วย p -distance และเปรียบเทียบเป็นคู่ในความยาวที่สามารถเปรียบเทียบกันได้ จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI เฉพาะบริเวณดีเอ็นเอบาร์โค้ดของตัวอย่างตะโขงที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ และตัวแทนสัตว์เลื้อยคลานในอันดับ Crocodylia ความยาว 639–645 คู่เบส จำนวนทั้งหมด 45 สาย 19 กลุ่ม ตามชนิดของสิ่งมีชีวิต

ชนิด	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
1	-																		
2	0.310	-																	
3	11.646	11.646	-																
4	16.589	16.744	17.391	-															
5	16.331	16.486	15.994	5.633	-														
6	17.003	17.159	16.802	8.206	8.103	-													
7	15.775	15.930	15.761	8.450	7.054	7.709	-												
8	17.209	17.364	16.770	8.372	8.527	0.932	8.372	-											
9	15.969	16.124	16.770	8.372	7.804	7.585	7.713	7.752	-										
10	16.408	16.563	16.576	7.388	7.439	3.286	6.999	3.966	6.765	-									
11	17.218	17.528	17.711	8.221	9.152	8.180	9.307	8.376	7.911	7.236	-								
12	16.434	16.744	17.857	21.395	20.052	20.610	19.612	21.085	20.310	20.762	20.010	-							
13	17.054	17.287	18.090	13.953	13.437	12.014	13.682	12.171	12.636	12.753	13.495	21.705	-						
14	19.147	19.302	16.537	15.969	16.537	16.724	16.628	16.589	15.194	16.252	16.132	22.481	13.798	-					
15	16.977	17.132	17.391	7.829	7.623	3.917	7.248	4.419	6.512	3.888	7.446	21.473	12.287	15.969	-				
16	15.606	15.916	16.554	19.255	17.805	18.171	16.770	18.790	16.537	18.133	17.400	13.509	18.634	20.574	18.323	-			
17	17.236	17.547	18.342	19.720	19.151	18.544	17.469	18.634	17.702	18.755	18.177	13.975	18.634	20.730	18.789	7.381	-		
18	17.094	17.250	16.796	7.770	8.236	4.171	7.537	4.662	8.081	3.348	7.308	20.668	12.432	16.006	4.274	17.652	18.040	-	
19	17.635	17.946	17.650	19.295	18.413	19.356	17.349	19.606	17.946	19.564	18.837	14.990	19.372	19.995	19.061	7.526	7.992	18.852	-

ตารางที่ 4.40 ค่าเปอร์เซ็นต์ความห่างทางพันธุกรรมเมื่อคำนวณด้วยแบบจำลอง Jukes-Cantor และเปรียบเทียบเป็นคู่ในความยาวที่สามารถเปรียบเทียบกันได้ จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI เฉพาะบริเวณดีเอ็นเอบาร์โค้ดของตัวอย่างตะโขงที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ และตัวแทนสัตว์เลื้อยคลานในอันดับ Crocodylia ความยาว 639-645 คู่เบส จำนวนทั้งหมด 45 สาย 19 กลุ่ม ตามชนิดของสิ่งมีชีวิต

ชนิด	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
1	-																		
2	0.311	-																	
3	12.656	12.656	-																
4	18.749	18.948	19.786	-															
5	18.419	18.617	17.993	5.935	-														
6	19.283	19.484	19.022	8.691	8.578	-													
7	17.711	17.908	17.693	8.965	7.428	8.135	-												
8	19.550	19.751	18.982	8.877	9.056	0.939	8.878	-											
9	17.957	18.154	18.982	8.877	8.252	7.996	8.139	8.182	-										
10	18.517	18.716	18.732	7.777	7.837	3.361	7.347	4.075	7.090	-									
11	19.561	19.965	20.204	8.708	9.760	8.661	9.937	8.882	8.360	7.609	-								
12	18.550	18.948	20.395	25.189	23.335	24.098	22.735	24.756	23.686	24.309	23.276	-							
13	19.355	19.658	20.702	15.441	14.821	13.094	15.111	13.280	13.837	13.980	14.878	25.625	-						
14	22.108	22.316	18.683	17.957	18.684	18.923	18.799	18.749	16.978	18.318	18.165	26.723	15.251	-					
15	19.250	19.451	19.786	8.269	8.044	4.023	7.623	4.554	6.812	3.993	7.842	25.298	13.419	17.957	-				
16	17.497	17.890	18.705	22.253	20.342	20.811	18.982	21.632	18.682	20.761	19.798	14.895	21.426	24.051	21.010	-			
17	19.584	19.989	21.034	22.881	22.119	21.302	19.887	21.421	20.192	21.583	20.816	15.466	21.422	24.264	21.628	7.770	-		
18	19.400	19.602	19.016	8.203	8.725	4.292	7.943	4.813	8.550	3.425	7.689	24.179	13.595	18.004	4.400	20.128	20.636	-	
19	20.104	20.512	20.124	22.306	21.139	22.389	19.732	22.726	20.512	22.669	21.693	16.723	22.411	23.255	21.992	7.932	8.450	21.713	-

ตารางที่ 4.41 ค่าเปอร์เซ็นต์ความห่างทางพันธุกรรมเมื่อคำนวณด้วยแบบจำลอง Kimura two-parameter และเปรียบเทียบเป็นคู่ในความยาวที่สามารถเปรียบเทียบกันได้ จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI เฉพาะบริเวณดีเอ็นเอบาร์โค้ดของตัวอย่างตะโขงที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ และตัวแทนสัตว์เลื้อยคลานในอันดับ Crocodylia ความยาว 639–645 คู่เบส จำนวนทั้งหมด 45 สาย 19 กลุ่ม ตามชนิดของสิ่งมีชีวิต

ชนิด	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
1	-																		
2	0.311	-																	
3	12.907	12.892	-																
4	18.996	19.191	20.064	-															
5	18.667	18.862	18.186	6.067	-														
6	19.496	19.693	19.284	8.855	8.725	-													
7	17.892	18.084	17.871	9.162	7.562	8.279	-												
8	19.764	19.961	19.226	9.064	9.239	0.940	9.045	-											
9	18.115	18.309	19.260	9.039	8.391	8.080	8.242	8.282	-										
10	18.695	18.890	18.952	7.884	7.948	3.383	7.452	4.106	7.164	-									
11	19.825	20.238	20.548	8.873	9.983	8.803	10.163	9.021	8.520	7.729	-								
12	18.754	19.159	20.551	25.580	23.644	24.366	23.019	25.052	23.948	24.600	23.530	-							
13	19.621	19.927	20.996	15.659	15.017	13.195	15.287	13.400	13.959	14.124	15.048	25.995	-						
14	22.588	22.791	18.908	18.312	19.097	19.353	19.210	19.146	17.247	18.709	18.536	27.221	15.663	-					
15	19.464	19.660	20.065	8.392	8.161	4.046	7.715	4.583	6.889	4.027	7.988	25.654	13.544	18.352	-				
16	17.621	18.019	18.756	22.513	20.520	20.936	19.117	21.781	18.757	20.888	19.951	15.195	21.561	24.377	21.142	-			
17	19.784	20.195	21.120	23.110	22.309	21.379	19.990	21.492	20.260	21.673	20.939	15.769	21.530	24.563	21.716	7.913	-		
18	19.636	19.833	19.228	8.333	8.879	4.325	8.100	4.853	8.664	3.452	7.797	24.511	13.716	18.342	4.436	20.258	20.718	-	
19	20.286	20.701	20.189	22.516	21.310	22.545	19.862	22.883	20.600	22.843	21.869	17.024	22.547	23.470	22.128	8.014	8.533	21.875	-

ตารางที่ 4.42 ค่าเปอร์เซ็นต์ความห่างทางพันธุกรรมเมื่อคำนวณด้วยแบบจำลอง Tajima-Nei และเปรียบเทียบเป็นคู่ในความยาวที่สามารถเปรียบเทียบกันได้ จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI เฉพาะบริเวณดีเอ็นเอบาร์โค้ดของตัวอย่างตะโขงที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ และตัวแทนสัตว์เลื้อยคลานในอันดับ Crocodylia ความยาว 639-645 คู่เบส จำนวนทั้งหมด 45 สาย 19 กลุ่ม ตามชนิดของสิ่งมีชีวิต

ชนิด	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
1	-																		
2	0.311	-																	
3	13.070	13.051	-																
4	19.262	19.442	20.350	-															
5	18.916	19.097	18.432	6.090	-														
6	19.793	19.976	19.574	8.903	8.777	-													
7	18.179	18.367	18.193	9.212	7.601	8.325	-												
8	20.079	20.262	19.513	9.110	9.292	0.941	9.102	-											
9	18.346	18.526	19.574	9.102	8.443	8.132	8.303	8.335	-										
10	18.968	19.153	19.247	7.932	7.993	3.392	7.489	4.118	7.201	-									
11	20.102	20.522	20.847	8.933	10.045	8.852	10.232	9.075	8.583	7.769	-								
12	19.027	19.437	20.852	26.165	24.106	24.871	23.465	25.597	24.401	25.140	23.960	-							
13	19.905	20.210	21.328	15.833	15.175	13.315	15.453	13.523	14.078	14.259	15.219	26.458	-						
14	22.997	23.194	19.158	18.540	19.346	19.612	19.501	19.395	17.450	18.944	18.782	27.723	15.842	-					
15	19.788	19.966	20.441	8.441	8.211	4.063	7.765	4.601	6.926	4.042	8.025	26.218	13.677	18.586	-				
16	17.880	18.285	18.991	22.936	20.850	21.313	19.482	22.184	19.057	21.245	20.247	15.353	21.892	24.795	21.544	-			
17	20.098	20.517	21.432	23.615	22.720	21.777	20.307	21.913	20.577	22.026	21.219	15.959	21.904	25.035	22.167	7.954	-		
18	19.955	20.142	19.513	8.378	8.932	4.339	8.136	4.870	8.719	3.459	7.836	25.006	13.842	18.554	4.449	20.582	21.040	-	
19	20.677	21.101	20.478	23.006	21.733	23.029	20.305	23.370	21.081	23.285	22.271	17.247	22.904	23.862	22.680	8.067	8.597	22.286	-

ตารางที่ 4.43 ค่าเปอร์เซ็นต์ความห่างทางพันธุกรรมเมื่อคำนวณด้วยแบบจำลอง Tamura 3-parameter และเปรียบเทียบเป็นคู่ในความยาวที่สามารถเปรียบเทียบกันได้ จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI เฉพาะบริเวณดีเอ็นเอบาร์โค้ดของตัวอย่างตะโขงที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ และตัวแทนสัตว์เลื้อยคลานในอันดับ Crocodylia ความยาว 639–645 คู่เบส จำนวนทั้งหมด 45 สาย 19 กลุ่ม ตามชนิดของสิ่งมีชีวิต

ชนิด	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
1	-																		
2	0.311	-																	
3	12.920	12.905	-																
4	19.013	19.209	20.083	-															
5	18.682	18.877	18.199	6.070	-														
6	19.514	19.712	19.303	8.861	8.729	-													
7	17.907	18.101	17.886	9.169	7.566	8.284	-												
8	19.784	19.983	19.246	9.070	9.244	0.940	9.052	-											
9	18.129	18.323	19.277	9.044	8.394	8.083	8.246	8.286	-										
10	18.711	18.907	18.969	7.888	7.951	3.384	7.456	4.107	7.167	-									
11	19.838	20.251	20.562	8.876	9.986	8.806	10.168	9.025	8.523	7.732	-								
12	18.762	19.168	20.559	25.591	23.651	24.376	23.028	25.065	23.956	24.610	23.534	-							
13	19.643	19.950	21.021	15.671	15.026	13.203	15.299	13.410	13.967	14.134	15.055	26.009	-						
14	22.628	22.832	18.931	18.334	19.118	19.381	19.238	19.175	17.265	18.735	18.552	27.243	15.687	-					
15	19.480	19.677	20.083	8.396	8.164	4.047	7.719	4.584	6.891	4.028	7.991	25.663	13.552	18.375	-				
16	17.628	18.027	18.763	22.523	20.526	20.944	19.125	21.792	18.762	20.896	19.955	15.197	21.571	24.397	21.149	-			
17	19.795	20.207	21.130	23.121	22.317	21.387	19.998	21.501	20.266	21.681	20.943	15.772	21.540	24.583	21.723	7.914	-		
18	19.654	19.852	19.245	8.337	8.883	4.326	8.105	4.855	8.668	3.453	7.799	24.521	13.724	18.365	4.437	20.266	20.725	-	
19	20.300	20.716	20.200	22.529	21.320	22.557	19.873	22.898	20.609	22.857	21.876	17.029	22.562	23.492	22.139	8.015	8.534	21.887	-

ตารางที่ 4.44 ค่าเปอร์เซ็นต์ความห่างทางพันธุกรรมเมื่อคำนวณด้วยแบบจำลอง Tamura-Nei และเปรียบเทียบเป็นคู่ในความยาวที่สามารถเปรียบเทียบกันได้ จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI เฉพาะบริเวณดีเอ็นเอบาร์โค้ดของตัวอย่างตะโขงที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ และตัวแทนสัตว์เลื้อยคลานในอันดับ Crocodylia ความยาว 639-645 คู่เบส จำนวนทั้งหมด 45 สาย 19 กลุ่ม ตามชนิดของสิ่งมีชีวิต

ชนิด	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
1	-																		
2	0.311	-																	
3	13.115	13.085	-																
4	19.115	19.311	20.184	-															
5	18.795	18.990	18.276	6.080	-														
6	19.678	19.877	19.392	8.880	8.746	-													
7	18.214	18.409	18.170	9.187	7.582	8.310	-												
8	19.950	20.149	19.314	9.100	9.266	0.941	9.083	-											
9	18.250	18.445	19.484	9.060	8.406	8.094	8.274	8.305	-										
10	18.912	19.110	19.130	7.897	7.958	3.386	7.472	4.109	7.173	-									
11	19.962	20.389	20.665	8.892	10.004	8.825	10.194	9.045	8.556	7.740	-								
12	18.904	19.324	20.674	25.769	23.837	24.587	23.321	25.288	24.049	24.994	23.626	-							
13	19.828	20.146	21.214	15.725	15.065	13.220	15.364	13.434	13.996	14.153	15.095	26.161	-						
14	23.002	23.209	19.037	18.391	19.186	19.527	19.465	19.303	17.366	18.879	18.584	27.327	15.808	-					
15	19.599	19.797	20.163	8.414	8.181	4.052	7.727	4.587	6.911	4.038	8.001	25.901	13.573	18.506	-				
16	17.790	18.205	18.920	22.653	20.642	21.050	19.321	21.915	18.825	21.033	20.005	15.278	21.635	24.576	21.234	-			
17	20.035	20.468	21.273	23.372	22.499	21.475	20.163	21.599	20.374	21.825	21.046	15.911	21.609	24.850	21.872	7.956	-		
18	19.909	20.109	19.313	8.358	8.898	4.328	8.118	4.858	8.695	3.455	7.811	24.763	13.744	18.467	4.440	20.343	20.869	-	
19	20.573	21.012	20.302	22.714	21.445	22.721	20.147	23.094	20.723	22.980	21.960	17.141	22.653	23.602	22.271	8.036	8.585	22.009	-

ตารางที่ 4.45 ค่าเปอร์เซ็นต์ความห่างทางพันธุกรรมเมื่อคำนวณด้วยแบบจำลอง Maximum composite likelihood และเปรียบเทียบเป็นคู่ในความยาวที่สามารถเปรียบเทียบกันได้ จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI เฉพาะบริเวณดีเอ็นเอบาร์โค้ดของตัวอย่างตะโขงที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ และตัวแทนสัตว์เลื้อยคลานในอันดับ Crocodylia ความยาว 639–645 คู่เบส จำนวนทั้งหมด 45 สาย 19 กลุ่ม ตามชนิดของสิ่งมีชีวิต

ชนิด	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
1	-																		
2	0.242	-																	
3	9.914	9.925	-																
4	14.889	15.056	15.708	-															
5	14.617	14.784	14.321	4.602	-														
6	15.363	15.532	15.098	6.768	6.689	-													
7	14.110	14.276	14.096	6.966	5.779	6.336	-												
8	15.580	15.749	15.081	6.904	7.049	0.730	6.915	-											
9	14.331	14.497	15.053	6.917	6.433	6.267	6.368	6.404	-										
10	14.772	14.940	14.904	6.072	6.118	2.617	5.730	3.175	5.546	-									
11	15.538	15.861	15.990	6.779	7.589	6.758	7.729	6.938	6.502	5.928	-								
12	14.770	15.090	16.338	20.008	18.580	19.243	18.119	19.751	18.907	19.396	18.583	-							
13	15.373	15.619	16.445	12.206	11.719	10.396	11.975	10.529	10.984	11.076	11.786	20.379	-						
14	17.440	17.614	14.855	14.146	14.695	14.880	14.796	14.764	13.420	14.417	14.301	21.149	11.908	-					
15	15.333	15.502	15.707	6.457	6.281	3.139	5.959	3.557	5.322	3.107	6.098	20.132	10.636	14.119	-				
16	13.994	14.312	15.109	17.744	16.271	16.720	15.204	17.364	15.040	16.679	15.845	11.694	17.211	19.146	16.873	-			
17	15.625	15.950	16.965	18.294	17.715	17.199	15.994	17.310	16.300	17.412	16.727	12.157	17.246	19.347	17.452	6.044	-		
18	15.438	15.607	15.139	6.399	6.801	3.345	6.173	3.754	6.690	2.663	6.001	19.245	10.785	14.201	3.429	16.151	16.644	-	
19	16.073	16.400	16.251	17.842	16.930	17.976	15.830	18.253	16.531	18.181	17.375	13.184	18.018	18.609	17.677	6.217	6.635	17.412	-

ตารางที่ 4.46 ค่าเปอร์เซ็นต์ความห่างทางพันธุกรรมเมื่อคำนวณด้วยแบบจำลอง LogDet และเปรียบเทียบเป็นคู่ในความยาวที่สามารถเปรียบเทียบกันได้ จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI เฉพาะบริเวณดีเอ็นเอบาร์โค้ดของตัวอย่างตะโขงที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ และตัวแทนสัตว์เลื้อยคลานในอันดับ Crocodylia ความยาว 639–645 คู่เบส จำนวนทั้งหมด 45 สาย 19 กลุ่ม ตามชนิดของสิ่งมีชีวิต

ชนิด	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
1	-																		
2	0.324	-																	
3	12.258	12.287	-																
4	18.305	18.533	19.288	-															
5	17.916	18.144	17.392	6.045	-														
6	18.637	18.875	18.480	8.712	8.659	-													
7	17.041	17.278	16.887	9.075	7.413	8.047	-												
8	18.901	19.141	18.466	8.880	9.153	0.892	8.769	-											
9	17.344	17.573	18.386	9.091	8.358	7.856	7.962	8.007	-										
10	17.915	18.154	18.004	8.014	7.997	3.405	7.254	4.098	7.175	-									
11	19.191	19.616	19.853	8.860	9.902	8.613	9.961	8.756	8.738	7.812	-								
12	17.837	18.244	19.620	24.577	22.664	23.334	21.860	23.980	23.060	23.526	22.773	-							
13	18.837	19.181	20.132	15.203	14.600	12.889	14.705	13.062	13.584	13.885	14.593	25.079	-						
14	21.755	22.006	18.067	17.823	18.555	18.898	18.519	18.718	16.801	18.287	18.173	26.319	15.278	-					
15	18.624	18.852	19.220	8.251	8.092	4.062	7.615	4.519	6.640	4.205	7.962	24.589	13.207	17.931	-				
16	16.765	17.168	17.832	21.586	19.700	19.957	18.187	20.742	18.004	19.918	19.398	14.877	20.736	23.335	20.333	-			
17	18.740	19.149	20.091	22.026	21.332	20.348	18.957	20.393	19.318	20.598	20.065	15.296	20.479	23.267	20.722	7.797	-		
18	18.756	18.994	18.410	8.271	8.950	4.283	8.098	4.734	8.499	3.462	7.739	23.527	13.435	17.975	4.427	19.463	19.704	-	
19	19.185	19.612	19.150	21.486	20.368	21.456	18.761	21.725	19.634	21.826	21.030	16.343	21.603	22.527	21.184	7.756	8.249	20.918	-

บทที่ 5

อภิปรายและสรุปผลการศึกษา

ตะโขงเป็นสัตว์เลื้อยคลานที่มีจำนวนเหลืออยู่น้อยมากในธรรมชาติของประเทศไทยและมีความเสี่ยงสูงที่จะสูญพันธุ์ไปจากธรรมชาติอย่างถาวร เพื่อป้องกันการเกิดขึ้นของเหตุการณ์ดังกล่าว สัตว์เลื้อยคลานชนิดนี้จึงได้รับการศึกษาในด้านวิธีการเพาะพันธุ์ที่เหมาะสม โดยมีจุดมุ่งหมายในการเพิ่มจำนวนตะโขงในศูนย์อนุรักษ์ต่าง ๆ (กิริติ กัญญา และคณะ, มปป.; ปัญญา ยังประภากร และคณะ, 2555; Bezuijen et al., 2014) อย่างไรก็ตามก็ต้องการความรู้ในด้านอื่น ๆ ของตะโขงยังคงไม่ได้รับความสนใจและศึกษามากเท่าใดนัก เพื่อเติมเต็มข้อมูลที่ขาดหายไปและให้ได้มาซึ่งข้อมูลที่ครบถ้วนของสัตว์เลื้อยคลานชนิดนี้ งานวิจัยครั้งนี้ได้ทำการศึกษาลักษณะพันธุกรรมของตะโขงจากศูนย์เพาะเลี้ยงในประเทศไทยเป็นครั้งแรก โดยใช้ยีน cytochrome c oxidase subunit I (COI) เป็นเครื่องหมายโมเลกุล โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI และทำการคัดเลือกช่วงดีเอ็นเอที่เหมาะสมในยีนนี้ เพื่อนำมาใช้ในการระบุอัตลักษณ์หรือเป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดของตะโขง รวมทั้งสร้างฐานข้อมูลทางพันธุกรรมระดับโมเลกุลจากยีน COI ของตะโขงที่มาจากศูนย์เพาะเลี้ยงของประเทศไทย

การศึกษานี้ได้ทำการออกแบบไพรเมอร์ขึ้นมาใหม่สำหรับการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันเพื่อเพิ่มจำนวนยีน COI จากผลการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ COITSF1–COITSR1 ทำให้สามารถสรุปได้ว่า เมื่อทำปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ดังกล่าวจะได้แถบของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาดประมาณ 1,800 คู่เบส ทั้งนี้ในการทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเข้าเกาะระหว่างไพรเมอร์ COITSF1–COITSR1 กับยีน COI หรือ annealing temperature ที่เหมาะสม ด้วยอุณหภูมิใกล้เคียงกับ melting temperature (T_m) ของไพรเมอร์ทั้งสอง อันได้แก่ 53.4 และ 52.3 องศาเซลเซียส ตามลำดับ พบว่าได้แถบของผลิตภัณฑ์ที่ไม่ชัดเจน (ภาพที่ 4.1) ดังนั้นจึงทำการเพิ่มอุณหภูมิในขั้น annealing temperature ให้สูงขึ้น และเลือกทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส จนได้แถบของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่มีสีเข้มชัดเจน แสดงถึงการมีของผลิตภัณฑ์หรือดีเอ็นเอที่สนใจปริมาณสูง อีกทั้งยังมีแถบของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์เพียงแถบเดียว แสดงถึงการได้ผลิตภัณฑ์ที่จำเพาะ นอกจากนี้ยังเลือกใช้น้ำยาพีซีอาร์สำเร็จรูปยี่ห้อ MyTaq™ HS Red Mix เนื่องจากแถบของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากน้ำยาพีซีอาร์สำเร็จรูปดังกล่าวจะมีความเข้มและชัดเจนมากที่สุด (ภาพที่ 4.3)

นอกจากนี้เมื่อทำการเพิ่มปริมาตรสุทธิของปฏิกิริยาพีซีอาร์ซึ่งใช้ไพรเมอร์ COITSF1–COITSR1 เพื่อให้เพียงพอต่อการส่งไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าเกิดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ในปริมาณน้อยและไม่เพียงพอที่จะตรวจสอบผ่านการย้อมและส่องตรวจภายใต้แสงยูวีได้ ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากการมีปริมาณหรือความเข้มข้นของตัวอย่างดีเอ็นเอตั้งต้นที่นำมาใช้เป็นแม่พิมพ์ต่ำเกินไป จึงได้ทำการลดขนาดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ต้องการเพิ่มปริมาณให้สั้นลงเหลือความยาวประมาณ 1,200 คู่เบส ผ่านการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์อีกครั้งด้วยเทคนิค semi-nested PCR โดยใช้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาด้วยไพรเมอร์ COITSF1–

COITSR1 เป็นแม่พิมพ์แทน ร่วมกับการใช้ไพรเมอร์ COITSF1–COITS1172R และ COITS400F–COITSR1 จนได้แถบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาด 1,200 คู่เบส ที่ชัดเจน และสามารถนำไปใช้หาลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ครบถ้วนสมบูรณ์ ด้วยไพรเมอร์ที่ได้รับการออกแบบในการศึกษาครั้งนี้

จากผลการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ของตะโขง พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีน COI จากตัวอย่างตะโขงทั้งหมด 2 ตัวอย่าง ได้แก่ ตัวอย่างตะโขงหมายเลข 1 และ หมายเลข 10 มีความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์เส้นละ 1,584 คู่เบส และมีลำดับที่เหมือนกันตลอดทั้งสาย สอดคล้องกับการที่ตะโขงทั้งสองตัวอย่างฟักออกมาจากครอกเดียวกันและมีแม่ตัวเดียวกัน จึงได้รับการถ่ายทอดไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ (mtDNA) ชุดเดียวกัน เนื่องจาก mtDNA เป็นสารพันธุกรรมที่มีการถ่ายทอดผ่านทางแม่สู่ลูก (Sato and Sato, 2013)

เมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ที่สมบูรณ์ตลอดทั้งสาย (complete sequence) ของตัวอย่างตะโขงในศูนย์เพาะเลี้ยงที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของตะโขงที่พบในฐานข้อมูลของ NCBI *Tomistoma schlegelii* [GenBank accession number: NC_011074.1] จากงานวิจัยของ Janke และคณะ (2005) พบว่า มีลำดับนิวคลีโอไทด์ยาวเท่ากันคือ 1,584 คู่เบส และมีความเหมือนกัน (similarity) สูงถึง 99.87% อีกทั้งเมื่อทำการวิเคราะห์ความห่างทางพันธุกรรมของยีน COI บางส่วน (partial sequence) ของตัวอย่างตะโขงที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของตะโขงทั้งหมดในฐานข้อมูล NCBI ทั้งหมด 5 เส้น โดยนำมาเปรียบเทียบกันเป็นคู่ พบว่ามีจำนวนตำแหน่งของนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกันเพียง 2–3 ตำแหน่ง และมีค่าความห่างทางพันธุกรรมภายในชนิด (intraspecific genetic distance) น้อยกว่า 1.6% (อธิบายรายละเอียดในหัวข้อที่ 4.3.3) สอดคล้องกับการศึกษาของ Hebert และคณะ (2004) ที่พบว่าความห่างทางพันธุกรรมภายในชนิดของนกที่อาศัยอยู่ในทวีปอเมริกาเหนือจากฐานข้อมูลของ NCBI จำนวน 260 ชนิด มีค่าเฉลี่ยอยู่ในช่วง 0.27–1.24% เช่นเดียวกับการศึกษาของ Nneji และคณะ (2019) ที่ทำการประเมินประสิทธิภาพของดีเอ็นเอบาร์โค้ดสำหรับใช้ระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตในกลุ่มสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก และ สัตว์เลื้อยคลานในประเทศไนจีเรีย พบว่า *Agama agama* มีค่าความห่างทางพันธุกรรมภายในชนิดเท่ากับ 1.90% นอกจากนี้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้จะสอดคล้องกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของตะโขงในฐานข้อมูลแล้ว การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ยังแสดงให้เห็นว่าเราสามารถทำการจำแนกชนิดของตะโขงด้วยเทคนิคทางอนุชีววิทยาโดยใช้ยีน COI เป็นเครื่องหมายโมเลกุลได้อีกด้วย

นอกจากนี้เมื่อทำการวิเคราะห์ค่าความห่างทางพันธุกรรมระหว่างชนิด (interspecific genetic distance) ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI เฉพาะบริเวณดีเอ็นเอบาร์โค้ดความยาว 645 คู่เบส ระหว่างตะโขงที่มีถิ่นกำเนิดในประเทศไทย, ตะโขงที่มีการเผยแพร่ในฐานข้อมูลของ NCBI และตัวแทนสัตว์เลื้อยคลานในอันดับ Crocodylia ชนิดอื่น ๆ ที่มีการเผยแพร่ในฐานข้อมูลของ NCBI รวมลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 15 เส้น พบว่าให้ค่าความห่างทางพันธุกรรมเฉลี่ยอยู่ในช่วง 13.707–15.834% (ตารางที่ 4.37) ซึ่งสูงกว่าค่าความห่างทางพันธุกรรมที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ตลอดทั้งสาย ที่มีค่าเฉลี่ยอยู่

ในช่วง 13.333–15.390% ในทุกรูปแบบการคำนวณ แสดงให้เห็นถึงการมีความแปรผันของลำดับนิวคลีโอไทด์ ในช่วงต้นของยีน COI ที่สูงกว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ตลอดทั้งสาย ในตัวแทนสัตว์เลื้อยคลานในอันดับ Crocodylia รวมไปถึงตะโขงซึ่งเป็นสิ่งมีชีวิตที่สนใจและถูกนำมาวิเคราะห์ในงานวิจัยครั้งนี้ สอดคล้องกับการศึกษาที่มีมาก่อนหน้าที่พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ด้าน 3' มีความแปรผันน้อยหรือมีความอนุรักษ์สูง (conserved region) ต่างกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในด้าน 5' ของยีน COI ในช่วงความยาว 658 คู่เบสแรกที่มีความแปรผันสูงและอยู่ในระดับที่เหมาะสมสำหรับการนำมาใช้เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อการระบุชนิดของสิ่งมีชีวิต (Folmer et al., 1994; Hebert et al., 2003)

ในการคัดเลือกลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดของสิ่งมีชีวิต ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เลือกใช้ควรมีความแตกต่างทางพันธุกรรมเหมาะสม กล่าวคือ มีค่าความห่างทางพันธุกรรมภายในชนิดต่ำกว่า 2% (Avisé, 2000) และมีค่าความห่างทางพันธุกรรมระหว่างชนิดที่สูง (สุชาติ สุธร่ง, 2553) ในการศึกษาของ Hebert และคณะ (2003) ระบุว่าค่าความห่างทางพันธุกรรมระหว่างชนิดของสัตว์เลื้อยคลานและสัตว์เลี้ยวลูกด้วยน้ำนมเมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI บริเวณดีเอ็นเอบาร์โค้ด ควรมีค่าอยู่ในช่วง 4–32% ซึ่งช่วงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI เฉพาะดีเอ็นเอบาร์โค้ด ความยาว 645 คู่เบส ที่ทำการคัดเลือกในการศึกษาครั้งนี้ แสดงค่าความห่างทางพันธุกรรมภายในชนิดของ *T. schlegelii* เมื่อคำนวณด้วยแบบจำลอง Tamura-Nei เท่ากับ 0.311% (ตารางที่ 4.44) ในขณะที่แสดงค่าความห่างทางพันธุกรรมระหว่างชนิดอยู่ในช่วง 13.115–23.002% ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Eaton และคณะ (2010) ที่ทำการคัดเลือกดีเอ็นเอบาร์โค้ดของสัตว์มีกระดูกสันหลังในอันดับ Crocodylia ที่สามารถใช้ประโยชน์ได้ในแอฟริกาและอเมริกาใต้บางชนิด ที่แสดงให้เห็นว่าช่วงลำดับนิวคลีโอไทด์ความยาว 645 คู่เบส ของยีน COI บริเวณเดียวกันสามารถนำมาใช้ระบุชนิดสัตว์เลื้อยคลานในกลุ่มนี้ได้ โดยมีค่าความห่างทางพันธุกรรมภายในชนิดอยู่ในช่วง 0.00–1.92% และมีค่าความห่างทางพันธุกรรมระหว่างชนิดเฉลี่ยอยู่ที่ 9.80% แสดงให้เห็นว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ที่ถูกคัดเลือกเป็นครั้งแรกจากตะโขงในสถานเพาะเลี้ยงของประเทศไทยในการศึกษาครั้งนี้ สามารถใช้ระบุชนิดของตะโขงได้จริงและให้ผลที่สอดคล้องกับการจำแนกชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา รวมทั้งมีความเหมาะสมที่จะนำไปใช้เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดของตะโขงของประเทศไทยในการศึกษาต่อไปได้อีกด้วย อย่างไรก็ตามการพิจารณาไพรเมอร์ที่สามารถใช้เพิ่มจำนวนยีน COI บริเวณนี้ให้มีความจำเพาะเจาะจงก่อให้เกิดความแม่นยำในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เพื่อให้การระบุชนิดของตะโขงโดยใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพและมีความสะดวกมากยิ่งขึ้น

เอกสารอ้างอิง

ภาษาไทย

- กิริติ กันยา, สุนทร จอกลาง, บุญชู ปอกระโทก, อุดม สายทะเล และ ตฤยวรรธ สุทธิแพทย์. มปป. การจับคู่ผสมพันธุ์ตะโขงในกรงเพาะเลี้ยงของสวนสัตว์นครราชสีมา. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://www.zoothailand.org/article_attach/attach_BKTsl1ASnk.pdf [5 เมษายน พ.ศ. 2563]
- กำหนดให้สัตว์ป่าบางชนิดเป็นสัตว์ป่าคุ้มครอง. 2546. ราชกิจจานุเบกษา, เล่ม 120 ตอนที่ 74ก.
- ปัญญา ยังประภากร, จิตรภรณ์ ชาญราชกิจ และ กรวิกา ยังประภากร. 2555. การเพาะขยายพันธุ์ตะโขงในฟาร์มเลี้ยง. ใน: คณะทำงานสัมมนาทางวิชาการสัตว์ป่าสวนสัตว์ครั้งที่ 6 (บรรณาธิการ), สัมมนาทางวิชาการสัตว์ป่าสวนสัตว์ ครั้งที่ 6 FIGHTING EXTINCTION. 23–28. กรุงเทพฯ: องค์การสวนสัตว์ ในพระบรมราชูปถัมภ์.
- โพสท์ทูเดย์ (นามแฝง). 2562. สวนสัตว์โคราชโชว์ความสำเร็จเพาะขยายพันธุ์ “ตะโขง” จระเข้พันธุ์หายากที่สุดในไทย. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: <https://www.posttoday.com/social/local/597358> [12 มีนาคม พ.ศ. 2563]
- สกล สุนันทราภรณ์. 2557. การวิเคราะห์ความผันแปรของยีน cytochrome c oxidase subunit I ในไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอของเหาศีรษะ (*Pediculus humanus capitis*) ในประเทศไทย. กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สวนสัตว์นครราชสีมา. ม.ป.ป. ตะโขง. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://www.korat.zoothailand.org/ewt_news.php?n_id=384 [5 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2562]
- สิรินารถ ชัยชนะทอง, ยุทธมล ม่วงคราม และ วรวิทย์ วัชชวลค์. 2561. การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ด (DNA barcoding) ในการจำแนกชนิดสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเพื่อประโยชน์ในการอนุรักษ์สัตว์ป่าและสัตว์ใกล้สูญพันธุ์. ข่าวสารเทคโนโลยีชีวภาพการเกษตร AG-BIO. 10(1): 3–5.
- สุชาดา สุขหรั่ง. 2553. ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชสมุนไพรวิธีวิเคราะห์การใช้ประโยชน์ตัวอย่างจากงานวิจัยและเทคนิคพื้นฐานทางชีววิทยาโมเลกุล. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สุธิดา พลฤกษ์อุดม. 2555. สวนสัตว์สงขลานำตะโขงหรือจระเข้ปากกระทุงเหวสัตว์พันธุ์หายากและใกล้สูญพันธุ์กลับคืนถิ่นได้รับเทศกาลสงกรานต์. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://region6.prd.go.th/ewt_news.php?nid=240&filename=index [12 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2562]
- องค์การสวนสัตว์ในพระบรมราชูปถัมภ์. 2560. สารานุกรมสัตว์, ตะโขง. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://www.zoothailand.org/animal_view.php?detail_id=590&c_id= [12 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2562]

อานนท์ มุ่งลิ้ม. 2558. จังหวัดนครปฐมเปิดชมรมเกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงและอนุรักษ์จระเข้อย่างเป็นทางการ.

[ออนไลน์]. แหล่งที่มา:

http://ewt.prd.go.th/ewt/region8/ewt_news.php?nid=13876&filename=index_59 [12 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2562]

โครงการ วิชาชีวะ. 2555. ดีเอ็นเอบาร์โค้ด: เครื่องมือใหม่สำหรับการระบุชนิดทางชีวภาพ? DNA Barcodes: A New Tool for Biological Identifications. วารสารวิทยาศาสตร์ มข. 40(2): 396–407.

MGR Online (นามแฝง). 2550. ชาวบ้านตื่นหน้าเหมือนจระเข้โผล่ที่แท้ตะโขงสัตว์ป่าคุ้มครองหายาก.

[ออนไลน์]. แหล่งที่มา: <https://mgronline.com/local/detail/9500000136995> [12 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2562]

ภาษาอังกฤษ

Avise, J.C. 2000. Phylogeography: The History and Formation of Species. Cambridge: Harvard University Press.

Bezuijen, M., Hartoyo, P., Elliott, M. and Baker, B. 1997. Second Report on the Ecology of the False Gharial (*Tomistoma Schlegelii*) In Sumatera, Project Tomistoma: i-38. [Online] Available from: http://www.iucncsg.org/365_docs/attachments/protarea/Ecol-acea79fd.pdf. [5 April 2020].

Bezuijen, M., Webb, G., Hartoyo, P. and Samedi. 2001. Peat Swamp Forest and the False Gharial *Tomistoma schlegelii* (Crocodylia, Reptilia) in the Merang River, Eastern Sumatra, Indonesia. *Oryx*. 35(4): 301–307.

Bezuijen, M.R., Shwedick, B.M., Sommerlad, R., Stevenson, C. and Steubing, R.B. 2010. *Tomistoma schlegelii*. In: Manolis, S.C. and Stevenson, C. (Eds.), Crocodiles: Status Survey and Conservation Action Plan. 3rd ed. Crocodile Specialist Group Workshop. 133–138. Darwin: Crocodile Specialist Group.

Bezuijen, M.R., Shwedick, B., Simpson, B.K., Staniewicz, A. and Stuebing, R. 2014. *Tomistoma schlegelii*, The IUCN Red List of Threatened Species 2014. Available from: <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2014-1.RLTS.T21981A2780499.en>. [5 February 2019]

Bonke, R., Ihlow, F., Böhme, W. and Rödder, D. 2014. Movement Patterns of *Tomistoma schlegelii* in the Sekonyer Kanan River (Tanjung Puting National Park, Central Kalimantan, Indonesia): Preliminary Range Size Estimates. *Salamandra*. 50: 40–52.

Boore, J. 1999. Animal Mitochondrial Genomes. *Nucleic Acids Research*. 27(8): 1767–1780.

- Boratyn, G.M., Thierry-Mieg, J., Thierry-Mieg, D., Busby, B. and Madden, T.L. 2019. Magic-BLAST, an Accurate RNA-Seq Aligner for Long and Short Reads. *BMC Bioinformatics*. 20(450): 1–19.
- Brazaitis, P. 1973. The Identification of Living Crocodilians. *Zoologica*. 58: 59–101.
- Eaton, M.J., Martin, A., Thorbjarnarson, J. and Amato, G. 2009. Species-level Diversification of African Dwarf Crocodiles (Genus *Osteolaemus*): A Geographic and Phylogenetic Perspective. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 50: 496–506.
- Eaton, M.J., Meyers, G.L., Kolokotronis, S., Leslie, M.S., Martin, A.P. and Amato, G. 2010. Barcoding Bushmeat: Molecular Identification of Central African and South American Harvested Vertebrates. *Conservation Genetics*. 11: 1389–1404.
- Flach, T. 2018. El Fotógrafo Que Retrata Animales En Peligro De Extinción. [Online]. Available from: https://elpais.com/elpais/2018/01/05/punto_de_enfoque/1515161027_405200.html [5 April 2020].
- Folmer, O., Black, M., Wr, H., Lutz, R. and Vrijenhoek, R. 1994. DNA Primers for Amplification of Mitochondrial Cytochrome C Oxidase Subunit I from Diverse Metazoan Invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*. 3: 294–299.
- Gilbert, C., Hernandez, S., Flores-Benabib, J., Smith, E. and Feschotte, C. 2011. Rampant Horizontal Transfer of Spin Transposons in Squamate Reptiles. *Molecular Biology and Evolution*. 29: 503–515.
- Gruny, L. 2017. St. Augustine Alligator Farm Zoological Park. [Online]. Available from: <https://www.facebook.com/TheAlligatorFarm/photos/a.10151867024260803/10155739274740803/?type=3&theater> [5 April 2020].
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. 41: 95–98.
- Hebert, P., Cywinska, A. and Ball, S.L. 2003. Biological Identifications Through DNA Barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*. 270: 313–321.
- Hebert, P., Ratnasingham, S. and deWaard, J.R. 2003. Barcoding Animal Life: Cytochrome C Oxidase Subunit 1 Divergences Among Closely Related Species. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 270: 96–99.
- Hebert, P., Stoeckle, M., Zemlak, T., Francis, C. 2004. Identification of Birds Through DNA Barcodes. *PLOS Biology*. 2: 1657–1663.

- Hou, G., Chen, W., Lu, H., Cheng, F. and Xie, S. 2018. Developing a DNA Barcode Library for Perciform Fishes in The South China Sea: Species Identification, Accuracy and Cryptic Diversity. *Molecular Ecology Resources*. 18: 137–146.
- Iijima, M. and Kobayashi, Y. 2019. Mosaic Nature in The Skeleton of East Asian Crocodylians Fills the Morphological Gap Between Tomistominae and Gavialinae. *Cladistics*. 35: 623–632.
- International Barcode of Life. 2019. Bio Scan. [Online]. Available from: <https://ibol.org/programs/bioscan> [5 April 2020].
- Janke, A., Gullberg, A., Hughes, S., Aggarwal, R. and Arnason, U. 2005. Mitogenomic Analyses Place the Gharial (*Gavialis gangeticus*) on the Crocodile Tree and Provide Pre-K/T Divergence Times for Most Crocodylians. *Journal of Molecular Evolution*. 61: 620–626.
- Jukes, T.H. and Cantor, C.R. 1969. Evolution of Protein Molecules. In: Munro, H.N., (Ed.), *Mammalian Protein Metabolism*. 21–132. New York: Academic Press.
- Kaur, T., Rovie-Ryan, J., Sabki, M., Chong, L. and Ong, A. 2013. Genetic Diversity of *Tomistoma schlegelii* Inferred from mtDNA Markers. *Biochemical Genetics*. 51: 275–295.
- Kimura, M. 1980. A Simple Method for Estimating Evolutionary Rate of Base Substitutions Through Comparative Studies of Nucleotide Sequences. *Journal of Molecular Evolution*. 16: 111–120.
- Kirkness, E., Haas, B., Sun, W., Braig, H., Perotti, A., Clark, J., Lee, S., Robertson, H., Kennedy, R., Elhaik, E., Gerlach, D., Kriventseva, E., Elisk, C., Graur, D., Hill, C., Veenstra, J., Walenz, B., Tubio, J., Ribeiro, J. and Pittendrigh, B. 2010. Genome Sequences of the Human Body Louse and Its Primary Endosymbiont Provide Insights into the Permanent Parasitic Lifestyle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 107: 12168–12173.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. and Tamura, K. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution*. 35: 1547–1549.
- Nneji, L., Adeola, A.C., Okeyoyin, A.O., Oladipo, O.C., Saidu, Y., Usongo, J.Y. and Ugwumba, A.A.A. 2019. Assessing the Effectiveness of Molecular Data for Species Identification and Diversity Studies of Nigerian Herpetofauna. *Mitochondrial DNA Part B*. 4(1): 589–593.
- Man, Z., Yishu, W., Peng, Y. and Wu, X. 2011. Crocodylian Phylogeny Inferred from Twelve Mitochondrial Protein-Coding Genes, With New Complete Mitochondrial Genomic

- Sequences for *Crocodylus acutus* and *Crocodylus novaeguineae*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 60: 62–67.
- Mathew, A., Ganesan, M., Majid, R. and Beastall, C. 2011. Breeding of False Gharial (*Tomistoma schlegelii*) at Zoo Negara, Malaysia, Zoo Negara. [Online]. Available from: <http://zoonegaramalaysia.my/RPFalseGharial.pdf> [5 April 2020].
- Moore, B.C., Fitri, W. and Augustine, L. 2020. Crocodylian Conservation and Evolution Insights from an Anatomical and Histological Examination of Phalli from Male False Gharial (*Tomistoma schlegelii*). *Anatomia, Histologia, Embryologia*. 00: 1–12.
- Murray, C.M., Crother, B.I. and Doody, J.S. 2020. The Evolution of Crocodylian Nesting Ecology and Behavior. *Ecology and Evolution*. 10: 131–149.
- Pappalardo, A.M., Cuttitta, A., Sardella, A., Musco, M., Maggio, T., Patti, B., Mazzola, S. and Ferrito, V. 2015. DNA Barcoding and COI Sequence Variation in Mediterranean Lanternfishes Larvae. *Hydrobiologia*. 749: 155–167.
- Piras, P., Colangelo, P., Adams, D.C., Buscalioni, A., Cubo, J., Kotsakis, T., Meloro, C. and Raia, P. 2010. The *Gavialis–Tomistoma* Debate: The Contribution of Skull Ontogenetic Allometry and Growth Trajectories to the Study of Crocodylian Relationships. *Evolution & Development*. 12: 568–579.
- Rachmawan, D. and Brend, S. 2009. Human-*Tomistoma* Interactions in Central Kalimantan, Indonesian Borneo. *Crocodile Specialist Group Newsletter*. 28(1): 9–11.
- Rödder, D., Engler, J.O., Bonke, R., Weinsheimer, F. and Pertel, W. 2010. Fading of the Last Giants: An Assessment of Habitat Availability of the Sunda Gharial *Tomistoma schlegelii* and Coverage with Protected Areas. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*. 20: 678–684.
- Roos, J., Aggarwal, R. and Janke, A. 2007. Extended Mitogenomic Phylogenetic Analyses Yield New Insight into Crocodylian Evolution and Their Survival of the Cretaceous-Tertiary Boundary. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 45: 663–673.
- Sadleir, R. and Makovicky, P. 2008. Cranial Shape and Correlated Characters in Crocodylian Evolution. *Journal of Evolutionary Biology*. 21: 1578–1596.
- Sato, M. and Sato, K. 2013. Maternal Inheritance of Mitochondrial DNA by Diverse Mechanisms to Eliminate Paternal Mitochondrial DNA. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*. 1833(8): 1979–1984.
- Selvaraj, G. 2012. *Tomistoma schlegelii* (False Gharial), Diet. *Herpetological Review*. 43(4): 608–609.

- Smith, M.A. 1916. A List of the Crocodiles, Tortoises, Turtles and Lizards at Present Known to Inhabit Siam. *Natural History Bulletin of the Siam Society*. 2: 48–57.
- Staniewicz, A. 2012. Diet, Distribution, Demography and Habitat Preferences of *Tomistoma schlegelii* and *Crocodylus siamensis* in Danau Mesangat, Kalimantan Timur, Indonesia, May–June 2012. United Kingdom: University of Bristol. Unpublished.
- Stuebing, R.B., Bezuijen, M.R., Auliya, M. and Voris, H.K. 2006. The Current and Historic Distribution of *Tomistoma schlegelii* (the False Gharial) (Müller, 1838) (Crocodylia, Reptilia). *The Raffles Bulletin of Zoology*. 54(1): 181–197.
- Stuebing, R. 2013. Mohamed bin Zayed Species project number 0925309. [Online]. Available from: <https://www.speciesconservation.org/case-studies-projects/siamese-crocodile/309>. [1 April 2020]
- Tajima, F. and Nei, M. 1984. Estimation of Evolutionary Distance Between Nucleotide Sequences. *Molecular Biology and Evolution*. 1: 269–285.
- Tamura, K. 1992. Estimation of the Number of Nucleotide Substitutions When There Are Strong Transition-Transversion And G + C-Content Biases. *Molecular Biology and Evolution*. 9: 678–687.
- Tamura, K. and Nei, M. 1993. Estimation of the Number of Nucleotide Substitutions in the Control Region of Mitochondrial DNA in Humans and Chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*. 10: 512–526.
- Tamura, K., Nei M. and Kumar, S. 2004. Prospects for Inferring Very Large Phylogenies by Using the Neighbor-Joining Method. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 101: 11030–11035.
- Tamura, K. and Kumar, S. 2002. Evolutionary Distance Estimation Under Heterogeneous Substitution Pattern Among Lineages. *Molecular Biology and Evolution*. 19: 1727–1736.
- Taylor, E.H. 1970. The Turtles and Crocodiles of Thailand and Adjacent Waters, With a Synoptic Herpetological Bibliography. *The University of Kansas Science Bulletin*. XLIX: 87–179.
- Venegas–Anaya, M., Crawford, A.J., Galvan, A.H.E., Sanjur, O., Densmore, L.D. and Bermingham, E. 2008. Mitochondrial DNA Phylogeography of Caiman Crocodiles in Mesoamerica and South America. *Journal of Experimental Zoology*. 309A: 614–627.
- Weaver, J.P., Rodriguez, D., Venegas–Anaya, M., Cedeno–Vasquez, J.R., Forstner, M.R.J. and Densmore, D.A. 2008. Genetic Characterization of Captive Cuban Crocodiles

- (*Crocodylus rhombifer*) and Evidence of Hybridization with the American Crocodile (*Crocodylus acutus*). *Journal of Experimental Zoology*. 309A: 600–613.
- Willis, R., McAliley, L., Neeley, E. and Densmore, L. 2007. Evidence for Placing the False Gharial (*Tomistoma schlegelii*) into the Family Gavialidae: Inferences from Nuclear Gene Sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 43: 787–794.
- Yan, P. and Li, Y. 2018. *Tomistoma schlegelii* Cytochrome C Oxidase Subunit I (COI) Gene, Partial Cds; Mitochondrial. [Online]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MH161364.1> [1 April 2020].
- Yoshino, K., Ishida, T., Nagano, T. and Setiawan, Y. 2010. Land Cover Pattern Analysis of Peat Swamp Lands in Southeast Asia. *International Archives of the Photogrammetry, Remote Sensing and Spatial Information Science*. 38: 941–946.