จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนกองทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานผลการวิจัย

ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมเชิงวิวัฒนาการของไก่ฟ้าหางลายขวาง นกแว่น และนกยูงไทย โดยวิเคราะห์จากไซโตโครมบี

โดย

รศ.วีณา เมฆวิชัย
ผศ.ดร.สุจินดา มาลัยวิจิตนนท์
อ.ดร.สุกมล ศรีขวัญ
อ.ดร.ทวีศักดิ์ ตีระวัฒนพงษ์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

มีนาคม 2544

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยเป็นอย่างยิ่ง ที่จัดสรรเงินทุนวิจัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช ประจำปีการเงิน 2542 (ครั้งที่ 4) และขอขอบคุณคณบดี รองคณบดีฝ่ายวิจัย หัวหน้าภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้การสนับสนุนงานวิจัย ขอขอบคุณ คณะแพทยศาสตร์ ที่ได้อนุญาตให้ใช้เครื่อง Automated DNA Sequenser ขอขอบคุณ คุณศรชัย สังคเลิศ จากฝ่ายเพาะเลี้ยงสัตว์ป่าและเจ้าหน้าที่จากองค์การสวนสัตว์ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเก็บตัวอย่าง ขอขอบคุณ ดร. ต่อศักดิ์ ลีลานนท์ ที่ได้วิเคราะห์ค่า transition bias โดยโปรแกรม PAUP 1998 ให้ ท้ายนี้ขอขอบคุณคณะกรรมการติดตามและประเมินผลโครงการวิจัยที่ได้ให้ข้อเสนอแนะทำให้ผลงานนี้สมบรูณ์ ตลอดจนผู้ที่เกี่ยวข้องทุกท่านที่ได้ให้ความร่วมมือและช่วยเหลือในการวิจัยให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เลขหมู่ จุฬ
วท 15
เลขทะเบียน 010929
วัน.เดือน.ปี 27 กพ. 45

ชื่อโครงการวิจัย ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมเชิงวิวัฒนาการของไก่ฟ้าหางลายขวาง นกแว่น และนกยูงไทย

ชื่อผู้วิจัย รองศาสตราจารย์วีณา เมฆวิชัย
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุจินดา มาลัยวิจิตนนท์
อาจารย์ ดร.สุกมล ศรีขวัญ
อาจารย์ ดร.ทวีศักดิ์ ดีระวัฒนพงษ์

เดือนและปีที่ทำวิจัยเสร็จ มีนาคม 2544

บทคัดย่อ

การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมเชิงวิวัฒนาการของไก่ฟ้าหางลายขวาง นกแว่นสีน้ำตาล นกแว่นสีเทา นกหว้า และนกยูงไทย 5 ชนิด จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของไซโตโครมบีในไมโตคอนเดรียจำนวน 280 คู่เบส พบว่ามีความผันแปรของนิวคลีโอไทด์ 66 แห่ง มีความผันแปรที่สามารถนำไปคำนวณหาไฟโลเจนนิติคทรีจำนวน 29 แห่ง การเปลี่ยนแปลงส่วนใหญ่เป็นแบบทรานซิชัน พบมากที่โคดอนที่สามและเป็นเบสชนิดกัวนินในเปอร์เซนต์ต่ำที่สุด 13.76 เปอร์เซนต์ จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมเชิงวิวัฒนาการ โดยวิธีพาซิมโมนี พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มไก่ฟ้าได้เป็น 3 กลุ่ม คือ ไก่ฟ้าหางลายขวาง นกยูง และกลุ่มนกหว้า นกแว่น นอกจากนั้นพบว่านกแว่นสีน้ำตาลและนกแว่นสีเทามีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมากที่สุด และทั้งสองชนิดนี้มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับนกหว้ามากกว่านกยูงและไก่ฟ้าหางลายขวาง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Title	Phylogenetic relationship among Hume's Pheasant Peacock Pheasant and Peafowl based on cytochrom b
ชื่อผู้วิจัย	Associate Professor Wina Meckvichai
	Assistance Professor Dr. Suchinda Malaivijitnond
	Archan Dr. Sukamol Srikwan
	Archan Dr. Taweesak Tirawatanapong
Month / year	March 2001

Abstract

Phylogenetic relationship among five species of Hume's Pheasant, Malaysian Peacock Pheasant, Grey Pheasant, Great Argus and Green Peafowl were studied based on sequence of mitochondrial cytochrom b 280 base pairs. The total number of variable and phylogenetically informative sites were 66 and 29, respectively. Nucleotide substitution was high frequency in transition, especially in third position codons and deficiency of guanine (13.76%). Phylogenetic analysis by parsimony method appeared that their are three divergent groups of Hume's Pheasant, Green Peafowl and Peacock Pheasant. Malaysian and Grey Peacock Pheasant were the most closely related and this group was more closely related to Great Aurgus than Peafowl and Hume's Pheasant.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ ii
บทคัดย่อภาษาไทย iii
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ iv
สารบัญ v
รายการตารางประกอบ vi
รายการภาพประกอบ vii
บทที่ 1
บทนำ 1
การสำรวจแนวความคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง 7
บทที่ 2
วิธีดำเนินการวิจัย 9
บทที่ 3
ผลการวิจัย 11
บทที่ 4
การอภิปรายผล 22
บทที่ 5
ข้อสรุปและข้อเสนอแนะ 25
เอกสารอ้างอิง 27
ภาคผนวก 32

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการตารางประกอบ

		หน้า
ตารางที่ 1	เปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวน 280 คู่เบส ของไก่ฟ้าหางลายขวาง นกแว่นสีน้ำตาล นกแว่นสีเทา นกหว้า และนกยูง	20
ตารางที่ 2	แสดงค่า pairwise distance ของไก่ฟ้าหางลายขวาง นกแว่นสีน้ำตาล นกแว่นสีเทา นกหว้า และ นกยูง	21

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการภาพประกอบ

หน้า

รูปที่ 1 แสดงไก่ฟ้าหางลายขวาง 13
รูปที่ 2 แสดงนกแว่นสีน้ำตาล 13
รูปที่ 3 แสดงนกแว่นสีเทา 14
รูปที่ 4 แสดงนกหว้า 14
รูปที่ 5 แสดงนกยูง 15
รูปที่ 6 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไซโตโครมบีของไก่ฟ้าหางลายขวาง 16
นกแว่นสีน้ำตาล นกแว่นสีเทา นกหว้า และนกยูง
รูปที่ 7 แสดง phylogenetic tree ที่วิเคราะห์แบบ parsimony 18
และค้นหา optimal tree โดย heuristic method
และแสดงค่า bootstrapping ของไก่ฟ้าหางลายขวาง
นกแว่นสีน้ำตาล นกแว่นสีเทา นกหว้า และนกยูง
รูปที่ 8 แสดง pairwise distance cytochrome b ของไก่ฟ้าหางลายขวาง 19
นกแว่นสีน้ำตาล นกแว่นสีเทา นกหว้า และนกยูง และค่าอัตราส่วนของ
transition ต่อ transversion

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1
บทนำ

ปัจจุบันมีการพัฒนาและขยายงานด้านเศรษฐกิจและสังคม ทำให้พื้นที่ที่ใช้ประกอบกิจและที่อยู่อาศัยขยายไปอย่างรวดเร็ว กินที่ลุกล้ำเข้าไปยังพื้นที่ที่เป็นแหล่งอาศัยและแหล่งผลิตทรัพยากรธรรมชาติ ทำให้สัตว์ป่าในธรรมชาติมีจำนวนลดน้อยลง บางชนิดถูกล่าและคุกคามทำให้สัตว์เหล่านี้หายากและใกล้จะสูญพันธุ์ จากรายงานของสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ปี 1991 พบว่าไก่ฟ้าหลายชนิดของประเทศไทยที่มีสถานภาพเป็นสัตว์ป่าที่ใกล้สูญพันธุ์อย่างยิ่ง (Critical endanger) ได้แก่ ไก่ฟ้าสีน้ำตาล และไก่ฟ้าหน้าเขียว ส่วนชนิดที่มีสถานภาพใกล้สูญพันธุ์ (Endanger) ได้แก่ ไก่ฟ้าหางลายขวาง นกหว้าและนกยูง นอกจากนี้ยังมีชนิดที่อยู่ในสถานภาพซึ่งมีแนวโน้มใกล้สูญพันธุ์ คือ ไก่ฟ้าพญาลอ

ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการศึกษาอย่างเร่งด่วน ทั้งทางด้านความหลากหลายของชนิด ยีน และนิเวศน์วิทยา ทั้งประชากรที่อยู่ในธรรมชาติและในกรงเลี้ยง การศึกษาในครั้งนี้เป็นการนำเอาวิธีการทางอณูพันธุศาสตร์ มาประยุกต์ใช้วิเคราะห์ความผันแปรของยีนของสัตว์ปีกเป็นแห่งแรกของประเทศไทย เพื่อประโยชน์ในการจัดหมวดหมู่ของสิ่งมีชีวิต ซึ่งในอดีตศาสตร์ทางด้านนี้ใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphology) ลักษณะทางมิญชวิทยา (Histology) และเซลล์ ตลอดจนลักษณะทางวิทยาเอ็มบริโอ (Embryology) มาประกอบในการศึกษา ต่อมาในระยะหลังมีการค้นพบซากดึกดำบรรพ์มากขึ้น และมีการนำเอาอณูพันธุศาสตร์มาเป็นเครื่องมือที่ใช้ในการจัดหมวดหมู่ของ สิ่งมีชีวิตแพร่หลายขึ้น ขณะที่ Willi Hennic นักวิทยาศาสตร์ชาวเยอรมัน ได้ค้นพบและเขียนทฤษฎีต่าง ๆ ทาง Cladistic ซึ่งเป็นวิธีที่นำเอาวิวัฒนาการมาใช้จัดหมวดหมู่ของสิ่งมีชีวิตขึ้นใหม่ โดยเขียนเป็นภาษาเยอรมันตั้งแต่ปี ค.ศ. 1950 ซึ่งต่อมาแปลเป็นภาษาอังกฤษเมื่อปี ค.ศ. 1966 ทำให้นักชีววิทยารู้จักวิธีทาง Cladistic กันมากขึ้น ประกอบกับนักวิทยาศาสตร์ชาวอเมริกา Swofford, D. L., 1993 ได้ผลิตโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูปเพื่อวิเคราะห์ข้อมูลทาง Molecular phylogenetic ซึ่งใช้ character เป็นหลักและวิเคราะห์ข้อมูลแบบ Parsimony โดยถือว่าลักษณะที่ปรากฏให้เห็นแต่ละลักษณะเป็นแต่ละ character ลำดับเบสหรือ character ที่เปลี่ยนแปลงไปเนื่องจากวิวัฒนาการน้อยที่สุดจะแยกเป็น taxa (กลุ่มของสิ่งมีชีวิตในระดับ Order หรือ Family หรือ Genus หรือ Species หรือ Subspecies หรือ population ตลอดจน individaul ก็ได้) ใหม่ โปรแกรมนี้คือ PAUP ซึ่งในระยะแรกใช้ได้เฉพาะ Operating System ที่เป็น Macintoch ต่อมาในปี ค.ศ. 2000 สามารถใช้กับ Windows ได้ นอกจากนั้นยังมีโปรแกรม PHYLIP ที่ผลิตโดย Filsenstein J., 1993 โปรแกรมนี้ใช้ได้กับ Window, DOS และ Macintosh ใช้วิเคราะห์ได้ทั้งที่ใช้หลักการทาง character

และ distance (เช่น Pairwise distance โดยพิจารณาอัตราของลำดับเบสที่เปลี่ยนแปลงไปเนื่องจากวิวัฒนาการต่อตำแหน่งของนิวคลีโอไทด์) การคำนวณค่า distance นี้มีหลายแบบจะต้องเลือกแบบที่เหมาะสมกับลักษณะข้อมูลที่ศึกษาเพื่อจะได้ phylogenetic tree ที่ถูกต้อง นอกจากนั้นยังมีโปรแกรม MEGA ใช้กับ DOS เป็นการหา phylogenetic tree โดยใช้ distance เป็นหลัก ผลิตโดย Kumar *et. al.* (1993) ปัจจุบันการศึกษา phylogenetic ได้แพร่หลายอย่างรวดเร็วและกว้างขวาง ทำให้การจัดหมวดหมู่และลำดับของสิ่งมีชีวิตในระยะสิบปีที่ผ่านมานี้เปลี่ยนโฉมหน้าใหม่ ต่างไปจากเดิมอย่างมากมาย

ผลจากการศึกษาด้านต่าง ๆ เช่น อนุกรมวิธาน วิวัฒนาการ นิเวศวิทยา เหล่านี้เมื่อนำมาประมวลเข้าด้วยกันแล้ว สามารถใช้เป็นแนวทางในการตัดสินใจวางแผนและนโยบายในการจัดและการอนุรักษ์ทรัพยากรธรรมชาติของประเทศไทย

ไก่ฟ้าหางลายขวาง

ชื่อสามัญ Hume's Pheasant

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Syrmaticus humiae*

ลักษณะ เพศผู้มีสีแดงอมม่วง ความยาวลำตัว 60-90 เซนติเมตร แผ่นหนังบริเวณหน้ามีสีแดงสด จงอยปากหนาใช้เขี่ยและจิกอาหาร ขนที่คอสีม่วงเหลือบน้ำเงินเป็นมัน ขนบริเวณหลังและท้องสีแดงก่ำ ขนปีกสีแดงก่ำตัดกับลายขาวพาดตามขวาง ขนคลุมปีกสีม่วงเหลือบน้ำเงิน ขนบริเวณตะโพกสีดำ ปลายขอบขาวเรียงซ้อนกันคล้ายเกล็ดปลา หางยาว สีขาวและมีบั้งสีดำ 10-11 บั้ง ขาเล็กมีเดือย ไม่ชอบใช้ขาเขี่ยอาหาร เพศเมียมีขนาดเล็กกว่า ขนลำตัวสีน้ำตาล หน้าไม่มีแผ่นหนังสีแดงเหมือนเพศผู้ มีเฉพาะขอบรอบตาเท่านั้น หางมีสีน้ำตาลและลายบั้งตามขวางสีน้ำตาลดำ ขามีเดือยแต่สั้นกว่าเพศผู้ หากินเป็นฝูงเล็ก ๆ อาศัยอยู่ในป่าดิบเขาหรือป่าสนเขาตามเขาที่สูงจากระดับน้ำทะเลตั้งแต่ 1,100 เมตรขึ้นไป มีถิ่นกำเนิดในเมียนม่าตะวันออก ตะวันตกเฉียงใต้ของยูนาน และในประเทศไทยพบบริเวณภูเขาสูงที่จังหวัดเชียงใหม่ และรอยต่อกับจังหวัดแม่ฮ่องสอน ไก่ฟ้าชนิดนี้มีจำนวนน้อยมาก ไก่ฟ้าหางลายขวางมี 2 ชนิดย่อย ประเทศไทยพบเพียง 1 ชนิดย่อย คือ *Syrmaticus humiae burmannicus* (รูปที่ 1)

นกแว่นสีน้ำตาล

ชื่อสามัญ Malay Brown Peacock Pheasant

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Polyplectron malacense*

ลักษณะ มีลักษณะของไก่และนกยูงมารวมกัน เพศผู้ลำตัวเพรียว ขนาดเล็กกว่าไก่ฟ้าชนิดอื่นๆ มีสีน้ำตาล ความยาวของลำตัวตั้งแต่ปลายจงอยปากถึงปลายหาง 56-76 เซนติเมตร หน้ามีแผ่นเนื้อสีส้มอ่อน มีขนหงอนบนหัวเป็นพู่สีน้ำตาล หางยาว ปลายมน ขนปีกและหางมีแว่นกลมสีเขียวอมน้ำเงินคล้ายแววนกยูง ขามักมีเดือยข้างละ 2 คู่ เพศผู้โตเต็มวัยภายใน 2 ปี เพศเมียจะมีขนาดเล็กกว่า สีขนอ่อนกว่าและหางสั้นกว่า และไม่มีขนหงอนเหมือนเพศผู้ ขาไม่มีเดือย ในธรรมชาติมักพบเป็นคู่หรือฝูงเล็ก ๆ 4-5 ตัว วางไข่ครั้งละ 1 ฟอง อาศัยในป่าดิบชื้น มีถิ่นกำเนิดตลอดเทือกเขาตะนาวศรีจนถึงแหลมมลายู และเกาะสุมาตราในประเทศไทย พบเฉพาะในภาคใต้ตั้งแต่จังหวัดชุมพรลงไปถึงใต้สุดของประเทศ จึงมักเรียกนกแว่นใต้ ปัจจุบันแทบจะไม่มีใครพบเห็นเนื่องจากอยู่ในป่ารกทึบและมีจำนวนน้อย

นกแว่นสีน้ำตาลมี 2 ชนิดย่อย ประเทศไทยพบเพียง 1 ชนิดย่อย คือ *Polyplectron malacense malacense* (รูปที่ 2)

นกแว่นสีเทา

ชื่อสามัญ Gray Peacock pheasant

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Polyplectron bicalcaratum*

ลักษณะ นกแว่นสีเทามีลักษณะคล้ายนกแว่นสีน้ำตาลต่างกันตรงหน้าที่เป็นแผ่นเนื้อที่หน้ามีสีอ่อนกว่า ขนหงอนจะสั้นกว่า หางจะเรียวกว่า นกแว่นสีน้ำตาลและลดหลั่นกันไป ขามักมีเดือยข้างละ 2 คู่ เพศเมียมีสีและขนาดเล็กกว่าเพศผู้ พบในป่าดงดิบ ถิ่นกำเนิดตั้งแต่เทือกเขาหิมาลัย พม่า ไทย ลาวทางเหนือ และตอนเหนือและตอนกลางของเวียตนาม ในประเทศไทยพบทางด้านเหนือ ด้านตะวันตกและตะวันออกเฉียงเหนือบริเวณที่ราบสูงของจังหวัดเพชรบูรณ์

นกแว่นสีเทามี 5 ชนิดย่อย ในประเทศไทยพบเพียง 1 ชนิดย่อย คือ *Polyplectron bicalcaratum bicalcaratum* (รูปที่ 3)

นกหว้า

ชื่อสามัญ Great Argus

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Argusianus argus*

ลักษณะ เพศผู้มีขนาดใหญ่ตัวยาว 76-100 เซนติเมตร มีสีน้ำตาลปนเทา หนังที่หน้าและคอมีสีฟ้า ปากสีเหลือง กลางหัวมีขนลักษณะคล้ายหงอน ขาสีแดง ไม่มีเดือย ขนปีก secondary ยาว มีดวงกลมคล้ายแววนกยูง ขนหางคู่กลางยาวเลยขนหางคู่อื่น ๆ มาก เพศเมียมีลักษณะคล้ายเพศผู้ แต่ตัวเล็กกว่า หางสั้นกว่า ขนหางคู่กลางไม่ยาวยื่นออกมาเหมือนเพศผู้ สีขนไม่สดเหมือนนก-ในกลุ่มไก่ฟ้าอื่น ๆ แต่ลวดลายที่ขนนั้นสวยงามมาก ต้องการลานในการผสมพันธุ์ วางไข่ครั้งละ 2 ใบ เพศผู้เต็มวัยเมื่ออายุ 3 ปี อาศัยอยู่ในป่าดิบชื้น ตั้งแต่ที่ราบไปจนที่สูงจากระดับน้ำทะเล 900 เมตร ถิ่นกำเนิดในไทย มาเลเซีย สุมาตรา ในประเทศไทยพบเฉพาะในภาคใต้ตั้งแต่ประจวบคีรีขันธ์ลงไป ปัจจุบันมีจำนวนน้อยลงมากเนื่องจากถูกล่าและคุกคาม

นกหว้ามี 2 ชนิดย่อย ประเทศไทยมีเพียง 1 ชนิดย่อย คือ *Argusianus argus argus* (รูปที่ 4)

นกยูง

ชื่อสามัญ Green Peafowl

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Pavo muticus*

ลักษณะ นกยูงเป็นนกขนาดใหญ่ ลำตัวยาว 102-245 เซนติเมตร คอและขายาว ขนบริเวณลำตัวมีสีเขียวเหลือบบรอนซ์ ขอบปลายขนมีสีเขียวอ่อนเรียงซ้อนกันคล้ายเกล็ดปลา บริเวณหลังและท้องมีสีเขียวแกมน้ำเงิน ขนปีกและขนหางมีสีน้ำตาล แผ่นหนังบริเวณหน้ามีสีฟ้า รอบตาเป็นสีเหลือง มีขนบนหัวเป็นกระจุกสี-เขียวตั้งตรง ปากและแข้งสีดำ มีเดือยยาว ในฤดูผสมพันธุ์นกยูงเพศผู้จะมีขนคลุมหางยาว และมีแววกลมสีฟ้าเหลือบเขียว นกยูงเพศเมียขนาดจะเล็กกว่าและสีจางกว่าเพศผู้เล็กน้อย ขนบริเวณหลังสีเขียว ขนหางสีน้ำตาลสลับด้วยสีน้ำตาลเข้ม ขนคลุมหางไม่ยาวและไม่มีแววเป็นวงกลมเหมือนเพศผู้ ขน primary ที่ 9 และ 10 มีลายดำตามขวาง ซึ่งต่างกับเพศผู้ที่มีสีน้ำตาลล้วน พบตามป่าโปร่งใกล้แหล่งน้ำ และตามไร่ชายป่า อยู่กันเป็นฝูงเล็ก ๆ 3-4 ตัว วางไข่ตั้งแต่ 4-8 ฟอง อาศัยอยู่ในป่าพื้นราบไปจนถึงความสูง 900 เมตร มีถิ่นกำเนิดในเมียนม่า ไทย จีนตอนใต้ ลาว เขมร เวียดนาม ในประเทศไทยพบประชากรที่เป็นกลุ่มใหญ่ ในภาคตะวันตกบริเวณจังหวัดอุทัยธานีและภาคเหนือ จังหวัดพะเยา ในประเทศไทยพบ 2 ชนิดย่อย คือ *Pavo muticus imperator* พบในภาค-เหนือ ภาคตะวันตก และตะวันออกเฉียงเหนือ (รูปที่ 5) ส่วน *Pavo muticus muticus* พบเฉพาะภาคใต้ตั้งแต่คอคอดกระลงไป

การศึกษาความผันแปรของยีน เป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อนำผลที่ได้ไปศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของนกกลุ่ม Gallopheasant ในการนำเอาอณูพันธุศาสตร์มาตรวจสอบความผันแปรของยีนเพื่อศึกษาวิวัฒนาการมีหลายวิธี แต่ละวิธีจะมีข้อดีและข้อด้อยที่แตกต่างกัน การที่จะเลือกวิธีใดที่เหมาะสมนั้นต้องคำนึงถึงวิธีที่ถูกต้อง สามารถนำมาวิเคราะห์และแก้ปัญหาที่ต้องการได้ถูกจุดตลอดจนขีดจำกัดต่าง ๆ เช่น ถ้าสิ่งมีชีวิตที่ต้องการศึกษาเป็นสัตว์ที่หายากและมีจำนวนน้อยก็ไม่ควรจะเลือกเอาวิธีที่ต้องใช้เนื้อเยื่อมาศึกษาแล้วเกิดการบาดเจ็บหรือทำอันตราย หรือต้องฆ่าสัตว์ชนิดนั้น ๆ นอกจากนั้นยังต้องคำนึงถึงงบประมาณค่าใช้จ่ายและเวลาที่ใช้ในการศึกษาว่าเหมาะสมและคุ้มทุนที่จะใช้ในการศึกษาหรือไม่

การศึกษาความผันแปรของยีนสามารถศึกษาได้หลายวิธี เช่น

1. อโลไซม์ (allozyme)เป็นการศึกษาความผันแปรของเอนไซม์หรือโปรตีนที่อยู่ในร่างกายสิ่งมีชีวิต ซึ่งถูกควบคุมด้วยยีนของสิ่งมีชีวิตชนิดนั้น ๆ และตรวจผลของความแตกต่างของแถบสีของเอนไซม์ด้วยอิเลคโตรโพริซิส วิธีนี้ใช้งบประมาณในการศึกษาวิจัยไม่สูงจนเกินไป แต่มีข้อด้อยคือ ถ้าต้องการผลการศึกษาที่เห็นชัดเจน และจำนวนหลาย ๆ โลไซ จะต้องใช้เนื้อเยื่อที่มาจากตับ หรือเลือดตั้งแต่ 1 ลูกบาศก์เซนติเมตรขึ้นไป จึงจำเป็นต้องฆ่าสัตว์ทดลอง หรือทำให้สัตว์โดยเฉพาะสัตว์ปีกซึ่งมีขนาดเล็กต้องเสียเลือดไปจำนวนมาก หากสิ่งมีชีวิตที่ศึกษาเป็นสัตว์หายากและใกล้จะสูญพันธุ์ก็ไม่สามารถใช้วิธีนี้ได้ นอกจากนั้นในสัตว์ปีกเมื่อศึกษาโดยวิธีนี้มีค่า genetic distance ต่ำกว่าบรรดาสัตว์มีกระดูกสันหลังชนิดอื่น ๆ เช่น กบหรือสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม (Nei *et.al*, 1987) ดังนั้นการศึกษาด้วยวิธีนี้ถ้าทำในสัตว์ปีกก็ต้องใช้จำนวนตัวอย่างเป็นจำนวนมาก เพื่อให้ผลที่ได้มีความเชื่อถือในทางสถิติ จึงทำให้ต้องใช้เวลาในการศึกษาวิจัยเพิ่มขึ้น นอกจากนั้นการศึกษาวิธีนี้เป็นการศึกษาผลของยีน ซึ่งพบว่าเพียง 10 % ของดีเอนเอที่ทำหน้าที่ควบคุมการสร้างของกรดอะมิโน และสามารถตรวจพบได้จากการศึกษาโดยอโลไซม์ แต่การผันแปรของยีนในหลาย ๆ กรณีที่ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงลำดับของกรดอะมิโน จึงไม่สามารถตรวจพบโดยวิธีนี้

2. การใช้ดีเอนเอมาวิเคราะห์ด้วยวิธีต่าง ๆ (DNA analysis) ปัจจุบันกำลังเป็นวิธีที่น่าสนใจและนำมาใช้อย่างแพร่หลาย โดยเฉพาะภายหลังจากที่ทำการเพิ่มสายดีเอนเอในหลอดทดลอง (Polymerase chain reaction; PCR) วิธีนี้เหมาะสำหรับเก็บตัวอย่างสัตว์ได้สะดวกทั้งในภาคสนามและในกรงเลี้ยงโดยใช้ขน หรือหยดเลือดเพียง 1-2 หยด ก็สามารถนำมาศึกษาได้ โดยที่ไม่ต้องทำอันตรายและไม่ต้องฆ่าสิ่งมีชีวิต แต่มีข้อด้อยคือใช้งบประมาณในการศึกษาสูงกว่าวิธีแรก

การนำเอาดีเอนเอมาศึกษาความผันแปรของยีนมีหลายวิธี เช่น

Restriction fragment leugth polymorphism (RFLP) วิธีนี้สามารถศึกษาความผันแปรของยีนได้ง่ายกว่าวิธี Direct sequencing แต่ผลที่ได้มี resolution ไม่เหมาะที่จะหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมเชิงวิวัฒนาการในระดับ interspecific variation

Random amplification polymorphison (RAPD) เป็นวิธีที่ไม่ยุ่งยาก แต่เนื่องจากผลงานที่ตีพิมพ์เผยแพร่เกี่ยวกับการใช้เทคนิคนี้ในสัตว์ปีกมีน้อย จำเป็นจะต้องหา primer ที่เหมาะสมกับนกที่ต้องการศึกษาเองก่อน ซึ่งเป็นการสิ้นเปลืองเวลาและงบประมาณ

DNA finger print วิธีนี้เหมาะสำหรับศึกษาความผันแปรของยีนในสิ่งมีชีวิตที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน เช่น ระหว่างพ่อ แม่ ลูก หรือใช้ในการศึกษา mating system ของสัตว์ แต่ถ้านำไปศึกษาในกลุ่มประชากร หรือระดับ interspecific species ไม่เหมาะสม ทำให้ไม่สามารถหาลักษณะที่เป็น common character เพราะการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมเชิงวิวัฒนาการต้องมีลักษณะที่เป็น common character ร่วมกับบรรพบุรุษ จึงวิเคราะห์ผลได้ เนื่องจากยีนของแต่ละกลุ่มประชากรหรือแต่ละ species แตกต่างกันมากเกินไป

Simple sequence repeat (SSR) เป็นวิธีที่ใช้ในการศึกษาความผันแปรของยีนได้สะดวก แต่ขณะนี้การศึกษาในนกยังมีไม่มากนัก จึงต้องหายีนหลาย ๆ โลไซที่มีความผันแปรเองก่อน ซึ่งการคัดเลือกหา marker ที่เหมาะสมนี้นอกจากจะต้องใช้ marker จำนวนมากและ การที่จะได้ specific gene ที่ต้องการที่จะนำมาใช้ได้ก็ต้องมี gene frequency สูง จึงจะสามารถนำมาใช้ได้ ทำให้ต้องใช้สัตว์ที่ศึกษาเป็นจำนวนมาก นอกจากนั้น Microsatelite แต่ละ marker ที่ใช้กับสัตว์ที่ต่างชนิดกัน หรือชนิดย่อย หรือแม้กระทั่งประชากรที่ต่างกันก็ใช้ PCR conditin ที่ต่างกันอีก ทำให้สิ้นเปลืองเวลาและสิ้นเปลืองทุนทรัพย์ แต่ถ้าคัดเลือกหายีนที่ต้องการได้แล้ว หลังจากนั้นจะทำการศึกษาได้ง่าย ใช้เวลาน้อยกว่าการทำ direct sequencingและยังใช้ตัวอย่างสัตว์ที่ศึกษาน้อยด้วย หรืออาจจะรอเวลาจนกว่าผลทางนี้ตีพิมพ์เผยแพร่ออกมากๆก่อน แล้วจึงเลือกเอายีนที่เขาคัดเลือกมาแล้วมาศึกษาได้

Direct sequence วิธีนี้สามารถอ่านผลที่มี resolution สูง และสามารถนำมาศึกษาความผันแปรของยีนได้ ทั้งในการจำแนกระดับ species และ population ตลอดจนแต่ละ individual ซึ่งขึ้นกับการเลือกยีนที่ศึกษาและขึ้นกับกลุ่มสิ่งมีชีวิตที่ใช้ศึกษา นอกจากนั้นการศึกษาในเบื้องต้นยังใช้ตัวอย่างของสัตว์ที่ศึกษาจำนวนน้อย อาจจะใช้เพียง 1 หรือ 2-3 ตัวอย่าง หรืออาจมากถึง 10 ตัวอย่างขึ้นกับชนิดของสิ่งมีชีวิต (Hillis *et. al.*, 1936) ในนกยีนที่มีผู้นำมาศึกษากันมากคือ cyt.b COI COII 16S rRna นอกจากนั้นอัตราการผ่าเหล่าของไมโตคอนเดรียสูงกว่านิวเคลียส 10 เท่า และ ดีเอนเอของไมโตคอนเดรียของสัตว์ส่วนใหญ่ถ่ายทอดไปสู่ลูกหลานโดยผ่านทางแม่เท่านั้น

ดังนั้นลำดับนิวคลีโอไทด์ ที่ผันแปรไปเกิดจากการผ่าเหล่าเป็นกรณีเดียวซึ่งความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ นำมาใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมเชิงวิวัฒนาการได้เป็นอย่างดี ในการศึกษาครั้งนี้ ได้เลือกใช้ cytochrome b เป็น marker ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมเชิงวิวัฒนาการของกลุ่มไก่ฟ้าและนกยูงในระดับ interspecific level

การสำรวจแนวความคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การศึกษาความหลากหลายของชนิดพันธุ์และความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมเชิงวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต มีการนำเอาอณูพันธุกรรมมาศึกษา ทั้งในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง และสัตว์มีกระดูกสันหลังหลายชนิด การศึกษาอโลไซมน์โดยอิเลคโตโพริซิสเป็นวิธีการหนึ่งที่ศึกษาผลของยีน (gene products) ซึ่งพบว่าเพียง 10 % ของดีเอนเอที่ทำหน้าที่ควบคุมการสร้างกรดอะมิโน และสามารถตรวจพบได้โดยการศึกษาความผันแปรของอโลไซม์ และการผันแปรของยีนในหลายกรณีไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงลำดับของกรดอะมิโน (Cooke *et. al.*, 1987) ดังนั้นการศึกษาที่เกิดจากความผันแปรของอโลไซม์จึงต้องใช้ตัวอย่างสัตว์จำนวนมาก และจำนวนหลาย ๆ โลไซ จึงจะสามารถเห็นความผันแปรได้ Snell et al. 1991 ศึกษานกนางนวล 479 ตัว พบว่ามีความผันแปรของอโลไซม์เพียง 8 ใน 34 โลไซเท่านั้น Browne *et. al.* (1993) ศึกษา genetic divergence ของกลุ่มเป็ด พบว่ามี allozymic variation 6 โลไซจากการศึกษาทั้งหมด 20 โลไซ และยังมีรายงานจากสัตว์ปีกหลายกลุ่มไม่มีความผันแปรของอโลไซมน์เลย เช่นใน Spanish Imperial Eeagle (Negro et al., 1994)

ในระยะหลังมีนักวิทยาศาสตร์ได้พัฒนาเทคนิคการเพิ่มสายดีเอนเอในหลอดทดลอง (PCR) และนำเอามาประยุกต์ใช้ศึกษาความผันแปรของยีนในสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ และได้มีการพัฒนาเทคนิคไปมากจนในปัจจุบันสามารถใช้ขนและเลือดเพียง 1-2 หยด มาสกัดดีเอนเอเพื่อศึกษาโดยวิธี PCR ได้ Arctander *et. al.* (1994) ได้นำเอาขนนกมาสกัดดีเอนเอ และใช้วิธี PCR เพิ่มจำนวนดีเอน-เอและนำดีเอนเอที่เพิ่มจำนวนได้มาศึกษาทางด้าน phylogenetic population structure และ history traits Leeton *et. al.* (1993) สกัดดีเอนเอจากขนและหนังของสัตว์ในพิพิธภัณฑ์เพื่อใช้ในการศึกษา phylogeny Taberlet *et. al.* (1991) ได้สกัดขนนกเพื่อศึกษาดีเอนเอของนก

เนื่องจากดีเอนเอในไมโตคอนเดรีย มีอัตราการผันแปรของยีนสูงกว่าในนิวเคลียส 5-10 เท่า และการผันแปรนั้นส่วนใหญ่ถ่ายทอดผ่านไปทางแม่ฝ่ายเดียว การผันแปรที่เกิดขึ้นจึงไม่ได้เกิดจาก recombination (Wilson *et al.*, 1985) จึงทำให้ดีเอนเอในไมโตคอนเดรียมีประโยชน์ต่อการศึกษาทางด้าน reconstruction of phylogenetic relationship population structure และ intraspecific genetic variation ที่เกิดจากการแพร่กระจายทางภูมิศาสตร์ที่ต่างกัน

สำหรับสัตว์มีกระดูกสันหลังกลุ่มสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมและนกมีผู้คิดจะนำเอา cytochrome b มาใช้เป็น marker ในการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์อย่างแพร่หลาย เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมเชิงวิวัฒนาการของนกกลุ่มต่าง ๆ เช่น กลุ่มนกกระเรียง (Krajewski *et. al.*, 1994) กลุ่มนกเงือก (Morin *et. al.*, 1994 และ Srikwan *et. al.*, 1996) กลุ่มนกโพระดก (Layon *et. al.*, 1996) กลุ่มแร้งโลกเก่าและโลกใหม่ (Seibold และHelbig, 1995) กลุ่มนก bird of paradise (Nunn *et al.*, 1994) กลุ่มนกกระจอกและฟริ้นส์ (Groth, 1998) กลุ่มนกพง (Helbig และ Seibold, 1999) กลุ่มนกโทแดนและกลุ่มนกพง (Barker และLanyon, 2000) นอกจากนั้นยังมีการนำเอา cytochrom b มาศึกษาร่วมกับยีนอื่น ๆ ในไมโตคอนเดรีย เช่น CR, ATPase 6, ATPase 8, ND2, ND5, COI, COII, COIII และ 16S rRNA (Zink *et al.*, 1998; Kimballetal, 1999; Sato *et al.*, 1999; Krajewski *et al.*, 1999; Cibois *et al.*,1999; De Filippis และ Moore, 2000) นอกจากนั้นยังนำเอา cytochrom b มาเปรียบเทียบกับยีนอื่นในนิวเคลียส เช่น beta-fribinogen intron 7 (Johnson และ Clayton, 2000) ศึกษาในนกกลุ่มนกพิราบ นกเขา พบว่าอัตราการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์ของ nuclear intron ช้ากว่า cytochrome b 6 เท่า แต่ tree ที่ได้จาก intron จะให้ผลที่คงที่มากกว่า เนื่องจากมี multiple substitution ต่ำกว่า (Perychitko และ Moore, 2000) ศึกษานกกลุ่มนกหัวขวาน พบว่า cytochrome b มีอัตราการเปลี่ยแปลงของนิวคลีโอไทด์ของ cytochrome b เร็วกว่า nuclear intron 2 เท่า แต่ cytchrome b มีความเอนเอียงที่เกิดการเปลี่ยนแปลงที่โคดอนตำแหน่งที่ 3 ค่อนข้างสูง การใช้ nuclear intron ถึงแม้มี multiple substitution ต่ำกว่า แต่ก็มี homoplasy ต่ำ Kirchman *et. al.* (2000) ศึกษาความสัมพันธ์ในระหว่างกลุ่มนกนางแอ่น โดยใช้ microsatellite และ cytochrome b เป็น marker พบว่า ได้ผลที่แตกต่างกันและให้เหตุผลว่าการใช้ microsatellite นั้นให้ผลไม่ถูกต้องเนื่องจากมีความเอนเอียงที่เกิดจาก heterologous เมื่อใช้ microsatellite marker

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2
วิธีดำเนินการวิจัย

1. เก็บตัวอย่างเลือด

เก็บตัวอย่างเลือดของไก่ฟ้าต่อไปนี้อย่างละ 5 ตัว จากสถานีเพาะเลี้ยงและขยายพันธุ์สัตว์ป่าเขาสอยดาว อ.โป่งน้ำร้อน จ.จันทบุรี องค์การสวนสัตว์ดุสิต เขตรักกษาพันธุ์สัตว์ป่าดอยเชียงดาว จ.เชียงใหม่ หน่วยจัดการต้นน้ำน้ำคาง จ.น่าน และบ้านบ่อเบี้ย อ.เชียงม่วน จ.พะเยา

1. นกแว่นสีน้ำตาล
2. นกแว่นสีเทา
3. นกหว้า
4. นกยูง

โดยใช้เข็มเจาะเส้นเลือด subclavian vien แล้วหยดลงบนกระดาษกรอง 3-4 หยด ทิ้งไว้ให้แห้งในอากาศ ตามวิธีของ Walsh et al. (1991) และ Taberlet, et al. (1991) และขนนก ล้างด้วย 70% ethanol ที่รากขน ใช้กรรไกรตัดส่วนปลายรากขนยาว 5 มม. ตามวิธีของ Taberlet, et al. (1991)

2. สกัดดีเอนเอโดยใช้ 5 % chelex 100 ดัดแปลงมาจากวิธีของ Walsh et al. (1991) และ Singer-Sam et al. (1989)

3. เพิ่มปริมาณดีเอนเอ (mitochondrial DNA; cytochrom b region) ในหลอดทดลอง ดัดแปลงวิธีของ Morin et al. (1994) โดยใช้ primer ของ Anderson et al. (1981) คือ cytochrome b gene L14815 และ H 15150 มี sequence ของ primer จาก 5' ไป 3' ดังนี้ :

L 14815 (primer 1) : CCATCCAACA TCTCAGCATG ATGAA

H 15150 (primer 2) : GCCCCTCAGA ATGATATTTG TCCTC

4. ตรวจผลของดีเอนเอที่ได้ในข้อ (3) โดย 2 % agarose gel electrophoresis จากนั้นทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ Kit gene clean BIO 101

5. หาลำดับนิวคลิโอไทด์โดยดัดแปลงจากวิธีของ Morin et al. (1994) และ Singer-Sam (1990) และตามวิธี Dye terminator cycle sequencing kit

6. แยกลำดับของนิวคลิโอไทด์ โดย automated capillary electrophoresis

7. อ่านผลของลำดับนิวคลิโอไทด์โดยคอมพิวเตอร์ ทำ multiple sequence alignment โดยใช้โปรแกรม Clustal W domain ที่ http://www.EMBI.AC.UK/clustalW เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลิ

โอไทด์ของ cytochrome b sequence จากตัวอย่างที่ศึกษาเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของไก่ ที่ศึกษาโดย Desjardins et al. (1990)

8. วิเคราะห์ผลหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมเชิงวิวัฒนาการโดยใช้คอมพิวเตอร์โปรแกรม PAUP version 3.11 (Swofford, 1993) ซึ่งวิเคราะห์แบบ parsimony โดยใช้นกกระทา *Corturnix corturnix* เป็น out group ทดสอบความเชื่อถือของ phylogenetic tree ที่ได้โดย bootstrapping ทำซ้ำ 100 ครั้ง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3
ผลการวิจัย

ความผันแปรของไซโตโครมบีในไก่ฟ้าหางลายขวาง นกแว่น และนกยูง ในประเทศไทย โดยวิธี direct sequencing อ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ได้จำนวน 280 คู่เบส ตั้งแต่ L15031 ถึง L15311 มี variable รวมทั้งสิ้นเท่ากับ 66 ตำแหน่ง มี phylogenetic informative รวมทั้งสิ้นเท่ากับ 29 ตำแหน่ง ดังแสดงในรูปที่ 6

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไก่ฟ้าหางลายขวาง 2 ตัวอย่าง มี variable เท่ากับ 38 ตำแหน่ง จากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อ่านได้สูงสุด 280 คู่เบส เป็นการเปลี่ยนแบบ transversion เท่ากับ 23 ตำแหน่ง transition เท่ากับ 15 เป็นโคดอนที่หนึ่ง สอง และสาม เท่ากับ 2 1 และ 35 ตามลำดับ ดังตารางที่ 1

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของนกแว่นสีน้ำตาล 4 ตัวอย่าง มี varialble เท่ากับ 33 ตำแหน่ง จากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อ่านได้สูงสุด 291 คู่เบส เป็นการเปลี่ยนแบบ transversion เท่ากับ 17 ตำแหน่ง transition เท่ากับ 16 เป็นโคดอนที่ สอง และสาม เท่ากับ 2 และ 31 ตามลำดับ ดังตารางที่ 1

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของนกแว่นสีเทา 5 ตัวอย่าง มี varialble เท่ากับ 51 ตำแหน่ง จากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อ่านได้สูงสุด 291 คู่เบส เป็นการเปลี่ยนแบบ transversion เท่ากับ 22 ตำแหน่ง transition เท่ากับ 29 ตำแหน่ง เป็นโคดอนที่หนึ่ง สอง และสาม เท่ากับ 4, 5 และ 42 ตามลำดับ ดังตารางที่ 1

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของนกหว้า 5 ตัวอย่าง มี varialble เท่ากับ 33 ตำแหน่ง จากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อ่านได้สูงสุด 292 คู่เบส เป็นการเปลี่ยนแบบ transversion เท่ากับ 12 ตำแหน่ง transition เท่ากับ 21 ตำแหน่ง เป็นโคดอนที่หนึ่ง สอง และสาม เท่ากับ 3, 3 และ 27 ตามลำดับ ดังตารางที่ 1

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของนกยูง 5 ตัวอย่าง มี varialble เท่ากับ 34 ตำแหน่ง จากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อ่านได้สูงสุด 292 คู่เบส เป็นการเปลี่ยนแบบ transversion เท่ากับ 15 ตำแหน่ง transition เท่ากับ 19 ตำแหน่ง เป็นโคดอนที่หนึ่ง สอง และสาม เท่ากับ 4, 2 และ 28 ตามลำดับ ดังตารางที่ 1

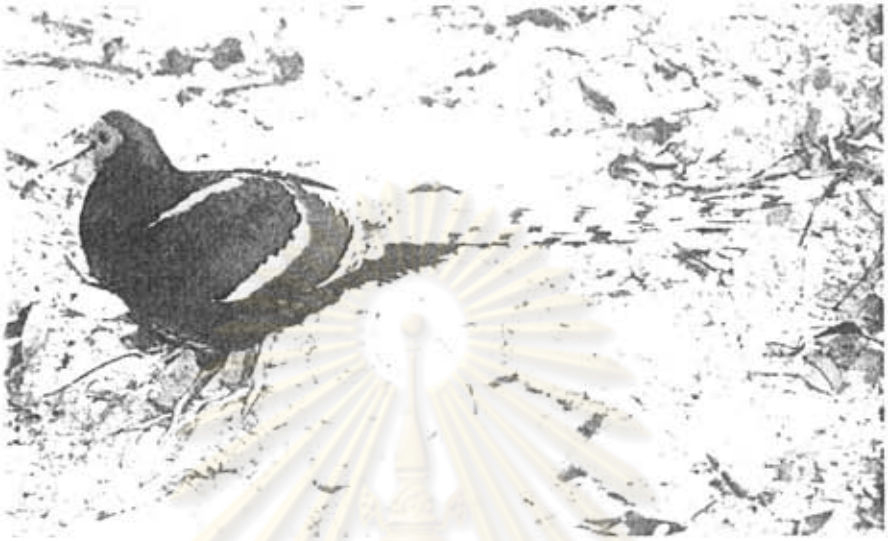
เนื่องจากผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้พบว่ามีความเอนเอียงเป็น transition สูงกว่า transversion จึงได้ทำการหาค่า transtion bias โดยใช้ Program PAUP (Swolford, 1998) ได้ค่าอัตราส่วนของ transition ต่อ transversion เท่ากับ 1.5 แสดงในรูปที่ 8

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

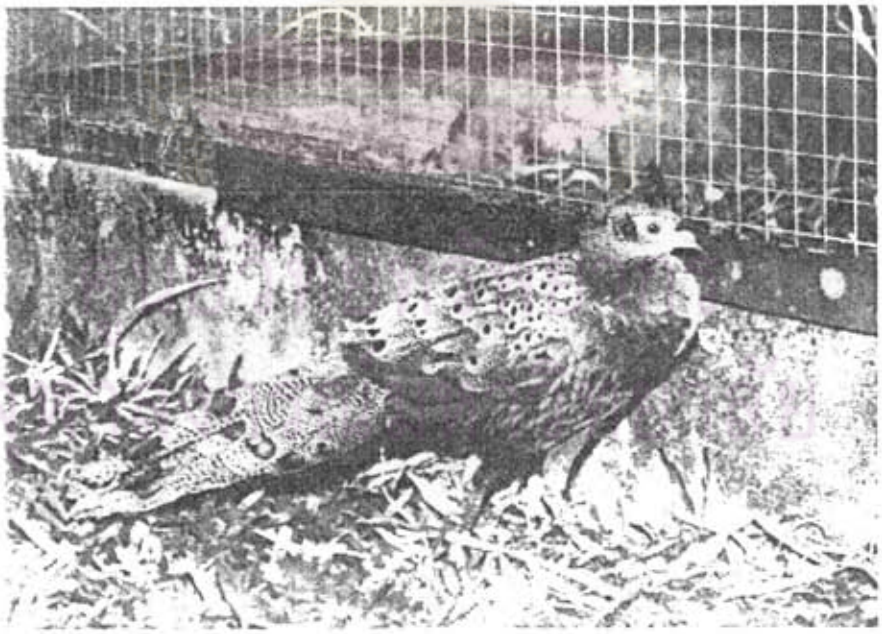
ค่าความผันแปรของนิวคลีโอไทด์ต่อตำแหน่งหรือ pairwise distance ของกลุ่มไก่ฟ้าแต่ละตัวในแต่ละชนิดที่ศึกษาแสดงในตารางที่ 2 พบว่าค่า pairwise distance ในไก่ฟ้าหางลายขวาง นกแว่นสีน้ำตาล นกแว่นสีเทา นกหว้า และนกยูงมีค่าเท่ากับ 0.000 - 0.007, 0.000-0.008, 0.000-0.096, 0.000-0.039 และ 0.000-0.014 ตามลำดับ

ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมเชิงวิวัฒนาการของไก่ฟ้าหางลายขวาง นกแว่นสีน้ำตาล นกแว่นสีเทา นกหว้า และนกยูง จากข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่นำไปวิเคราะห์ จำนวน 280 คู่เบส มี variable ทั้งหมด 66 ตำแหน่ง มี informative ทั้งหมด 29 ตำแหน่ง วิเคราะห์หา optimal tree โดย parsimony โดยใช้นกกระทา (*Coturnix coturnix*) เป็น out group และ ทดสอบความเชื่อถือของ phylogenetic tree โดยการให้น้ำหนักค่าเอนเอียงของ transititon ต่อ transversion เท่ากับ 2 : 1 ทดสอบความเชื่อถือของ phylogenetic tree ที่ได้ boostrapping ทำซ้ำ 100 ครั้ง กลุ่มไก่ฟ้าที่ศึกษามีวิวัฒนาการแยกออกเป็น 3 กลุ่ม คือ 1. ไก่ฟ้าหางลายขวาง 2. กลุ่มนกยูง 3. กลุ่มนกหว้า นกแว่น และพบว่านกแว่นสีน้ำตาลและนกแว่นสีเทามีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมากที่สุด โดยมีค่า bootstrapping เท่ากับ 95 ขณะเดียวกันกลุ่มนกแว่นมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับนกหว้าที่ค่า bootstrapping เท่ากับ 50 มากกว่าในไก่ฟ้าหางลายขวาง และนกยูงซึ่งมีค่า bootstrapping เท่ากับ 100 แสดงในรูปที่ 7

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



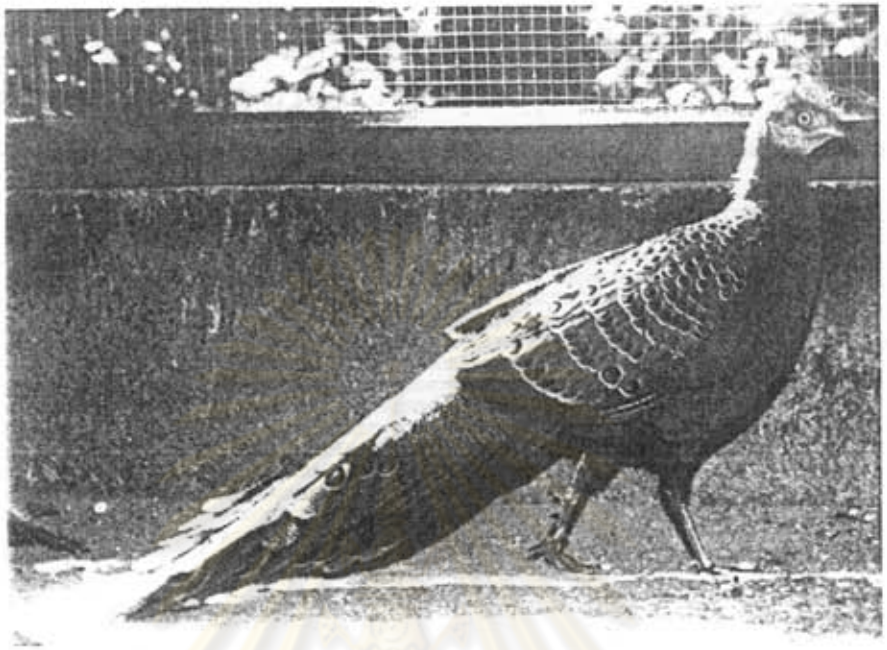
รูปที่ 1 ไก่ฟ้าหางลายขวาง (*Syrmaticus humiae*)



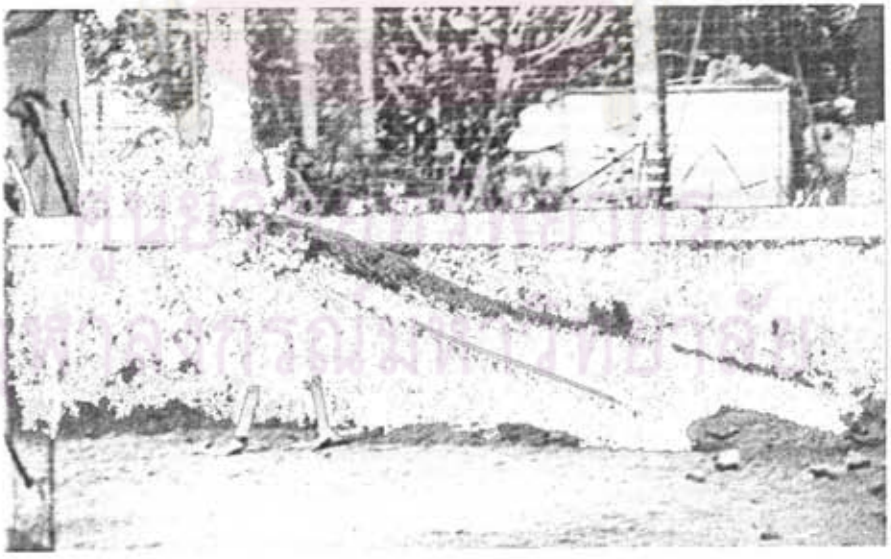
รูปที่ 2 นกแว่นสีน้ำตาล (*Polypectron malasense*)

รูปที่ 5 นกยูง (*Pavo muticus*)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3 นกแว่นสีเทา (*Polypecttron bicalcaratum*)



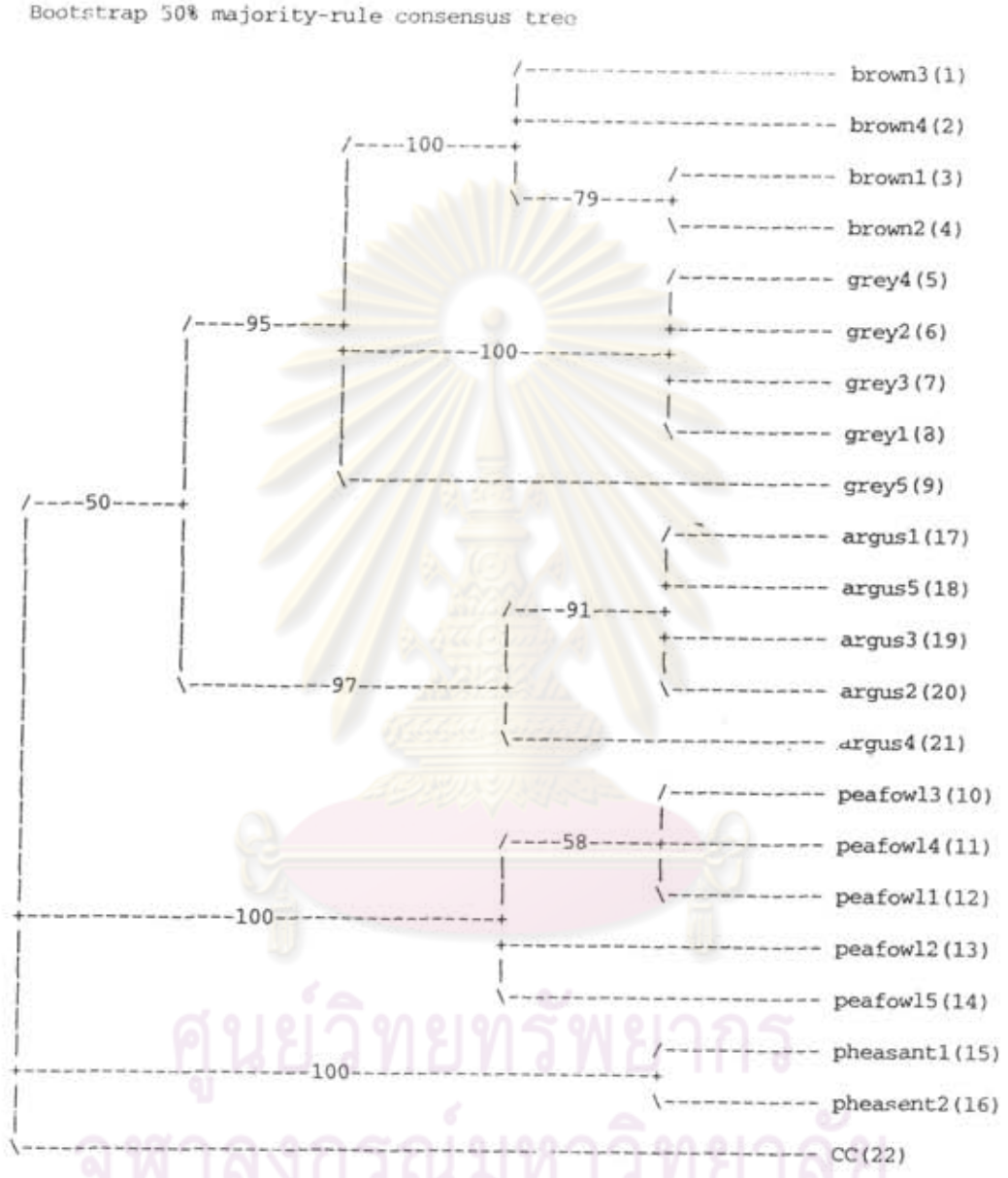
รูปที่ 4 นกหว้า (*Argusianus argus*)

รูปที่ 6 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไซโตโครมบีของไก่ฟ้าหางลายขวาง (pheasant 1,2) นกแว่นสีน้ำตาล (brown 1, 2, 3, 4) นกแว่นสีเทา (grey 1, 2, 3, 4, 5) นกหว้า (argus 1, 2, 3, 4, 5) และนกยูง (peafowl 11, 12, 13, 14, 15)

หมายเหตุ A = adenine C = cytocine G = guanine T = thymine N = missing * = นิวคลีโอไทด์ที่คล้ายกัน

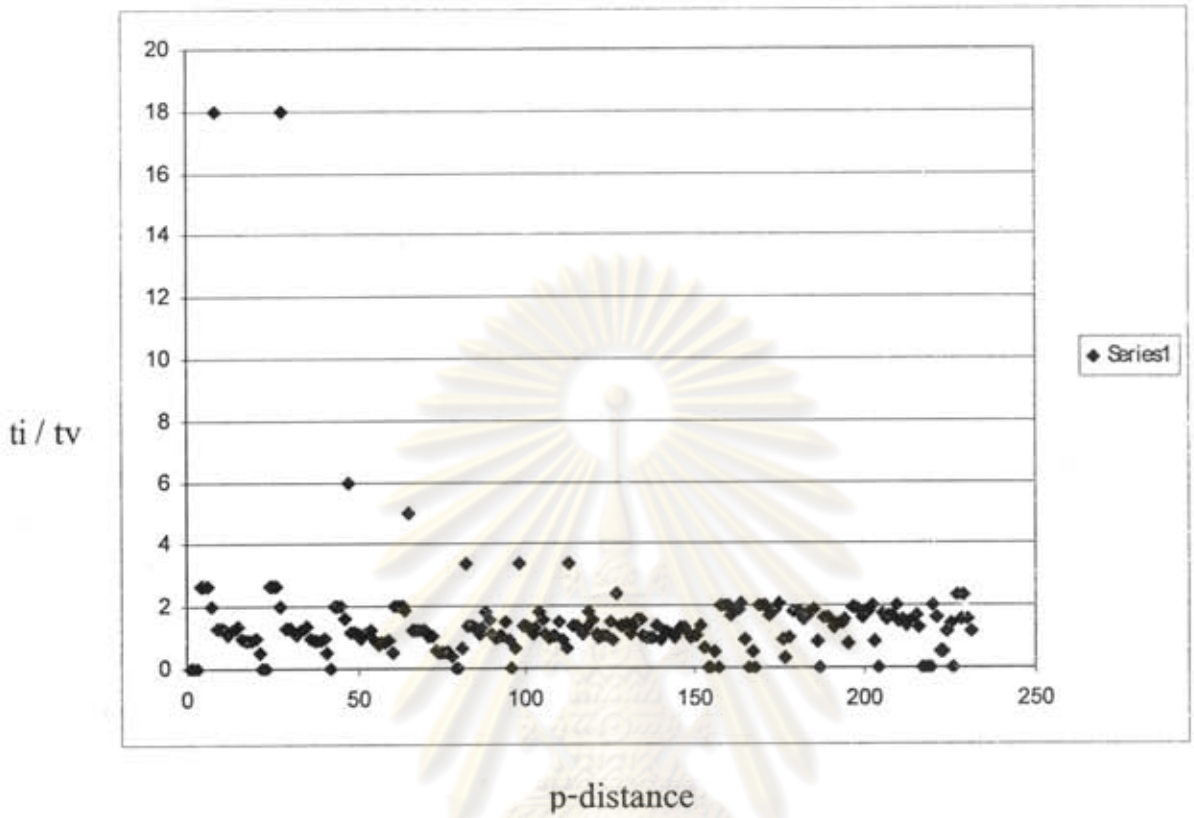
```
cytb_brown3          ACCGGACTCCTACTAGCCACACACTACACCGCAGATACCTCCCTCGCCTT 50
cytb_brown4          ACCGGACTCCTACTAGCCACACACTACACCGCAGATACCTCCCTCGCCTT 50
cytb_Brown1          ACCGGACTCCTACTAGCCACACACTACACCGCAGATACCTCCCTCGCCTT 50
cytb_argus2          ACCGGCCTCCTGCTAGCTGCACACTACACTGCAGACACCTCCTTAGCCTT 50
cytb_argus3          ACCGGCCTCCTGCTAGCTGCACACTACACTGCAGACACCTCCTTAGCCTT 50
cytb_argus1          ACCGGCCTCCTGCTAGCTGCACACTACACTGCAGACACCTCCTTAGCCTT 50
cytb_argus5          ACCGGCCTCCTGCTAGCTGCACACTACACTGCAGACACCTCCTTAGCCTT 50
cytb_argus4          ACCGGCCTCCTGCTAGCTGCACACTACACTGCAGACACCTCCTTAGCCTT 50
cytb_peafowl1        ACTGGCCTACTACTAGCGGTACACTACACCGTAGACACAGGCCTAGCCTT 50
cytb_peafowl4        ACTGGCCTACTACTAGCGGTACACTACACCGTAGACACATGCCTAGCCTT 50
cytb_peafowl3        ACTGGCCTACTACTAGCGGTACACTACACCGTAGACACATGCCTAGCCTT 50
cytb_peafowl5        ACTGGCCTACTACTAGCGGTACACTACACCGCAGACACATGCCTAGCCTT 50
cytb_peafowl2        ACTGGCCTACTACTAGCGGTACACTACACCGCAGACACATGGGTAGCCTT 50
cytb_pheasant1       ACCGGCCTACTACTAGCCATACATTACACTGCAGACACCTCCCTAGCCTT 50
cytb_pheasent2       ACCGGGCTACTACTAGCCATACATTACACTGCAGACACCTGCCTAGCCTT 50
cytb_chicken         ACCGGCCTACTACTAGCCATGCACTACACAGCAGACACATCCCTAGCCTT 50
cytb_grey5           ACCGGGCTCCTACTAGCCATACACTACACCGCAGACACCTCCCTCGCCTT 50
cytb_grey4           ACCGGCCTCCTGGTAGCCATACACTACACCGCAGATACTTCTCTCGCCTT 50
cytb_grey2           ACCGGCCTCCTGGTAGCCATACACTACACCGCAGATACTTCTCTCGCCTT 50
cytb_grey3           ACCGGCCTCCTGGTAGCCATACACTACACCGCAGATACTTCTCTCGCCTT 50
cytb_grey1           ACCGGCCTCCTGGTAGTCATACACTACACCGCAGATACTGGTCTCGCCTT 50
cytb_Brown2          NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNTCGCCTT 50
                                                                 * *****

cytb_brown3          CTGATCCGTAGCCCACACTTGCCGAAATGTACAGTATGGCTGACTCATCC 100
cytb_brown4          CTGATCCGTAGCCCACACTTGCCGAAATGTACAGTATGGCTGACTCATCC 100
cytb_Brown1          CTGATCCGTAGCCCACACTTGCCGAAATGTACAGTATGGCTGACTCATCC 100
cytb_argus2          CTCCTCCGTAGCACATATATGCCGAAACGTACAATACGGTTGACTCATCC 100
cytb_argus3          CTCCTCCGTAGCACATATATGCCGAAACGTACAATACGGTTGACTCATCC 100
cytb_argus1          CTCCTCCGTAGCACATATATGCCGAAACGTACAATACGGTTGACTCATCC 100
cytb_argus5          CTCCTCCGTAGCACATATATGCCGAAACGTACAATACGGTTGACTCATCC 100
cytb_argus4          CTCCTCCGTAGCACATATATGCCGAAACGTACAATACGGTTGACTCATCC 100
cytb_peafowl1        CTCCTCAGTAGCCCACACATGTCGAAACGTACAATACGGCTGACTCATCC 100
cytb_peafowl4        CTCCTCAGTAGCCCACACATGTCGAAACGTACAATACGGCTGACTCATCC 100
cytb_peafowl3        CTCCTCAGTAGCCCACACATGTCGAAACGTACAATACGGCTGACTCATCC 100
cytb_peafowl5        CTCCTCAGTAGCCCACACATGTCGAAACGTACAATACGGCTGACTCATCC 100
cytb_peafowl2        CTCCTCAGTAGCCCACACATGTCGAAACGTACAATACGGCTGACTCATCC 100
cytb_pheasant1       CTCCTCCGTAGCCCACACATGCCGAAACGTACAATACGGCTGACTCATCC 100
cytb_pheasent2       CTCCTCCGTAGCCCACACATGCCGAAACGTACAATACGGCTGACTCATCC 100
cytb_chicken         CTCCTCCGTAGCCCACACTTGCCGGAACGTACAATACGGCTGACTCATCC 100
cytb_grey5           CTGATCTGTAGCTCACACCTGCCGAAACGTACAATACGGCTGACTCATCC 100
cytb_grey4           CTGATCTGTGGCCCATACCTGCCGAAACGTACAATACGGATGACTCATCC 100
cytb_grey2           CTGATCTGTGGCCCATACCTGCCGAAACGTACAATACGGATGACTCATCC 100
cytb_grey3           CTGATCTGTGGCCCATACCTGCCGAAACGTACAATACGGATGACTCATCC 100
cytb_grey1           CTGATCTGTGGCCCATACCTGCCGAAACGTACAATACGGATGACTCATCC 100
cytb_Brown2          CTGATCCGTAGCCCACACTTGCCGAAATGTACAGTATGGCTGACTCATCC 100
                     **  ** ** ** ** *  ** ** ** ***** ** ** **********

cytb_brown3          GTAACCTCCATGCAAACGGCGCCTCATTCTTCTTCATCTGCATCTTCCTG 150
cytb_brown4          GTAACCTCCATGCAAACGGCGCCTCATTCTTCTTCATCTGCATCTTCCTG 150
cytb_Brown1          GTAACCTCCATGCAAACGGCGCCTCATTCTTCTTCATCTGCATCTTCCTG 150
cytb_argus2          GAAACCTCCATGCAAACGGCGCCTCATTCTTCTTCATCTGCATCTACCTT 150
cytb_argus3          GAAACCTCCATGCAAACGGCGCCTCATTCTTCTTCATCTGCATCTACCTT 150
cytb_argus1          GAAACCTCCATGCAAACGGCGCCTCATTCTTCTTCATCTGCATCTACCTT 150
cytb_argus5          GAAACCTCCATGCAAACGGCGCCTCATTCTTCTTCATCTGCATCTACCTT 150
cytb_argus4          GAAACCTCCATGCAAACGGCGCCTCATTCTTCTTCATCTGCATCTACCTT 150
cytb_peafowl1        GGAATCTTCATGCAAATGGAGCTTCATTCTTCTTCATCTGCATCTTCCTC 150
cytb_peafowl4        GGAATCTTCATGCAAATGGAGTTTCATTCTTCTTCATCTGCATCTTCCTC 150
cytb_peafowl3        GGAATCTTCATGCAAATGGAGCTTCATTCTTCTTCATCTGCATCTTCCTC 150
cytb_peafowl5        GGAATCTTCATGCAAATGGAGCTTCATTCTTCTTCATCTGCATCTTCCTC 150
cytb_peafowl2        GGAATCTTCATGCAAATGGAGCTTCATTCTTCTTCATCTGCATCTTCCTC 150
cytb_pheasant1       GAAATCTCCATGCAAACGGCGCCTCATTCTTTTTCATTTGCATCTTTCTT 150
cytb_pheasent2       GAAATCTCCATGCAAACGGCGCCTCATTCTTTTTCATTTGCATCTTTCTT 150
cytb_cnicken         GGAATCTCCACGCAAACGGCGCCTCATTCTTCTTCATCTGTATCTTCCTT 150
cytb_grey5           GTAACCTCCATGCAAACGGCGCCTCATTCTTCTTCATCTGCATTTTCCTG 150
cytb_grey4           GAAACCTCCATGCAAACGGCGCCTCATTCTTCTTCATCTGCATCTTCCTG 150
cytb_grey2           GAAACCTCCATGCAAACGGCGCCTCATTCTTCTTCATCTGCATCTTCCTG 150
cytb_grey3           GAAACCTCCATGCAAACGGCGCCTCATTCTTCTTCATCTGCATCTTCCTG 150
cytb_grey1           GAAACCTCCATGCAAACGGTGCCTCATTCTTCTTCATCTGCATCTTCCTG 150
cytb_Brown2          GTAACCTCCATGCAAACGGCGCCTCATTCTTCTTCATCTGCATCTTCCTG 150
                     * ** ** ** ***** ** *  ******** ***** ** ** *  **
```

```
cytb_brown3         CACATTGGACGTGGCCTCTACTACGGCTCCTACCTATACAAAGAAACCTG 200
cytb_brown4         CACATTGGACGTGGCCTCTACTACGGCTCCTACCTATACAAAGAAACCTG 200
cytb_Brown1         CACATTGGACGTGGCCTCTACTACGGCTCCTACCTATACAAAGAAACCTG 200
cytb_argus2         CACATCGGACGAGGCCTATACTACGGCTCCTACCTCTACAAAGAAACCTG 200
cytb_argus3         CACATCGGACGAGGCCTATACTACGGCTCCTACCTCTACAAAGAAACCTG 200
cytb_argus1         CACATCGGACGAGGCCTATACTACGGCTCCTACCTCTACAAAGAAACCTG 200
cytb_argus5         CACATCGGACGAGGCCTATACTACGGCTCCTACCTCTACAAAGAAACCTG 200
cytb_argus4         CACATCGGACGAGGCCTATACTACGGGTCCTACCTGTACAAAGAAACCTG 200
cytb_peafowl1       CACATCGGACGCGGCCTATACTACGGCTCCTACTTATACAAAGAAACCTG 200
cytb_peafowl4       CACATCGGACGCGGCCTATACTACGGCTCCTACTTATACAAAGAAACCTG 200
cytb_peafowl3       CACATCGGACGCGGCCTATACTACGGCTCCTACTTATACAAAGAAACCTG 200
cytb_peafowl5       CACATCGGACGCGGCCTATACTACGGCTCCTACTTATACAAAGAAACCTG 200
cytb_peafowl2       CACATCGGACGCGGCCTATACTACGGCTCCTACTTATACAAAGAAACCTG 200
cytb_pheasant1      CACATCGGCCGCGGCTTGTACTACGGCTCTTACCTATACAAAGAGACATG 200
cytb_pheasent2      CACATCGGCCGCGGCTTGTACTACGGCTCTTACCTATACAAAGAGACATG 200
cytb_chicken        CACATCGGACGAGGCCTATACTACGGCTCCTACCTCTACAAGGAAACCTG 200
cytb_grey5          CACATCGGACGTGGCTTATACTACGGCTCCTACTTATATAAAGAAACCTG 200
cytb_grey4          CACATTGGACACGGCCTATACTACGGCTCTTACTTATACAAAGAAACATG 200
cytb_grey2          CACATTGGACACGGCCTATACTACGGCTCTTACTTATACAAAGAAACATG 200
cytb_grey3          CACATTGGACACGGCCTATACTACGGCTCTTACTTATACAAAGAAACATG 200
cytb_grey1          CACATTGCACACGGCCTATACTACGGCTCTTACTTATACAAAGAAACATG 200
cytb_Brown2         CACATTGGACGTGGCCTCTACTACGGCTCCTACCTATACAAAGAAACCTG 200
                    ***** *  *  *** * ******** ** *** * ** ** ** ** **

cytb_brown3         AAACACAGGAGTCATCCTCCTGCTCACACTCATAGCAACTGCCTTCGTGG 250
cytb_brown4         AAACACAGGAGTCATCCTCCTGCTCACACTCATAGCAACTGCCTTCGTGG 250
cytb_Brown1         AAACACAGGAGTCATCCTCCTGCTCACACTCATAGCAACTGCCTTGCTGG 250
cytb_argus2         AAACACAGGAGTAATCCTCCTCCTCACACTCATAGCAACTGCATTCGTAG 250
cytb_argus3         AAACACAGGAGTAATCCTCCTCCTCACACTCATAGCAACTGCATTCGTAG 250
cytb_argus1         AAACACAGGAGTAATCCTCCTCCTCGCACTCATAGCAACTGCATTCGTAG 250
cytb_argus5         AAACACAGGAGTAATCCTCCTCCTCGCACTCATAGCAACTGCATTCGTAG 250
cytb_argus4         AAACACAGGAGTAATCCTCCTCCTTGCACTCATAGCAACTGCATTCGTAG 250
cytb_peafowl1       AAACACAGGAGTAGTTCTCCTCCTCACACTCATAGCAACCGCCTTCGTAG 250
cytb_peafowl4       AAACACAGGAGTAGTTCTCCTCCTCACACTCATAGCAACCGCCTTCGTAG 250
cytb_peafowl3       AAACACAGGAGTAGTTCTCCTCCTCACACTCATAGCAACCGCCTTCGTAG 250
cytb_peafowl5       AAACACAGGAGTAGTTCTCCTCCTCACACTCATAGCAACCGCCTTCGTAG 250
cytb_peafowl2       AAACACAGGAGTAGTTCTCCTCCTCACACTCATAGCAACCGCCTTCGTAG 250
cytb_pheasant1      AAACACCGGAGTCATTTTACTTCTCACACTCATAGCAACTGCCTTCGTAG 250
cytb_pheasent2      AAACACCGGAGTCATTTTACTTCTCACACTCATAGCAACTGCCTTCGTAG 250
cytb_chicken        AAACACAGGAGTAATCCTCCTCCTCACACTCATAGCCACCGCCTTTGTGG 250
cytb_grey5          AAACACAGGAGTTATCCTCCTACTCACACTCATAGCAACTGCCTTCGTAG 250
cytb_grey4          AAACACAGGAGTTATCCTCCTGCTCACACTCATAGCAACTGCCTTCGTGG 250
cytb_grey2          AAACACAGGAGTTATCCTCCTGCTCACACTCATAGCAACTGCCTTCGTGG 250
cytb_grey3          AAACACAGGAGTTATCCTCCTGCTCACACTCATAGCAACTGCCTTCGTGG 250
cytb_grey1          AAACACAGGAGTTATCCTCCTGCTCACACTCATAGCAACTGCCTTCGTGG 250
cytb_Brown2         AAACACAGGAGTCATCCTCCTGCTCACACTCATAGCAACTGCCTTGCTGG 250
                    ****** *****  *  * ** **  ********** ** ** **  * *

cytb_brown3         GCTACGTACTCCCATGAGGACAAATATCATTCTGAGGGGCA-- 291
cytb_brown4         GCTACGTACTCCCATGAGGACAAATATCAT------------- 280
cytb_Brown1         GCTACGTACTCCCATGAGGACAAATATCATTCTGAGGGG---- 289
cytb_argus2         GCTACGTACTCCCATGAGGACAAATATCATTCTGAGGGG---- 289
cytb_argus3         GCTACGTACTCCCATGAGGACAAATATCATTCTGAGGGGG--- 290
cytb_argus1         GCTACGTACTCCCATGAGGACAAATATCATTCTGAGGGGGCA- 292
cytb_argus5         GCTACGTACTCCCATGAGGACAAATATATNTGNGGGGGGG--- 290
cytb_argus4         GCTACGTACTCCCATGAGGACAAATATCATTCTGAGGGGC--- 290
cytb_peafowl1       GCTATGTACTCCCATGAGGACAAATATCATTCTGAGGGGCAA- 292
cytb_peafowl4       GCTATGTACTCCCATGAGGACAAATATCATTCTGAGGGGCA-- 291
cytb_peafowl3       GCTATGTACTCCCATGAGGACAAATATCATTCTGAGGGG---- 289
cytb_peafowl5       GCTATGTACTCCCATGAGGACAAATATCATTCTGAGGGG---- 289
cytb_peafowl2       GCTATGTACTCCCATGAGGACAAATATCATTCTGAGGGG---- 289
cytb_pheasant1      GATATGTCCTTCCATGAGGACAAATATCATTCTGAGGGGCA-- 291
cytb_pheasent2      GATATGTCCTTCCATGAGGACAAATATCATTCTGAGGGGCACC 293
cytb_chicken        GCTATGTTCTCCCATGCGGCCAAATATCAT------------- 280
cytb_grey5          GTTACGTACTCCCATGAGGACAAATATCATTCTGAGGGGCA-- 291
cytb_grey4          GCTACGTACTCCCATGAGGACAAATATCATC------------ 281
cytb_grey2          GCTACGTACTCCCATGAGGACAAATATCATTCTGAGGGG---- 289
cytb_grey3          GCTACGTACTCCCATGAGGACAAATATCATTCTGAGGGG---- 289
cytb_grey1          GCTACGTACTCCCATGAGGACAAATATCATTCTGAGGGG---- 289
cytb_Brown2         GCTACGTACTCCCATGAGGACAAATATCATTCTGAGGGG---- 289
                    * ** ** ** ***** ** *******
```



รูปที่ 7 แสดง phylogenetic tree ที่ได้จากการวิเคราะห์แบบ parsimony และค้นหา optimal tree โดยใช้ hueristic method พร้อมทั้งแสดงค่า bootstrapping จำนวน 100 ซ้ำ ของไก่ฟ้าหางลายขวาง (pheasant 1, 2) นกแว่นสีน้ำตาล (brown 1, 2, 3, 4) นกแว่นสีเทา (grey 1, 2, 3, 4, 5) นกหว้า (argus 1, 2, 3, 4, 5) และนกยูง (peafowl 11, 12, 13, 14, 15) นกกระทา (CC) เป็น out group

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 8 แสดง pairwise distance cytochrome b ของไก่ฟ้าหางลายขวาง นกแว่นสีน้ำตาล นกแว่นสีเทา นกหว้า และนกยูง และค่าอัตราส่วนของ transition ต่อ transversion

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวน 280 คู่เบส ของไก่ฟ้าหางลายขวาง นกแว่น และนกยูง ดังนี้

Species	Nucleotide Sequence	Variable site	Base compostion				Substitution		Codon position		
			A	C	G	T	tv	ti	first	second	third
ไก่ฟ้าหางลายขวาง	280	38	13	8	4	13	23	15	2	1	35
นกแว่นสีน้ำตาล	280	33	10	11	4	8	16	17	-	2	31
นกแว่นสีเทา	280	51	14	11	8	18	29	22	4	5	42
นกหว้า	280	33	13	7	4	9	21	12	3	3	27
นกยูง	280	34	13	6	6	9	19	15	4	2	28
รวม		189	63	43	26	57	108	81	13	13	163
คิดเป็นเปอร์เซนต์			33.3	22.75	13.76	30.16	57.14	42.86	6.88	6.88	86.24

หมายเหตุ A = adenine C = cytocine G = guanine T = thymine tv = transversion ti = transition

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2 แสดงค่า pairwise distance ของไก่ฟ้าหางลายขวาง นกแว่นสีน้ำตาล นกแว่นสีเทา นกหว้า และ นกยูง

No.	Species	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
1	brown3	-	0.000	0.007	0.008	0.079	0.079	0.079	0.096	0.068	0.132	0.132	0.136	0.136	0.129	0.132	0.136	0.107	0.114	0.104	0.104	0.100	0.121
2	brown4		-	0.007	0.008	0.079	0.079	0.079	0.096	0.068	0.132	0.132	0.136	0.136	0.129	0.132	0.136	0.107	0.114	0.104	0.104	0.100	0.121
3	brown1			-	0.000	0.086	0.086	0.086	0.104	0.075	0.139	0.139	0.143	0.143	0.136	0.139	0.143	0.114	0.121	0.111	0.111	0.107	0.129
4	brown2				-	0.076	0.076	0.076	0.084	0.079	0.122	0.122	0.122	0.122	0.122	0.139	0.139	0.105	0.114	0.101	0.101	0.097	0.135
5	grey4					-	0.000	0.000	0.018	0.079	0.136	0.136	0.139	0.136	0.132	0.139	0.146	0.114	0.121	0.111	0.111	0.125	0.150
6	grey2						-	0.000	0.018	0.079	0.136	0.136	0.139	0.136	0.132	0.139	0.146	0.114	0.121	0.111	0.111	0.125	0.150
7	grey3							-	0.018	0.079	0.136	0.136	0.139	0.136	0.132	0.139	0.146	0.114	0.121	0.111	0.111	0.125	0.150
8	grey1								-	0.096	0.143	0.143	0.139	0.136	0.139	0.157	0.157	0.132	0.139	0.129	0.129	0.143	0.168
9	grey5									-	0.118	0.118	0.121	0.143	0.114	0.125	0.125	0.107	0.114	0.104	0.104	0.111	0.121
10	peafowl13										-	0.000	0.004	0.121	0.004	0.129	0.129	0.118	0.125	0.114	0.112	0.111	0.121
11	peafowl14											-	0.004	0.011	0.004	0.129	0.129	0.118	0.125	0.114	0.114	0.111	0.121
12	peafowl11												-	0.014	0.007	0.132	0.132	0.121	0.129	0.118	0.118	0.114	0.125
13	peafowl12													-	0.007	0.132	0.132	0.118	0.125	0.114	0.114	0.111	0.125
14	peafowl15														-	0.125	0.125	0.114	0.121	0.111	0.111	0.107	0.118
15	pheasant1															-	0.007	0.129	0.136	0.125	0.125	0.129	0.125
16	pheasant2																-	0.136	0.143	0.132	0.132	0.136	0.132
17	argus1																	-	0.007	0.004	0.004	0.032	0.121
18	argus5																		-	0.011	0.011	0.039	0.129
19	argus3																			-	0.000	0.036	0.118
20	argus2																				-	0.036	0.118
21	argus4																					-	0.107
22	CC																						-

หมายเหตุ ไก่ฟ้าหางลายขวาง (pheasant 1, 2, 3, 4) นกแว่นสีน้ำตาล (brown 1, 2, 3, 4, 5) นกแว่นสีเทา (grey 1, 2, 3, 4, 5) นกหว้า (argus 1, 2, 3, 4, 5) และนกยูง (peafowl 11, 12, 13, 14, 15)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4
อภิปรายผล

จากการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของไก่ฟ้าหางลายขวาง นกแว่นสีน้ำตาล นกแว่นสีเทา นกหว้า และ นกยูง พบความผันแปรของนิวคลีโอไทด์แต่ละตัวในชนิดเดียวกัน พบว่า นกแว่นสีเทามีความแปรผันมากที่สุด (p-distance = 0.097) และไก่ฟ้าหางลายขวางมีความผันแปรน้อยที่สุด (p-distance = 0.007) เนื่องจากขอบเขตการแพร่กระจายของไก่ฟ้าหางลายขวางค่อนข้างจำกัด พบเฉพาะบนภูเขาในภาคเหนือที่สูงจากระดับน้ำทะเลตั้งแต่ 1,000 เมตรขึ้นไป เมื่อมีประชากรน้อยและจำกัดทำให้มีโอกาสในการผสมพันธุ์ในกลุ่มเลือดชิดกันมากขึ้น เป็นผลให้ความหลากหลายของพันธุกรรมต่ำ ซึ่งพบว่ามีค่าใกล้เคียงกับนกแว่นสีน้ำตาล (p-distance - 0.008) ซึ่งพบประชากรน้อยเช่นเดียวกัน พบเฉพาะในป่าดงดิบภาคใต้ของประเทศไทยเท่านั้น ในทางตรงกันข้ามกับนกแว่นสีเทามีการแพร่กระจายที่กว้างกว่าตั้งแต่ประจวบคีรีขันธ์ขึ้นไปทางฝั่งตะวันตก ภาคเหนือไปจนภาคตะวันตกเฉียงเหนือของที่ราบสูงตะวันออกแถบเพชรบูรณ์ เนื่องจากมีพื้นที่ในการแพร่กระจายมากกว่ามีโอกาสสูงในการผสมพันธุ์แบบสุ่ม (random mating) จึงทำให้ความหลากหลายของพันธุกรรมสูงกว่าไก่ฟ้าชนิดอื่น ๆ

สำหรับความผันแปรของนิวคลีโอไทด์ของกลุ่มไก่ฟ้าที่ศึกษาครั้งนี้พบ สูงสุด 66 ตำแหน่ง ส่วนใหญ่เป็น transition (57.14%) เป็นโคดอนที่สาม (86.24%) และมีเบสที่เปลี่ยนไปเป็นกัวนินน้อยที่สุด (13.76%) เช่นเดียวกับการศึกษาในไซโตโครมบีในนกกลุ่มอื่น ๆ (Whittingham *et. al.*, 2000; Randi *et.al*, 2000; Slikas *et. al.*, 2000; Burns, 1998) นอกจาก cyt b แล้ว ยีนของไมโตคอนเดรียที่มีการผันแปรแบบ transition ตำแหน่งโคดอนที่สาม คือ ND2 (Klick *et. al.*, 2000) ผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ของไซโตโครมบีในนกยูงที่ศึกษาในครั้งนี้ได้ผลที่แตกต่างจากการศึกษาของ Kimball *et. al.* (1999) 6 ตำแหน่งเป็น transition 4 ตำแหน่ง และtransversion 2 ตำแหน่ง ซึ่งพบทั้งเป็น Synonymous และ nonsynonymous ซึ่งอาจจะเป็นไปได้ว่านกยูงที่ Kimball นำมาศึกษาเป็นคนละชนิดย่อยกับที่กลุ่มคณะผู้วิจัยศึกษาในครั้งนี้ ซึ่ง Kimball มิได้ระบุว่าเป็นชนิดย่อยใด สำหรับนกแว่นสีเทาและนกหว้าแตกต่างการศึกษาในครั้งนี้ 4 และ 1 ตามลำดับ ส่วนที่แตกต่างออกไปนี้เป็น transiton 4 และ transversion 1 เป็นโคดอนที่สามทั้งหมด ซึ่งการเปลี่ยนแปลงนี้เป็น synonymous ซึ่งอาจเกิดจาก individual variation แต่อย่างไรก็ดี ในการศึกษาครั้งนี้ได้ศึกษาจำนวนตัวมากกว่า 1 ตัวขึ้นไป ทำให้ความผันแปรของแต่ละตัวในชนิดเดียวกันแตกต่างจากที่ kimball และคณะได้ศึกษานั้นใช้เพียงตัวอย่างเดียว

Moore and DeFilippis 1997 ได้เปรียบเทียบ Phylogenetic tree ที่ได้จากกการวิเคราะห์แบบ Parsimony ของนก 4 กลุ่ม คือ Wood peckers , Cranes,Oscines และ Barbets & Toucans ที่มีลำดับนิวคลิโอไทด์ 1512 , 1137 , 1143 และ 888 ตามลำดับ โดยเขาได้ลดจำนวนลำดับนิวคลิโอไทด์ลงเหลือ 282 คู่และหา Phylogenetic tree โดย การวิเคราะห์แบบ neighbor joining analysis พบว่าในกลุ่ม Wood peckers , Cranes,Oscines ได้ trees ที่เหมือนกันทุกประการแต่ค่า boostrapping ต่างกัน และสำหรับใน Barbets Toucans นั้น tree ที่ได้ต่างกันเล็กน้อยคือพบว่า Toucans 2 ชนิดไม่เป็น monophyletic group เขาจึงเสนอแนะว่าผู้ที่จะศึกษา phylogenetic tree ในเบื้องต้นนั้น อาจจะศึกษาชิ้นส่วนของลำดับนิวคลิโอไทด์ของ Cytochrome b ช่วงสั้นๆก็จะให้ผลพอที่จะศึกษาความสัมพันธุ์เชิงวิวัฒนาการได้ คณะผู้วิจัยจึงได้นำเอา cytochrome b sequence ของ great argus, green peafowl และ grey peacock-pheasant จาก genbank ซึ่งศึกษาโดย Kimball(1999) จำนวน 1143 คู่เบส มาคำนวนหาค่า variable per site เปรียบเทียบกับการศึกษาของคณะผู้วิจัยในครั้งนี้ จำนวน 280 คู่เบส พบว่ามีค่าเท่ากับ 0.1 เท่ากัน และเมื่อนำไปหา phylogenetic tree วิเคราะห์โดย parsimony โดยให้น้ำหนัก transversion : transition เท่ากับ 2 : 1 และทำ boostrapping 100 ครั้ง พบว่า tree ที่ได้ต่างกันเล็กน้อยคือ tree ที่ได้จากการวิจัยในครั้งนี้พบว่า great argus และ green peafowl ที่ได้จากลำดับนิวคลีโอไทด์จาก genbank มีค่า boostrapping 56 ใน 100 ซ้ำ ซึ่งถือว่าเป็น monophyletic group ที่มีค่าต่ำ ดังแสดงรูปไว้ใน Appendix หน้า 48

จากการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของกลุ่มไก่ที่ศึกษาในครั้งนี้ พบว่านิวคลีโอไทด์ที่เปลี่ยนแปลงเอนเอียงเป็นแบบ transition ที่ตำแหน่งโคดอนที่สาม เนื่องจากเกิดวิวัฒนาการที่เร็ว จึงได้คำนวณอัตราของการเปลี่ยนแปลงของ transversion ต่อ transition ได้เท่ากับ 1.5 ในการวิเคราะห์หา phylogenetic tree จึงได้ให้น้ำหนักของ transversion ต่อ transition เป็น 2 : 1 เพื่อทำให้ผลที่ได้ถูกต้องยิ่งขึ้นเช่นเดียวกับที่ Randi and others (2000) ศึกษาในนก Tragopan ได้ให้น้ำหนัก transversion : transition เท่ากับ 6 : 1 เช่นเดียวกับ Burns ศึกษาในนกสกุล *Piranga* sp. Whittingham and others (2000) ศึกษาในนกลุ่มนกอีแจวได้ให้น้ำหนักเท่ากับ 3 : 1

ได้มีผู้ที่ได้ศึกษาในกลุ่มนกหัวขวานโดยใช้ nuclear beta fibrinogen intron 7 เปรียบเทียบกับ cyt b พบว่า ให้ phylogenetic tree ที่เหมือนกัน ถึงแม้ว่า nuclear gene จะมีอัตราวิวัฒนาการที่ต่ำกว่า แต่ในขณะเดียวกันก็มีค่า homoplasy ที่ต่ำกว่า แต่อย่างไรก็ดีจะเห็นว่าการศึกษา Molecular evolution ในสิ่งมีชีวิตแต่ชนิดจะแตกต่างกันฉะนั้นอาจจะใช้ยีนบางยีนที่ศึกษากับนกกลุ่มนี้ได้ดี แต่ก็มิได้หมายความว่าจะใช้ศึกษากับนกกลุ่มอื่น ๆ ได้ดีในทุกกรณีไป ทั้งนี้เนื่องจากอัตราวิวัฒนาการของยีนของสิ่งมีชีวิตแตกต่างกันตาม biological clock ซึ่งขึ้นกับปัจจัยอื่นๆ อีก เช่น ความยาวของช่วงชีวิตของสัตว์แต่ละชนิด ขึ้นกับอัตราของเมตาบอลิสม นอกจากนี้ยังขึ้นกับขนาด

จาก phylogenetic tree ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ พบว่า ไก่ฟ้าหางลายขวางและนกยูงเป็นกลุ่มที่มีวิวัฒนาการแยกมาจากกลุ่มนกหว้าและนกแว่นมานานแล้ว เมื่อพิจารณาจากค่าความยาวของ tree lenght จะยาว ขณะที่กลุ่มนกหว้าและนกแว่นมีวิวัฒนาการแยกเป็นชนิดต่าง ๆ ไม่นาน โดยเฉพาะนกแว่นสีเทาและนกแว่นสีน้ำตาล มี tree lenght ที่สั้น เพิ่งจะแยกจากนกหว้ามาไม่นาน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5
สรุปผล

ผลการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของไก่ฟ้าหางลายขวาง นกแว่นสีน้ำตาล นกแว่นสีเทา นกหว้า และนกยูง อ่านลำดับนิวคลีโอไดไทด์ของไซโตโครมบีได้ 280 คู่เบส มีความแปรผันของยีน 66 ตำแหน่ง มี phylogenetically informative 29 ตำแหน่ง เป็นการเปลี่ยนแปลงเอนเอียงไปทาง transition (57.14%) โดยเฉพาะตำแหน่งโคดอนที่สาม (86.24%) เบสที่เปลี่ยนแปลงไปนี้พบกัวนินต่ำที่สุด (13.76%) จาก phylogenetic tree พบว่าไก่ฟ้าหางลายขวางและนกยูงมีวิวัฒนาการแยกกันมานานแล้ว ขณะที่กลุ่มนกแว่นสีน้ำตาลและนกแว่นสีเทามีวิวัฒนาการแยกมาจากนกหว้า

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ข้อเสนอแนะ

จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของไซโตโครมบีขนาดตั้งแต่ 200 คู่เบสขึ้นไปสามารถใช้หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมเชิงวิวัฒนาการของไก่ฟ้าหางลายขวาง นกแว่นสีน้ำตาล นกแว่นสีเทา นกหว้า และนกยูงได้ และถ้าจะให้ค่าทางสถิติ bootstraping มีค่าที่สูงขึ้นควรจะทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ยาวขึ้นโดยที่ผลของ phylogenetic tree ยังคงเหมือนเดิม ซึ่ง De Filippis and Moore (2000) ได้ทำการศึกษาไว้ในกลุ่มนกหัวขวานโดยใช้ยีน cyt b และ COI

จากการศึกษาในครั้งนี้ พบว่าความหลากหลายของยีนไซโตโครมบีในนกแว่นสีน้ำตาลและไก่ฟ้าหางลายขวางมีค่า pairwise distance ค่อนข้างต่ำ (p-distance = 0.008 และ 0.007) ตามลำดับ นอกจากนั้นนกแว่นสีน้ำตาลยังเป็นนกที่มีสถานภาพใกล้สูญพันธ์อย่างยิ่ง (critically endangered) และไก่ฟ้าหางลายขวางมีสถานภาพใกล้สูญพันธุ์ (endangered) ของไทย จึงควรมีโครงการวางแผนการจัดการเพื่อการอนุรักษ์ในอนาคต เช่นอาจจะนำไก่ฟ้าหางลายขวางที่ได้จากแหล่งต่างๆ ในธรรมชาติซึ่งขณะนี้ เหลือเพียงไม่กี่แห่งในประเทศไทย เช่น ที่ดอยเชียงดาว อำเภอเชียงดาว ดอยอ่างขาง อำเภอฝางจังหวัดเชียงใหม่ และที่ดอยแม่จอกหลวง อำเภอปาย จังหวัดแม่ฮ่องสอน มาทำการผสมพันธุ์ในกรงเลี้ยง และปล่อยคืนสู่ธรรมชาติต่อไป เพราะขณะนี้ในสภาพธรรมชาติไก่ฟ้าที่พบทั้ง 3 แห่งนี้ ไม่สามารถที่จะผสมพันธุ์ข้ามถิ่นกันได้เลย เนื่องจากป่าที่เป็นที่อยู่อาศัยแยกจากกันเป็นหย่อม (habitat fragmentation) แต่อย่างไรก็ดีผลของความหลากหลายของยีนในแต่ละตัวที่ใช้ในการ ศึกษาครั้งนี้เพียงชนิดละ 5 ตัว เหมาะที่จะศึกษาเกี่ยวกับวิวัฒนาการและจัดจำแนกหมวดหมู่ของสัตว์เชิงวิวัฒนาการเท่านั้น แต่ถ้าจะศึกษาเกี่ยวกับประชากรย่อยในแต่ละแห่งจะต้องใช้จำนวนตัวอย่างเพิ่มขึ้นมากกว่านี้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกสารอ้างอิง

ณรงค์ จันทน์สุคนธ์. 2534. *ไก่ฟ้า*. สมาคมอนุรักษ์ไก่ฟ้าแห่งชาติ

ฝ่ายทรัพยากรชีวภาพ สำนักนโยบายและสิ่งแวดล้อม กระทรวงวิทยาศาตร์ เทคโนโลยี และสิ่งแวดล้อม. 2540. *สถานภาพทรัพยากรชีวภาพของประเทศไทย*.

Anderson, S., Bankier, A.T., Barrell, B.G., De Bruijn, M.H.L., Coulson, A.R., Drouin, J., Eperon, I.C., Nierlich, D.P., Roe, B.A., Sanger, F., Schreier, P.H., Smith, A.J.H., Staden, R.and Young, I.G. 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*. 209 : 457-465.

Arctander. P., and Fjeldsa. J. 1994. Avian tissue collections for DNA analysis. *Ibis* 136(3) : 359-360.

Baker, F.K. and Lanyon, S.M. 2000. The impact of parsimony weighting schemes on inferred relationships among toucans and neotropical barbets (Aves : Piciformes). *Mol. Phylogenet. Evol.* 15(2) : 215-234.

Browne, R.A., Griffin, C.R. Chang, P.R., Hubky, M., and Martin, A.E. 1993. Genetic divergence among populations of the hawaiian duck, Laysan Duck and Mallard. *The Auk* 110(1) : 49-56.

Burns, K. 1998 Molecular phylogenetics of the genus Piranga implications for biogeography and the evolution of morphology and behavior. *The Auk*. 115(3) : 621-634.

Cibeis, A., Pasquet, E, and Schulenberg, T.S. 1999. Molecular systematics of the malagasy babbles (*Passeriformes* : timaliidae) and 16S rRNA sequence. *Mol. Phylogenet. Evol.* 13(3) : 581-595.

Cooke, F., and Buckley, P.A. 1987. Avian Genetics. *A population and ecological approach*. Academic Press:London.

Crawford, R.D. 1990. Origion and history of poultry. *Poultry breeding and genetics*, Elsevier:Amsterdam.

Crowe, T.M., Harley, E.H., Jakutowicz, M.B., Komen, J., and Crowe, A.A. 1992. Phylogenetic, taxonomic and biogeographical implications of genetic, morphological and behavioral variation in francolins (Phasianidae : Francolins). *The Auk* 109(1) : 24-42.

DeFilippis, V.R. and Moore, W.S. 2000. Resolution phylogenetic relationship among recently envolved species as a functin of amount of DNA sequence : an empirical study based on woodpecker (Aves : Picidae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 16(1) : 143-160.

Desjardins, P., and Morais, R. 1990. Sequence and gene organization of the chicken mitochondrial genome. *J. Mol. Biol.* 212 : 599-63.

Dittmann, D. L., and Zink, R.M. 1991. Mitochondrial DNA variation among phalaropes and allies. *The Auk* 108(4) : 771-779.

Filsenstein, J. 1993. *Phylip (phylogeny inference package), Ver.3.5c.* University of Washington, Seattle.

Forey, P.L., Humphries, C.J., Kitching, I.L., Scottland, R.W., Siebert, D. J. ,and Williams, D.M. 1995. *Cladistics: a practical course in systematics*. Oxford University Press, Oxford.

Gill, F.B., and Slikas, B. 1992. Patterns of mitochondrial DNA divergence in north american crested titmice. *The Condor* 94 : 20-28.

Groth, J. G. 1998. Molecular phylogenetics of finches and sparrows : consequences of character state removal in cytochrome b sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 10(3) : 377-390.

Hare, M. P., and Shields, G.F. 1992. Mitochondrial - DNA variation in the polytypic alaskan song sparrow. *The Auk* 109(1) : 126-132.

Helbig, A.J., and Seibold, I. 1991. Molecular phylogeny of palaearctic african acrocephalus and aippolais warblers (Aves: Sylviidae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 15(2) : 215-234.

Hillis, D.M., Moritz, C., and Mable, B.K. 1996. *Molecular systematics (2nd ed.).* Siriauer associates, Inc. MA.

Johnson, K.P. and Clayton, D.H. *Nuclear and mitochondrial genes contain similar phylogenetic signal for pigeon and dove (Aves: Columbiformes).*

Kimball, R.T., Braun, E.L, Zwartjes, P.W., Crowe, T.M., and Ligon, J.D. 1999. A molecular phylogeny of the pheasant and partidges suggests that these lineages are not monophyletic. *Mol. Phylogenet. Evol.* 11(1) : 38-54.

Kirchman, J.J., Whittingham, L.A., and Sheldon, F.H., 2000. Relationships among cave swallow populations (petrochelidon fulve) determined by comparisons of microsatellite and cytochrome b data. *Mol. Phylogent. Evol.* 14(1) : 107-121.

Klicka, J., Johnson, K.P. and Lanyon, S.M. 2000. New world nine primaried oscine relationships: constructing a mitochondrail DNA framwork. *The Auk*. 117(2): 321-336.

Kocher, T.D., Thomas, W.K., Meyer, A., Edward, S. V., Paabo, S., Villablance. W.X., and Wilson, A.C. 1989. Dynamic of mitochondrial DNA evolution in animals : amplification and sequencing with conserve primers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86,6196-6200.

Kornegay, J.R., Kocher, T.D., Wiliams, L.A., and Wilson, A.C. 1993. Pathway of lysozyme evolution inferred from the sequences of cytochrome b in birds. *J. Mol. Evol.* 37 : 367-379.

Krajewski, C., Fain, M.G., Buckley, L. and King, D.G. 1999. Dynamically heterogenous partitions and phylogenetic inference : an evolution of analytical strategies with cytochrome b and ND6 gene sequence in crane. *Mol. Phylogenet. Evol.* 13(2) : 302-313.

Krajewski, C., and Fetzner, J. W. 1994. Phylogeny of crane (gruiformes : gruidae) based on cytochrome-b DNA sequences. *The Auk* 111(2) : 351-365.

Kumar, S., Tamura, K., and Nei, M. 1993. *MEGA : molecular evolutionary genetics analysis. version 1.0.* Pensylvania State University.

Lanyon, S., and Hall, J.G. 1994. Reexamination of barket monophyly using mitochondrial - DNA sequence data. *The Auk* 111(2) : 389-397.

Leeton, P., and Christidis, L. 1993. Feathers from museum bird skins a good of DNA for phylogenetic students. *The Condor* 95 : 465-466.

Moore, W.S. and Defilippis, V.R. 1997. The window of taxonomic resolution from phylogenies based on mitochondrial cytochrome b. Cites in Avian molecular evolution and systematics.Academic Press,California.

Morin. P., Messier, J., and Woodruff, D.S. 1994. DNA extraction, amplification, and direct sequencing from hornbili feathers. *J. Sci. Soc. Thailand* 20(1) : 31-41.

Nei, M. 1987. *Molecular evolution genetics.* Columbia University Press. NewYork.

Negro, J.J., and Hiraldo, F. 1994. Lack of allozyme variation in the Spanish Imperial Eagle (*Aquila adalberti*). *Ibis* 136 : 87-90.

Prychitko, T.M. and Moore W.S. 2000. Comparative evolution of the mitochondrial cytochrom b gene and nuclear betafibrinogen intron 7 in woodpeckers. *Mol. Biol. Evol.* 17(7) : 1101-1111.

Nunn, G.B., and Cracraft, J. 1996. Phylogenetic relationships among the major lineages of the birds of paradise (paradisaeidae) using mitochondrial DNA gene sequences. *Molec. Phylo & Evol.* 5(3) : 445-459.

Quinn, T.W. 1992. The genetic legacy of mother goose phylogeographic patterns of lesser snow goose chen caerulescens caerulescens maternal lineages. *Molecular Ecology* 1 : 105-117.

Randi, E., Lucchini, V. Armijo-prewitt, T., Kimball, R.T., Braun, E.L., and Ligon, J.D. 2000. Mitochondrial DNA phylogeny and speciation in the tragopans. *The Auk.* 177(4) : 1003-1015

Seibold, I., And Helbig, A.J. 1995. Evolutionary history of new and old world vultures inferred from nucleotide sequences of the mitochondrial cytochrome b gene. *Phil. Trans. R. Soc. London B.* 350(1332) : 163-178.

Sibley, C.G., and Ahquist, J.E. 1990. *Phylogeny and classification of birds.* Yale University Press, New Haven, Connecticut.

Singer-Sam, J. Tanguay, R.L., and Riggs, A.D. 1989. Use of Chelex to improve the PCR signal from a small number of cells. *Amplification* 3 : 11.

Slikas, B., Jones, I.B., Derickson, S.T., and Fleisher, R.C. 2000. Phylogenetic relationships of micronesian white-eyes based on mitochondrial sequence data. *The Auk.* 117(2) : 355-365.

Snell, R. 1991. Interspecific allozyme differentiation among north alantic White-headed laried galls. *The Auk* 108 : 319-328.

Soto, A., Ohuigin, C., Figueroa, F., Grant, P.R., Grant, B.R., Tichy, H, and Klein, J. 1999. Phylogeny of darwin's finches as revealed by mtDNA sequences. *Pro.Natl.Acad.Sci.* USA. 96(9) : 5101-5106.

Srikwan, S., and Woodruff, D.S. 1998. *DNA sequence variation and hornbill conservation. The asian hornbills :Ecology and conservation.* Research and training program national center for genetic engineering and biotechnology.

Swofford, D.L. 1993. *PAUP : phylogenetic analysis using parsimony, Version 3.11.* Illinois Natural History Survey, Champaign.

Swofford, D.L. 1998. *PAUP phylogenetic analysis using parsimony (and other method) version 4.* Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

Taberlet, P., and Bouvet, J. 1991. A single pluked feather as a source of DNA for bird genetic studies. *The Auk* 108(4) : 959-960.

Walsh, P.S., Metzger, D.A., and Higuchi, R. 1990. Chelex 100 as medium for Simple extraction of DNA for PCR based tryping from forensic materials. *Biotechnique* 10(4) : 506-513.

Wilson, A.C., Cann, R.L., Carr, S.M., George, M., Gylensten, U.B., Heim. Bychowski, K.M., Higuchi, R.G., Palumbl, S.R., Prager, E.M., Sage, R.D., and Stoneking, M. 1985. Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. *Biol. J. Linn. Soc.* 26 : 375-400.

Whittingham, L.A., Sheldon, F.H., and Emlen, S. 2000. Molecular phylogeny of jacanas and its implication for morphologic and biogeographic evolution. *The Auk.* 117(2) : 355-365.'

Zink, R.M., Weller, S.J. and Blackwell, R.C. 1998. Molecular phylogenetics of the avain genus pipilo and a biogeographic argument for taxonomic uncertainty. *Mol. Phylogenet. Evol.* 10(2) : 191-201.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

ขั้นตอนการสกัดดีเอนเอจากขน (ดัดแปลงจากวิธีของ Walsh, 1991)

1. ผ่าขนปลายขนนับจากปลายประมาณ 0.5 มิลลิเมตร
2. นำขนดังกล่าวใส่ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มี 5% chelex ปริมาตร 300 ไมโครลิตร
3. Vortex ด้วยความเร็วสูง 5 - 10 วินาที
4. Incubate ที่ 56 องศาเซลเซียส
5. Vortex ด้วยความเร็วสูง 5 - 10 วินาที
6. ต้มในน้ำเดือด 10 นาที
7. Vortex เบา ๆ นาน 5 - 10 วินาที
8. Centrifuge 3 - 5 นาที ที่ความเร็วรอบ 10,000 - 15,000 g
9. ดูด supernatant ไปยังหลอดใหม่ แล้วเก็บ DNA ที่สกัดไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

หมายเหตุ การดูด supernatant ต้องระวังไม่ให้โดนตะกอนที่ตกมาอยู่ด้านล่าง

ขั้นตอนการสกัด DNA จากตัวอย่าง (Chelex DNA extraction from sample) (Teberlet *et. al.* 1991)

1. ปิเปตน้ำกลั่น (tri distilled water) ปริมาณ 1 ml. ใส่ลงใน microcentrifuge tube ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ขนาด 1.5 ml. เติม sample ที่ต้องการศึกษา เพียงอย่างใดอย่างหนึ่งลงไป
   a. Whole blood ใช้ 3-6 µl.
   b. Buffy coat ใช้ 2-3 µl.
   c. Blood stain ใช้ 3 $mm.^2$
2. Incubate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15-30 นาที
3. Centrifuge ที่ความเร็ว 10,000-15,000 xg เป็นเวลา 2-3 นาที
4. ดูด supernatant ออกเหลือทิ้งไว้ประมาณ 20-30 µl. และส่วนที่เป็น pellet
5. เติม 5 % Chelex ให้ได้ปริมาตร 200 µl.
6. Incubate ที่อุณหภูมิ 56° C เป็นเวลา 15-30 นาที
7. Vortex ที่ความเร็วสูง เป็นเวลา 5-10 วินาที
8. ต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 8 นาที
9. Vortex ที่ความเร็วสูง เป็นเวลา 5-10 วินาที
10. Centrifuge เป็นเวลา 2-3 นาที ที่ความเร็ว 10,000-15,000 xg

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

11. เก็บ DNA ที่ผ่านการสกัดได้ไว้ในตู้เย็น เพื่อรอการนำไปใช้ต่อไป

ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอนเอโดยปฏิกริยาลูกโซ่ (DNA amplification)

1. เตรียม PCR mixture ในแต่ละหลอดประกอบด้วย

น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ (tri distilled water)	6.3 µl.
PCR buffer (MgCl2 15 mM)	2.5 µl.
dNTP (mixture ของ dTTP, dCTP, dATP และ dGTP) (0.2 mM)	2.0 µl.
Primer cyt b 1 (0.4 mM)	2.0 µl.
Primer cyt b 2 (0.4 mM)	2.0 µl.
Taq enzyme (DNA polymerase) (1 unit)	0.2 µl.

2. ปิเปต sample (DNA sample) ที่สกัดไว้ใส่ลงใน PCR mixture 10 µl.
3. หยด mineral oil - 2 หยดเพื่อป้องกัน solution ระเหยขณะทำการ amplify
4. ตั้งเครื่อง PCR automation กำหนดเวลาและอุณหภูมิดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 warm เครื่องที่อุณหภูมิ 94° C เป็นเวลา 3 นาที

ขั้นตอนที่ 2 denaturing temperature 92° C เป็นเวลา 1 นาที

annealing temperature 57° C เป็นเวลา 1 นาที

extention temperature 72° C เป็นเวลา 1 นาที

ตั้งจำนวนรอบ 40 รอบ

ขั้นตอนที่ 3 extension ที่อุณหภูมิ 74° C เป็นเวลา 10 นาที

ข้อเสนอแนะ : การทำ DNA extraction และ DNA amplification ต้องทำใน hood ที่เปิด UV เพื่อ sterile ก่อนลงมือปฏิบัติการอย่างน้อย 30 นาที

: เปลี่ยน pipette tip ทุกครั้งของการดูด DNA sample แต่ละหลอด

ขั้นตอนการตรวจสอบ DNA product ด้วยวิธี 2 % agarose gel electrophoresis

1. ชั่ง agarose หนัก 2 g. ผสมใน 1X TBE buffer 100 ml.
2. ละลาย agarose ใน Microwave ที่อุณหภูมิ 130° C เป็นเวลาประมาณ 1 นาที
3. เติม 10% Ethidium bromide 0.5 µl. เขย่าให้ทั่ว
4. เท gel ลงใน gel chamber ที่ปรับระดับ และวาง comb ไว้เรียบร้อยแล้ว
5. ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นประมาณ 20 นาที agarose จะแข็งตัว จากนั้นเท TBE buffer ลงไปใน gel chamber เล็กน้อย (ประมาณ 5 ml.) แล้วดึง comb ออก นำถาด gel ไปวางใน electrophoresis - chamber

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

6. ใช้ TBE stock solution 10X มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ
7. อัตราส่วน stock 1 ส่วนต่อน้ำกลั่น 9 ส่วน เทใส่ใน chamber ให้ได้ปริมาณที่สูงกว่าผิวหน้า agarose gel ประมาณ 5 mm.
8. เตรียม Loading sample โดยดูด dye 1 µl. หยดลงบนกระดาษ parafilm
9. ดูด PCR product โดยปลาย pipette tip ลงในสารละลายใต้น้ำมัน มา 4 µl. ผสมกับ dye ที่อยู่บนกระดาษ parafilm ให้เข้ากัน
10. Load sample ที่ผสมกับ dye ลงใน gel well โดยเปลี่ยนหัว tip ทุก ๆ sample
11. Well แรก load marker (Phi X174 Hinf I) ผสมกับน้ำกลั่น 1:3 ul
12. Run gel โดยใช้เครื่อง electrophoresis ที่ 50 volts เป็นเวลา 45-60 นาที
13. อ่านผลของ PCR product โดยใช้ UV transilluminator
14. ถ่ายภาพของ DNA ที่ปรากฏบน agarose gel ด้วยกล้อง Polaroid

<u>ขั้นตอนการ purified PCR product จาก solution ด้วย Geneclean BIO 101</u>

1. ปิเปต Geneclean spin glassmilk 400 µl ลงใน Geneclean spin fiber
2. ปิเปต PCR product จำนวน 15 µl ลงในข้อ 1 ดูดสารละลายขึ้นลงเพื่อผสมกัน
3. นำไป spin นาน 1 นาที แล้วนำน้ำที่ก้นหลอดทิ้ง
4. ปิเปต Geneclean spin new wash 500 µl แล้ว spin 30 วินาที จึงเทน้ำที่ก้นหลอดทิ้ง
5. ทำซ้ำในข้อ 4
6. Spin อีกครั้งนาน 1 นาที เพื่อทำให้ pellet แห้ง
7. นำ spin filter มาใส่ใน Elution catch tube
8. ปิเปต Geneclean elution solution 20 µl เพื่อชะล้าง DNA ออกจาก glassmilk แล้วนำไป vortex 1-2 วินาที
9. ทำซ้ำในข้อ 8 แต่ลดจำนวน Geneclean elution solution ลง การทำซ้ำจะทำให้ได้ปริมาณ DNA เพิ่มขึ้น
10. นำ spin filter ออก จะเหลือสารละลาย DNA ที่จะนำไปใช้ต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขั้นตอนการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง Automated Sequencer (ABI 310)

1. เตรียม Cycle sequencing reaction

1.1 เตรียม reaction mixture ดังนี้

Terminator ready reaction mix (Big - Dye)	4	µl
Template (PCR product)	30-90	ng
Primer (3.2 pmol)	1	µl
Deionized water	q.s.	
Total volume	10	µl

หลังจากนั้นนำไปใส่ในเครื่อง GeneAmp System 9600 or 2400 ที่กำหนดเวลาและอุณหภูมิดังนี้

Denaturing temp 96 °C นาน 10 วินาที

Annealing temp 50 °C นาน 5 วินาที

Extension temp 60 °C นาน 4 วินาที

จำนวน 25 รอบ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Cyt b ไก่ฟ้าหางลายขวาง

เปลี่ยนทั้งหมด 38 ตำแหน่ง

Phe 1, 2, 3,4, 5 = Pheasant 1, 2 - = ไม่เปลี่ยนแปลง

A = adenine C = cytocine G = guanine T = thymine tv = transversion ti = transition

No.	ตำแหน่ง	ไก่เลี้ยง	Phe1	Phe2	substitution	Codon
1	15039	C	-	G	tv	3
2	15054	G	A	A	ti	3
3	15057	C	T	T	ti	3
4	15063	A	T	T	tv	3
5	15072	A	C	C	tv	3
6	15074	C	-	G	tv	3
7	15102	T	A	A	tv	3
8	15108	G	A	A	ti	3
9	15135	G	A	A	ti	3
10	15144	C	T	T	ti	3
11	15165	C	T	T	ti	3
12	15171	C	T	T	ti	3
13	15174	T	C	C	ti	3
14	15180	C	T	T	ti	3
15	15192	A	C	C	tv	3
16	15195	A	C	C	tv	3
17	15199	C	T	T	ti	1
18	15201	A	G	G	ti	3
19	15213	C	T	T	ti	3
20	15219	C	A	A	tv	3
21	15225	G	A	A	ti	3
22	15228	A	G	G	ti	3
23	15231	C	A	A	tv	3
24	15240	A	C	C	tv	3
25	15246	A	C	C	tv	3

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

No.	ตำแหน่ง	ไก่เลี้ยง	Phe1	Phe2	substitution	Codon
26	15249	C	T	T	ti	3
27	15250	C	T	T	ti	1
28	15252	C	A	A	tv	3
29	15255	C	T	T	ti	3
30	15270	C	A	A	tv	3
31	15274	C	T	T	ti	3
32	15280	T	C	C	ti	3
33	15283	G	A	A	ti	3
34	15286	C	A	A	tv	3
35	15292	T	C	C	ti	3
36	15295	C	T	T	ti	3
37	152301	G	A	A	ti	3
38	152304	C	A	A	tv	3

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Cyt b นกแว่นสีน้ำตาล

เปลี่ยนทั้งหมด 33 ตำแหน่ง

B 1, 2, 3,4, 5 = Brown 1, 2, 3,4 - = ไม่เปลี่ยนแปลง

A = adenine C = cytocine G = guanine T = thymine tv = transversion ti = transition

No.	ตำแหน่ง	ไก่เลี้ยง	B1	B2	B3	B4	substitution	Codon
1	15039	C	A	A	A	N	tv	3
2	15042	A	C	C	C	N	tv	3
3	15053	T	C	C	C	N	ti	2
4	15054	G	A	A	A	N	ti	3
5	15063	A	C	C	C	N	tv	3
6	15069	C	C	C	C	N	ti	3
7	15072	A	C	C	C	N	tv	3
8	15078	A	C	C	C	C	tv	3
9	15086	C	G	G	G	G	tv	2
10	15087	C	A	A	A	A	tv	3
11	15108	G	A	A	A	A	ti	3
12	15111	C	T	T	T	T	ti	3
13	15118	A	G	G	G	G	ti	3
14	15120	C	T	T	T	T	ti	3
15	15135	G	T	T	T	T	tv	3
16	15138	T	C	C	C	C	ti	3
17	15144	C	T	T	T	T	ti	3
18	15174	T	C	C	C	C	ti	3
19	15183	T	G	G	G	G	tv	3
20	15189	C	T	T	T	T	ti	3
21	15195	A	T	T	T	T	tv	3
22	15201	A	C	C	C	C	tv	3
23	15219	C	A	A	A	A	tv	3
24	15225	G	A	A	A	A	ti	3
25	15246	A	C	C	C	C	tv	3

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

No.	ตำแหน่ง	ไก่เลี้ยง	B1	B2	B3	B4	substitution	Codon
26	15255	C	G	G	G	G	tv	3
27	15270	C	A	A	A	A	tv	3
28	15273	C	T	T	T	T	ti	3
29	15279	T	G	G	C	C	tv, ti	3
30	15288	T	C	C	C	C	ti	3
31	15291	T	A	A	A	A	tv	3
32	15300	G	A	A	A	A	ti	3
33	15303	C	A	A	A	A	tv	3

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Cyt b นกแว่นสีเทา

เปลี่ยนทั้งหมด 51 ตำแหน่ง

G i, 2, 3,4, 5 = Grey 1, 2, 3,4, 5 - = ไม่เปลี่ยนแปลง

A = adenine C = cytocine G = guanine T = thymine tv = transversion ti = transition

No.	ตำแหน่ง	ไก่เลี้ยง	G1	G2	G3	G4	G5	substitution	Codon
1	15039	C	-	-	-	-	G	tv	3
2	15042	A	C	C	C	C	C	tv	3
3	15045	A	G	G	G	G	-	ti	3
4	15046	C	G	G	G	G	-	tv	1
5	15050	C	T	-	-	-	-	ti	2
6	15054	G	A	A	A	A	A	ti	3
7	15063	A	C	C	C	C	C	tv	3
8	15069	C	T	T	T	T	-	ti	3
9	15072	A	T	T	T	T	C	tv, tv	3
10	15073	T	G	-	-	-	-	tv	1
11	15074	C	G	-	-	-	-	tv	2
12	15075	C	T	T	T	T	-	ti	3
13	15078	A	C	C	C	C	C	tv	3
14	15086	C	G	G	G	G	G	tv	2
15	15087	C	A	A	A	A	A	tv	3
16	15090	C	T	T	T	T	T	ti	3
17	15093	A	G	G	G	G	-	ti	3
18	15096	C	-	-	-	-	T	ti	3
19	15099	C	T	T	T	T	-	ti	3
20	15102	T	C	C	C	C	C	ti	3
21	15108	G	A	A	A	A	A	ti	3
22	15123	C	A	A	A	A	A	tv	3
23	15135	G	A	A	A	A	A	ti, tv	3
24	15138	T	C	C	C	C	C	ti	3
25	15144	C	T	T	T	T	T	ti	3

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

No.	ตำแหน่ง	ไก่เลี้ยง	G1	G2	G3	G4	G5	substitution	Codon
26	15153	C	T	-	-	-	-	ti	3
27	15174	T	C	C	C	C	C	ti	3
28	15177	C	-	-	-	-	T	ti	3
29	15183	T	G	G	G	G	G	tv	3
30	15189	C	T	T	T	T	-	ti	3
31	15191	G	C	-	-	-	-	tv	2
32	15194	G	A	A	A	A	-	ti	2
33	15195	A	C	C	C	C	T	tv	3
34	15199	C	-	-	-	-	T	ti	1
35	15213	C	T	T	T	T	-	ti	3
36	15217	C	T	T	T	T	T	ti	1
37	15219	C	A	A	A	A	A	tv	3
38	15222	C	-	-	-	-	T	ti	3
39	15225	G	A	A	A	A	A	ti	3
40	15231	C	A	A	A	A	-	tv	3
41	15246	A	T	T	T	T	T	tv	3
42	15255	C	G	G	G	G	A	tv	3
43	15270	C	A	A	A	A	A	tv	3
44	15273	C	T	T	T	T	T	ti	3
45	15279	T	C	C	C	C	C	ti	3
46	15282	G	-	-	-	-	A	ti	3
47	15285	C	-	-	-	-	T	ti	3
48	15288	T	C	C	C	C	C	ti	3
49	15291	T	A	A	A	A	A	tv	3
50	15300	G	A	A	A	A	A	ti	3
51	15303	C	A	A	A	A	A	tv	3

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Cyt b นกหว้า

เปลี่ยนทั้งหมด 33 ตำแหน่ง

A 1, 2, 3,4, 5 = argus 1, 2, 3,4, 5 - = ไม่เปลี่ยนแปลง

A = adenine C = cytocine G = guanine T = thymine tv = transversion ti = transition

No.	ตำแหน่ง	ไก่เลี้ยง	A1	A2	A3	A4	A5	substitution	Codon
1	15042	A	C	C	C	C	C	tv	3
2	15045	A	G	G	G	G	G	ti	3
3	15051	C	T	T	T	T	T	tv	3
4	15052	A	G	G	G	G	G	ti	1
5	15053	T	C	C	C	C	C	ti	2
6	15054	G	A	A	A	A	A	ti	3
7	15063	A	T	T	T	T	T	tv	3
8	15072	A	C	C	C	C	C	tv	3
9	15076	C	T	T	T	T	T	ti	1
10	15096	C	A	A	A	A	A	tv	3
11	15099	C	T	T	T	T	T	ti	3
12	15101	C	T	T	T	T	T	ti	2
13	15102	T	A	A	A	A	A	ti	3
14	15108	G	A	A	A	A	A	ti	3
15	15123	C	T	T	T	T	T	ti	3
16	15135	G	A	A	A	A	A	ti	3
17	15138	T	C	C	C	C	C	ti	3
18	15144	C	T	T	T	T	T	ti	3
19	15174	T	C	C	C	C	C	ti	3
20	15179	T	A	A	A	A	G	tv, tv	2
21	15210	C	-	-	-	G	-	tv	3
22	15225	G	A	A	A	A	A	ti	3
23	15258	C	-	-	-	T	-	ti	3
24	15259	A	G	-	-	G	G	ti	1
25	15270	C	A	A	A	A	A	tv	3

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

No.	ตำแหน่ง	ไก่เลี้ยง	A1	A2	A3	A4	A5	substitution	Codon
26	15273	C	T	T	T	T	T	ti	3
27	15276	C	A	A	A	A	A	tv	3
28	15279	T	C	C	C	C	C	ti	3
29	15282	G	A	A	A	A	A	ti	3
30	15288	T	C	C	C	C	C	ti	3
31	15291	T	A	A	A	A	A	tv	3
32	15300	G	A	A	A	A	A	ti	3
33	15303	C	A	A	A	A	A	tv	3

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Cyt b นกยูง

เปลี่ยนทั้งหมด 34 ตำแหน่ง

p 1, 2, 3,4, 5 = peafowl 1, 2, 3,4, 5 = ไม่เปลี่ยนแปลง

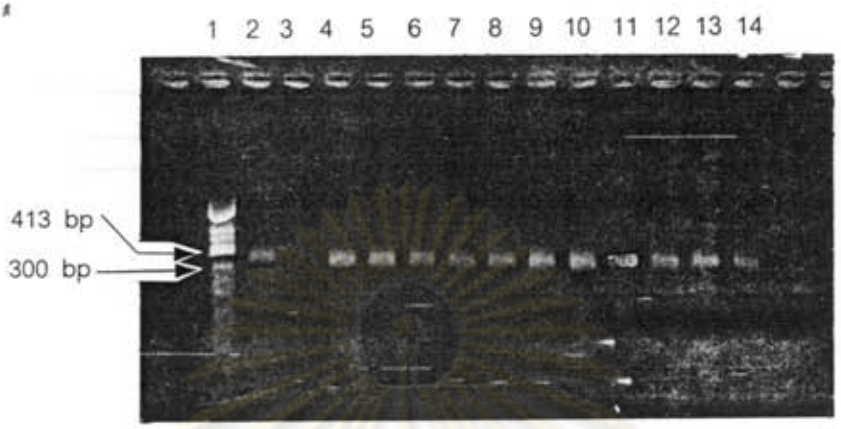
A = adenine C = cytocine G = guanine T = thymine tv = transversion ti = transition

No.	ตำแหน่ง	ไก่เลี้ยง	p1	p2	p3	p4	p5	substitution	Codon
1	15036	C	T	T	T	T	T	ti	3
2	15051	C	G	G	G	G	G	tv	3
3	15052	A	G	G	G	G	G	ti	1
4	15054	G	A	A	A	A	A	ti	3
5	15063	A	C	C	C	C	C	tv	3
6	15065	C	T	-	T	T	-	ti	2
7	15074	T	G	-	-	-	-	tv	1
8	15075	C	G	G	G	G	G	tv	2
9	15076	C	G	G	G	G	G	tv	3
10	15078	-	C	C	C	C	C	-	-
11	15092	C	A	A	A	A	A	tv	3
12	15104	T	A	A	A	A	A	tv	3
13	15107	C	T	T	T	T	T	ti	3
14	15110	G	A	A	A	A	A	ti	3
15	15143	C	T	T	T	T	T	ti	3
16	15146	C	T	T	T	T	T	ti	3
17	15152	C	T	T	T	T	T	ti	3
18	15155	C	A	A	A	A	A	tv	3
19	15158	C	T	T	T	T	T	ti	3
20	15176	T	C	C	C	C	C	ti	3
21	15185	T	C	C	C	C	C	ti	3
22	15197	A	C	C	C	C	C	tv	3
23	15219	C	T	T	T	T	T	ti	1
24	15221	C	A	A	A	A	A	tv	3
25	15227	G	A	A	A	A	A	ti	3

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

No.	ตำแหน่ง	ไก่เลี้ยง	A1	A2	A3	A4	A5	substitution	Codon
26	15249	A	G	G	G	G	G	ti	1
27	15251	C	T	T	T	T	T	ti	3
28	15272	C	A	A	A	A	A	tv	3
29	15281	T	C	C	C	C	C	ti	3
30	15284	G	A	A	A	A	A	ti	3
31	15293	T	A	A	A	A	A	tv	3
32	15302	G	A	A	A	A	A	ti	3
33	15305	C	A	A	A	A	A	tv	3
34	15326	C	A	N	N	A	N	tv	3

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

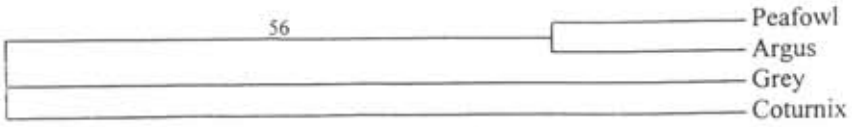


รูปแสดง PCR product แถวที่ 1 marker , แถวที่ 2 positive test , แถวที่ 3 negative test
แถวที่ 4-5 ไก่ฟ้าหางลายขวาง , แถวที่ 6-9 นกแว่นสีน้ำตาล , แถวที่ 10-14 นกแว่นสีเทา

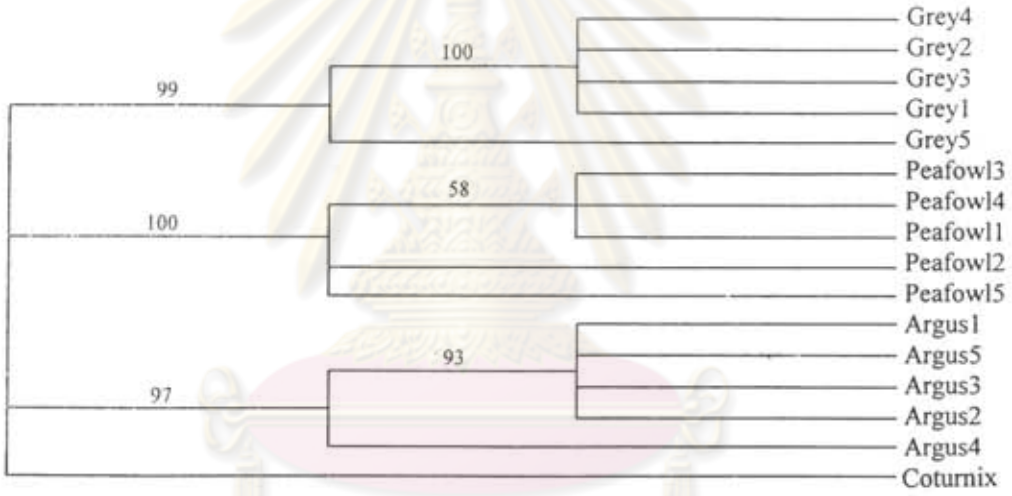
รูปแสดง PCR product แถวที่ 1 marker , แถวที่ 2 positive test , แถวที่ 3 negative test
แถวที่ 4-8 นกหว้า , แถวที่ 9-13 นกยูง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ก.



ข.



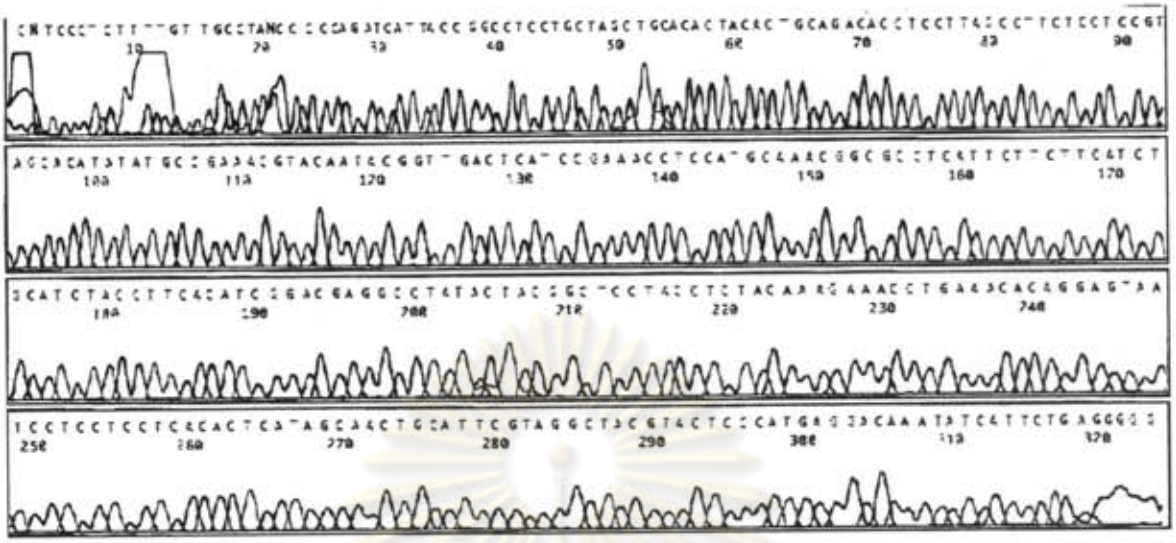
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปแสดง การเปรียบเทียบ phylogenetic tree ที่วิเคราะห์แบบ parsimony และค้นหา optimal tree โดยใช้ hueristic method พร้อมทั้งแสดงค่า bootstrapping จำนวน 100 ซ้ำ ของนกแว่นสีเทา(grey) , นกหว้า (argus) และนกยูง (peatowl) ซึ่งจะได้ tree ที่คล้ายกัน ต่างกันเพียง peafowl และ argus ของการวิจัยครั้งนี้ไม่เป็น monophyletic group แต่อย่างไรก็ดี ค่า boostrapping 56 จาก 100 ซ้ำ ถือว่ามีค่าต่ำ

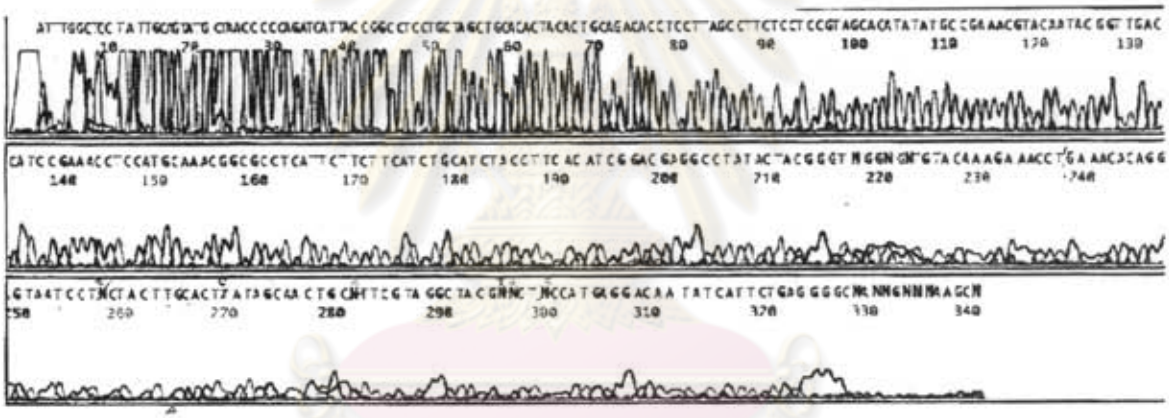
ก. Phylogenetic tree ที่หาจากลำดับนิวคลิโอไทด์จำนวน 1143 คู่เบส ซึ่งนำมาจาก genbank

ข. Phylogenetic tree ที่หาจากลำดับนิวคลิโอไทด์จำนวน 280 คู่เบส ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้

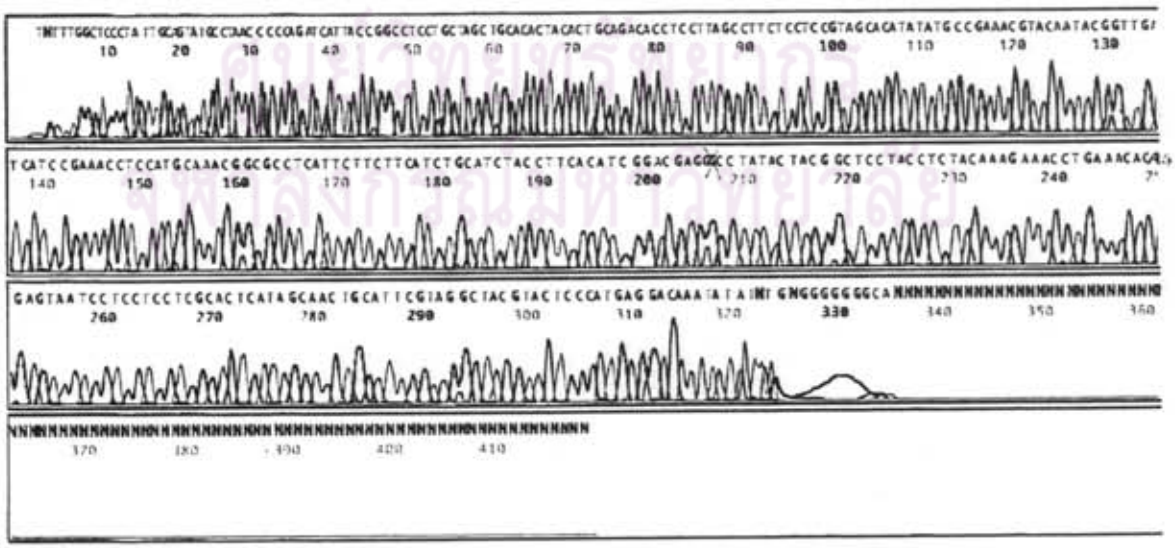
ค



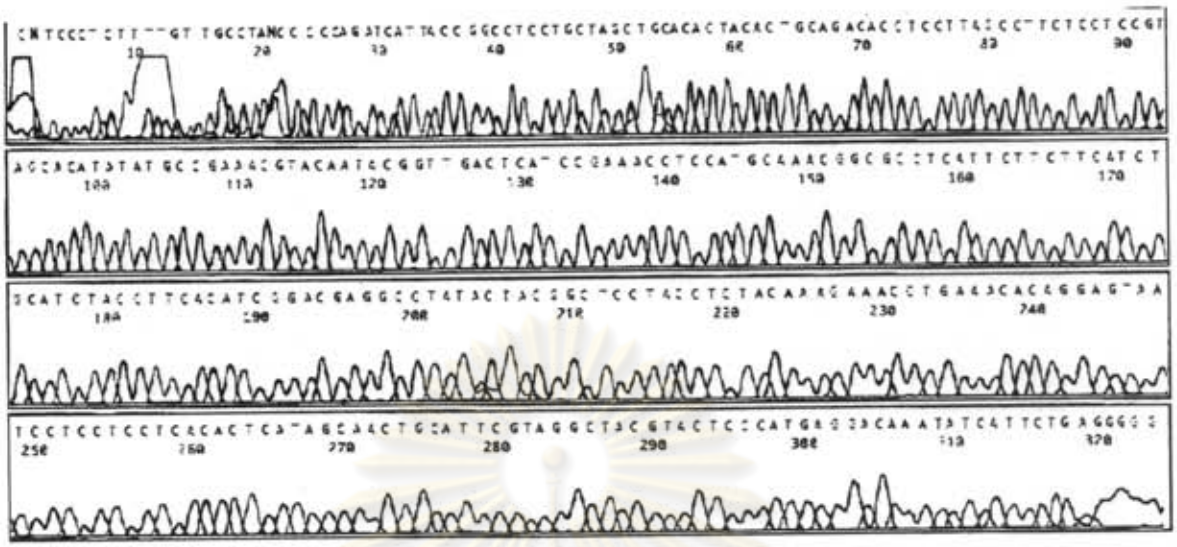
ง



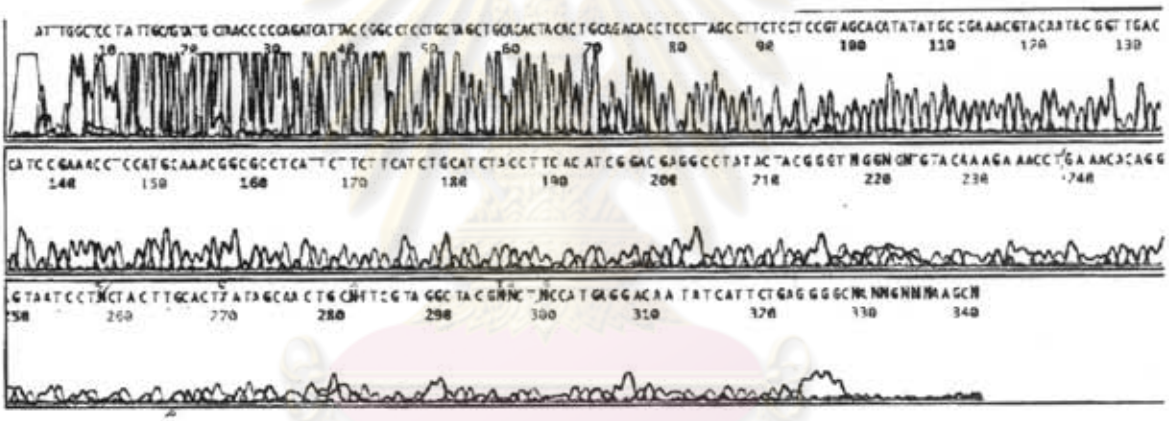
จ



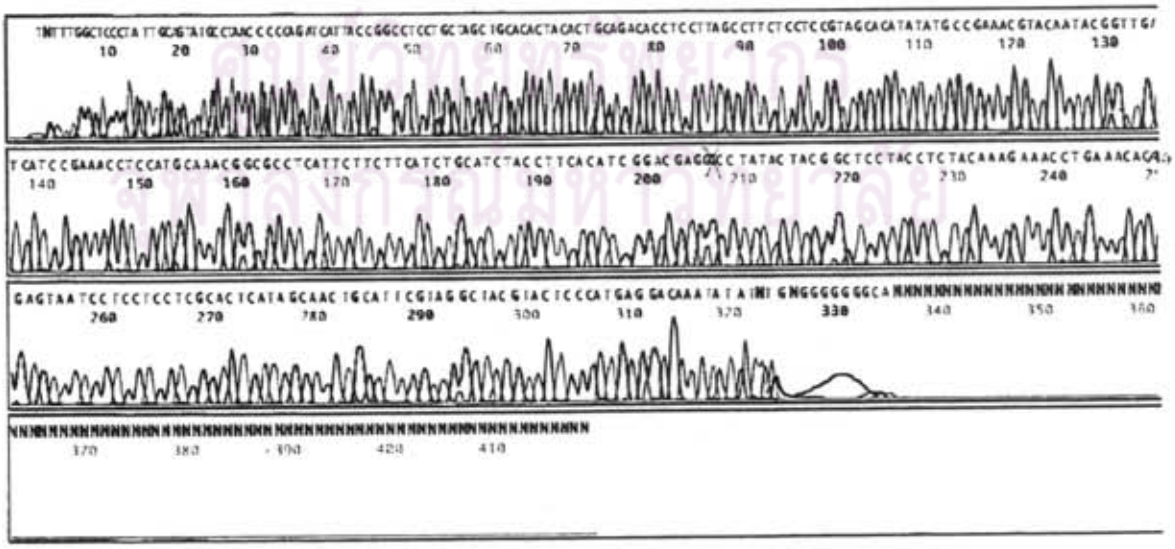
ค



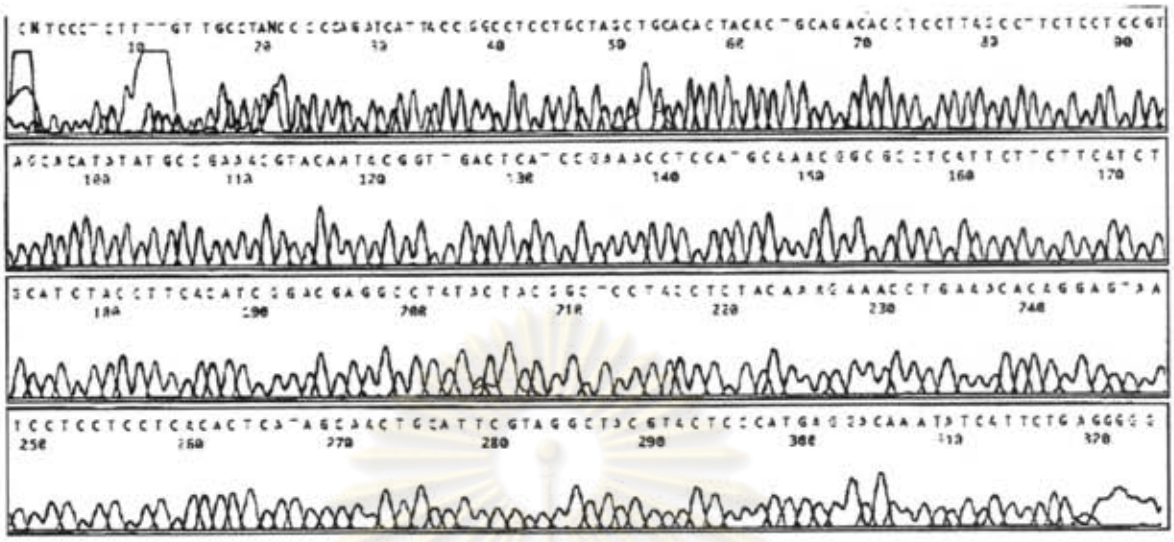
ง



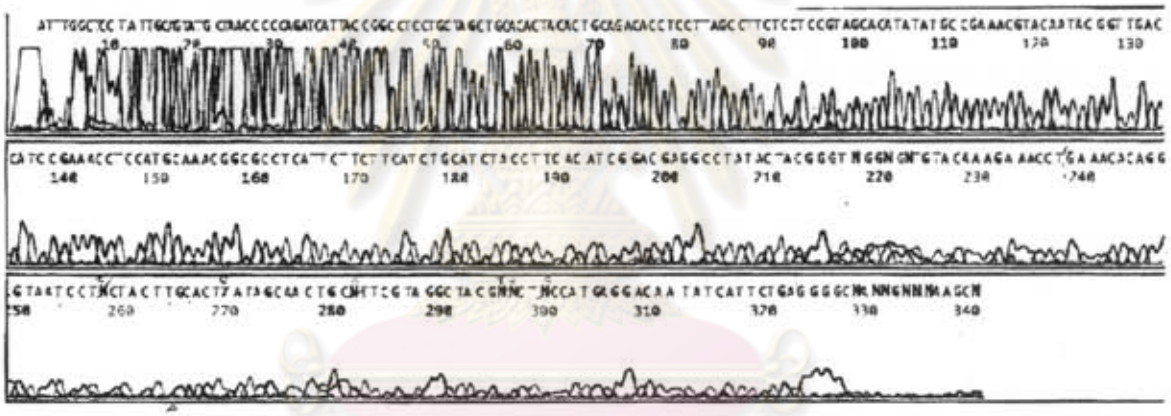
จ



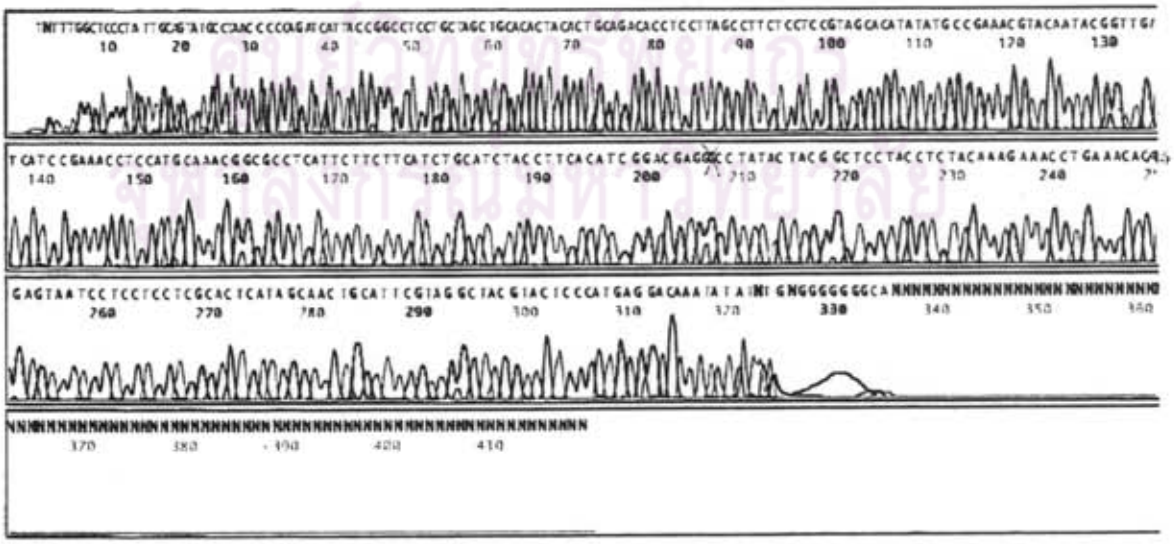
ก



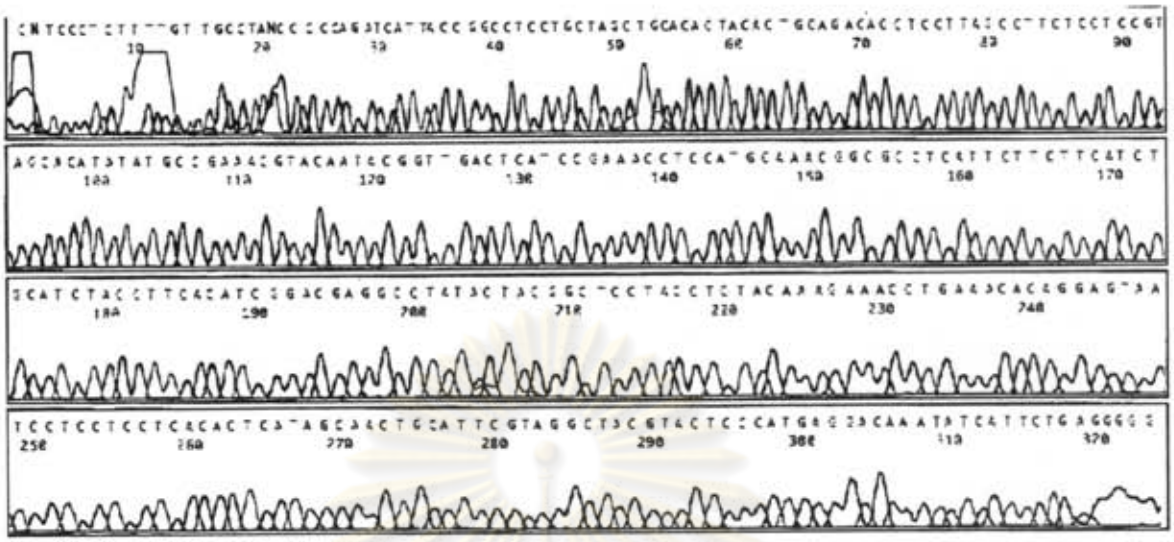
ข



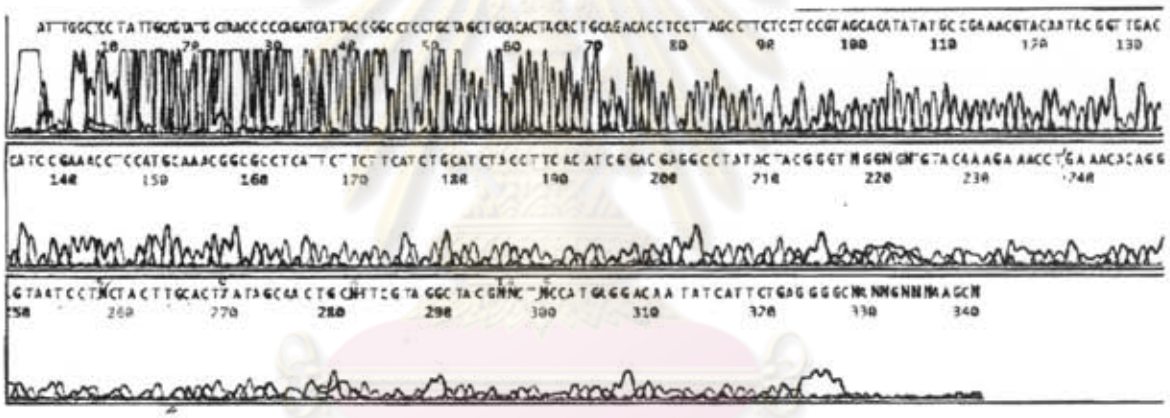
ง



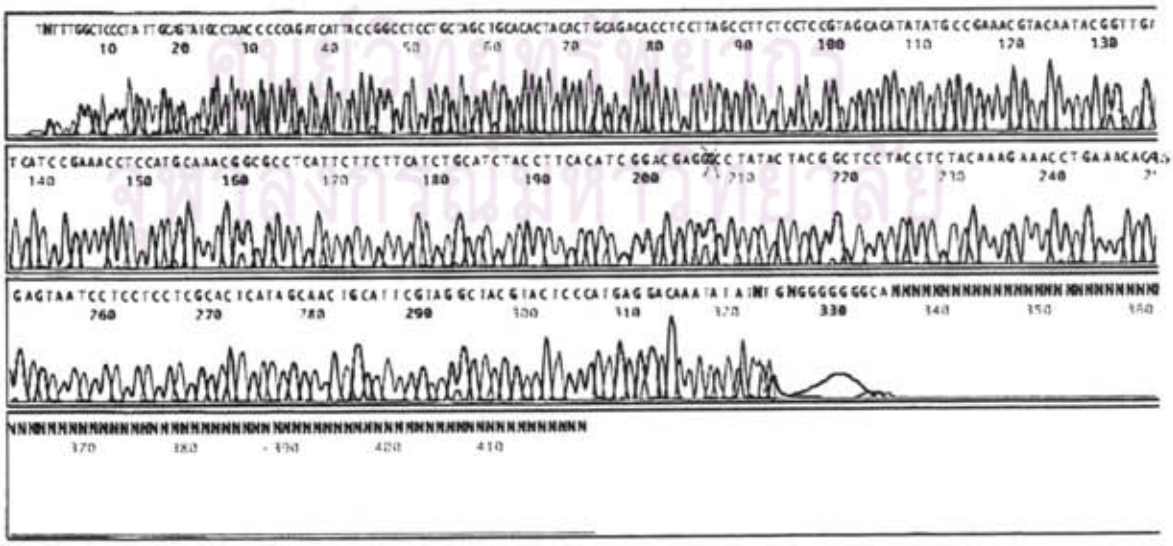
ค



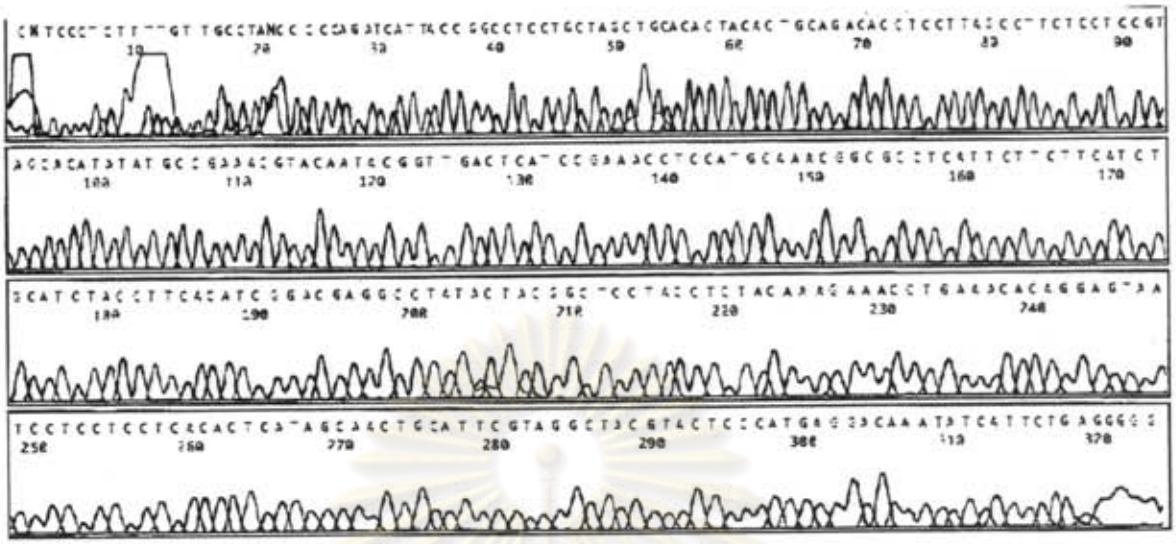
ง



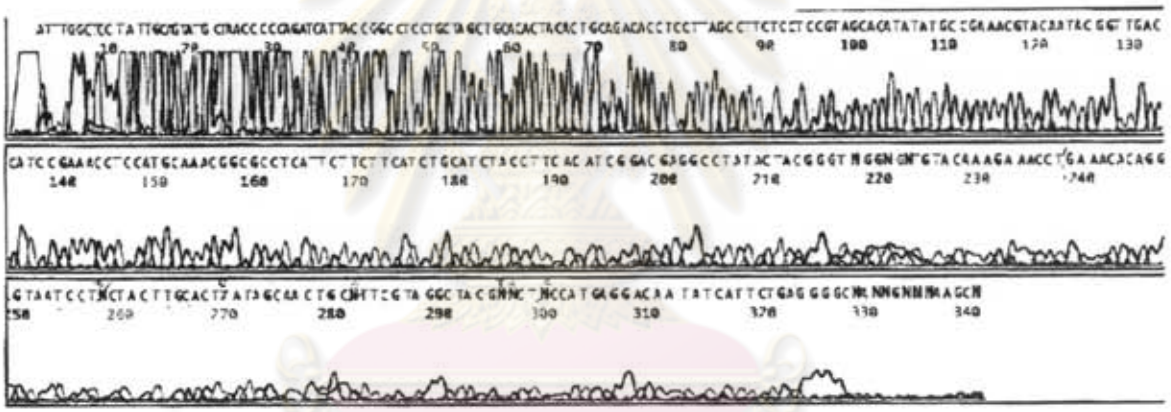
จ



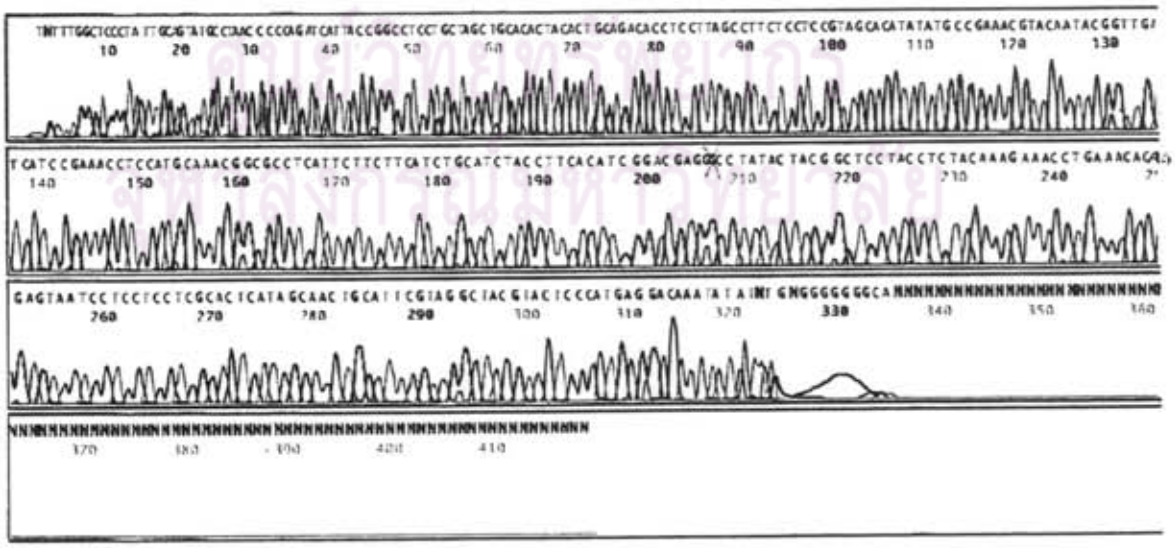
ค



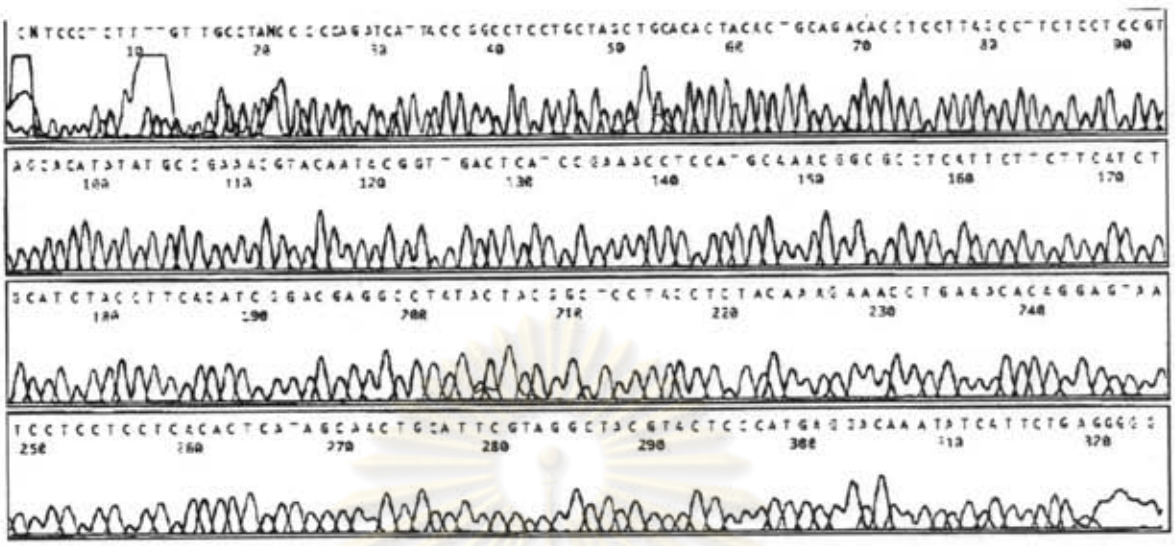
ง



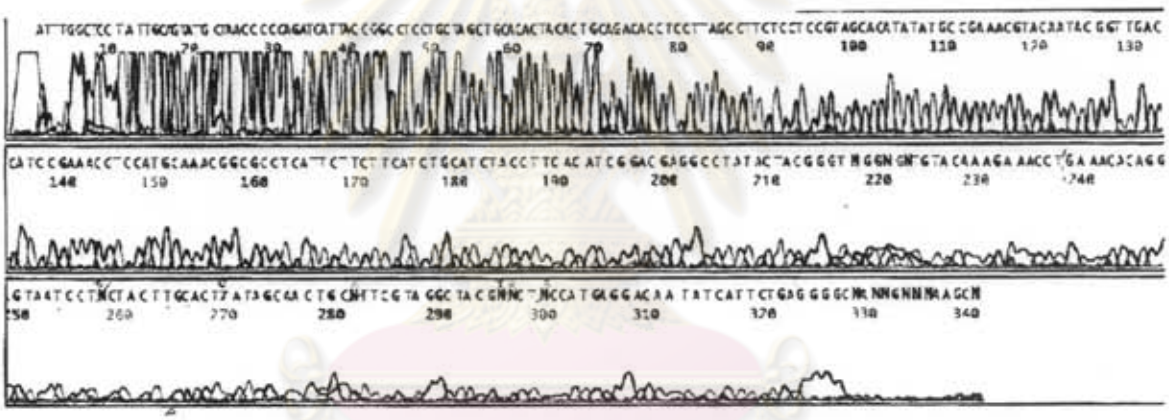
จ



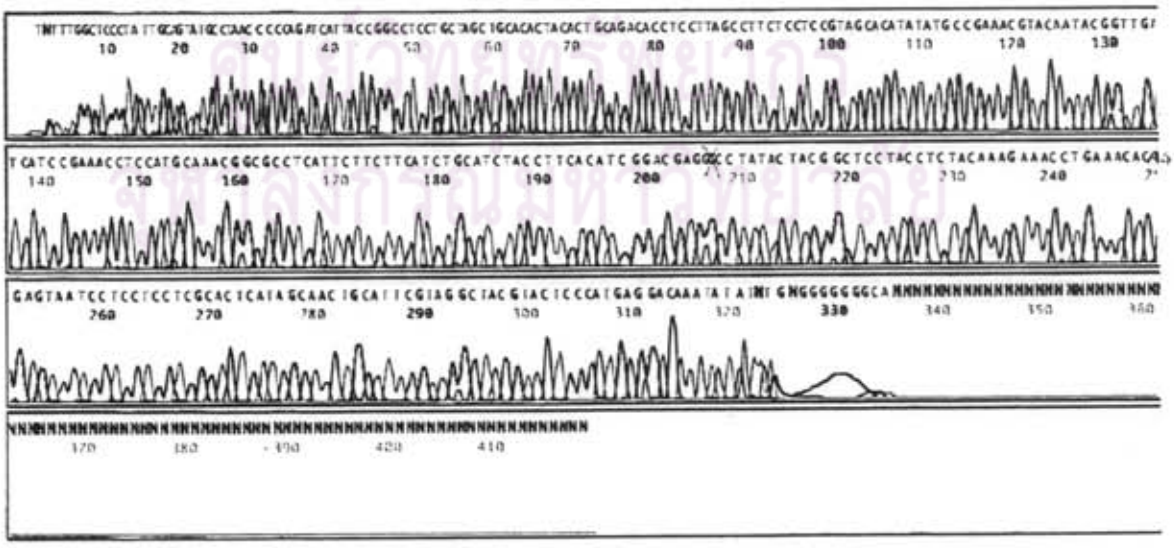
ค



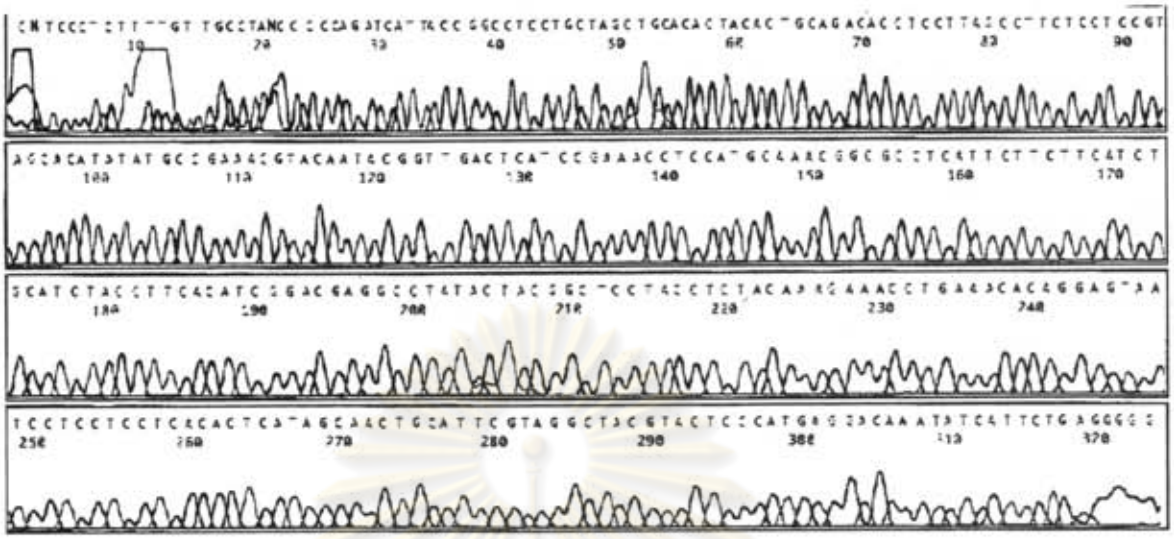
ง



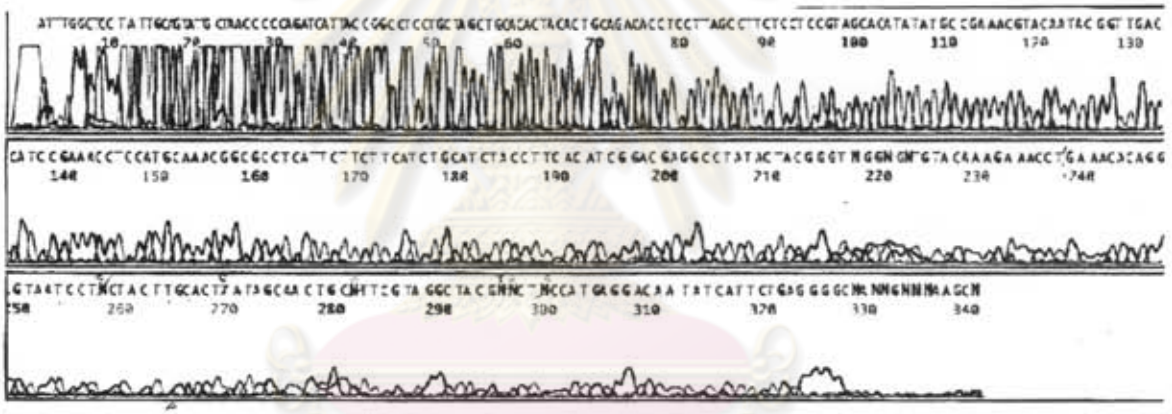
จ



ก



ข



ค