



การคัดเลือกเครื่องหมายไมโครแฮตเทลโลอิดในการระบุตัวและการทดสอบความเป็นพ่อแม่ของเสือดาว
ในกรงเลี้ยงของประเทศไทยสำหรับใช้ในการตรวจพิสูจน์ทางนิติวิทยาศาสตร์

โดย

นางสาวกิตติยา เพ็ญชาติ



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปรัชญาดุษฎีบัณฑิต

สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์และงานยุติธรรม แบบ 1.1

สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์และงานยุติธรรม

มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2568

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศิลปากร

การคัดเลือกเครื่องหมายไมโครแฮตเทลไคต์ในการระบุตัวและการทดสอบความเป็นพ่อแม่
ของเสือดาวในกรงเลี้ยงของประเทศไทยสำหรับใช้ในการตรวจพิสูจน์ทางนิติวิทยาศาสตร์



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปรัชญาดุษฎีบัณฑิต

สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์และงานยุติธรรม แบบ 1.1

สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์และงานยุติธรรม

มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2568

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศิลปากร

SELECTION OF MICROSATELLITE MARKERS FOR INDIVIDUAL IDENTIFICATION
AND PARENTAGE TESTING IN THAI CAPTIVE LEOPARD (PANTHERA PARDUS)
FOR FORENSIC PURPOSES



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for Doctor of Philosophy FORENSIC SCIENCE AND CRIMINAL JUSTICE
Department of FORENSIC SCIENCE AND CRIMINAL JUSTICE
Academic Year 2025
Copyright of Silpakorn University

หัวข้อ	การคัดเลือกเครื่องหมายไมโครแฮตเทลโลตในการระบุตัวและการทดสอบความเป็นพ่อแม่ของเสือดาวในกรงเลี้ยงของประเทศไทย สำหรับการใช้ในการตรวจพิสูจน์ทางนิติวิทยาศาสตร์
โดย	นางสาวกิตติยา เพ็ญชาติ
สาขาวิชา	นิติวิทยาศาสตร์และงานยุติธรรม แบบ 1.1
อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก	อาจารย์ ดร. ศิริรัตน์ ชูสกุลเกรียง
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ณัฐพจน์ วาฤทธิ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วันวิวัฒน์ ตุ่มน้อย

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร ได้รับพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปรัชญาดุษฎีบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กรรณ ชันจิรกุล)

พิจารณาเห็นชอบโดย
..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ยุภาพร สมิน้อย)
..... อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
(อาจารย์ ดร. ศิริรัตน์ ชูสกุลเกรียง)
..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ณัฐพจน์ วาฤทธิ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วันวิวัฒน์ ตุ่มน้อย)

..... ผู้ทรงคุณวุฒิภายใน
(อาจารย์ ดร. ศุภชัย ศุภลักษณ์นารี)

..... ผู้ทรงคุณวุฒิภายใน
(อาจารย์ ดร. อรทัย เขียวพุ่ม)

660730006 : นิติวิทยาศาสตร์และงานยุติธรรม แบบ 1.1

คำสำคัญ : เครื่องหมายพันธุกรรม, นิติวิทยาศาสตร์สัตว์ป่า, สัตว์ป่าของกลาง

นางสาว กิตติยา เพ็ญชาติ: การคัดเลือกเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ในการระบุตัวและการทดสอบความเป็นพ่อแม่ของเสือดาวในกรงเลี้ยงของประเทศไทยสำหรับใช้ในการตรวจพิสูจน์ทางนิติวิทยาศาสตร์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : อาจารย์ ดร. ศิริรัตน์ ชูสกุลเกรียง

เสือดาว (*Panthera pardus*) จัดอยู่ในบัญชีสีแดงหมายเลข 1 และเป็นสัตว์ป่าคุ้มครองที่ได้รับอนุญาตให้ครอบครองเพื่อกิจการสวนสัตว์ในประเทศไทย แม้ว่าประเทศไทยจะสามารถตรวจยืดอกและลูกเสือดาวที่ลักลอบค้าและส่งออกได้อย่างต่อเนื่อง แต่ปัจจุบันยังไม่สามารถสืบหาแหล่งที่มาของเสือดาวของกลางได้อย่างชัดเจน เครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์เป็นเครื่องหมายพันธุกรรมที่นิยมใช้ในการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลและความสัมพันธ์ทางเครือญาติในงานนิติวิทยาศาสตร์ของมนุษย์ และยังถูกนำมาใช้เพื่อสืบหาแหล่งที่มาของสัตว์ป่าของกลางด้วย การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการระบุตัวและตรวจพิสูจน์ความสัมพันธ์ระหว่างพ่อ-ลูก และ/หรือ แม่-ลูก รวมถึงศึกษาความใกล้ชิดทางพันธุกรรมระหว่างเสือดาวในสถานประกอบกิจการสวนสัตว์และเสือดาวในธรรมชาติของประเทศไทย จากตัวอย่างเสือดาวจำนวน 96 ตัว ผลการศึกษาพบว่า เครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์จำนวน 15 เครื่องหมาย เพียงพอสำหรับการระบุตัวและตรวจพิสูจน์ความสัมพันธ์ระหว่างพ่อ-ลูก และ/หรือ แม่-ลูก ของประชากรเสือดาวในประเทศไทย โดยตรวจพบจำนวนแอลลีลระหว่าง 3-13 แอลลีล และสามารถวิเคราะห์ได้ด้วยวิธีมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ 2 ชุด ซึ่งมีเครื่องหมายพันธุกรรมสำหรับจำแนกเพศ 1 เครื่องหมาย (Plex I ประกอบด้วย 9 เครื่องหมาย และ Plex II ประกอบด้วย 7 เครื่องหมาย) โดยใช้สารพันธุกรรมที่มีความเข้มข้นไม่น้อยกว่า 10 ng สำหรับการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางเครือญาติ พบคู่เสือดาวที่มีความน่าจะเป็นพ่อ-ลูก หรือ แม่-ลูก จำนวน 112 คู่ ซึ่งบางคู่มาจากสวนสัตว์ต่างแห่งกัน นอกจากนี้ยังพบว่า เสือดาวจากสถานประกอบกิจการสวนสัตว์บางแห่งมีพันธุกรรมใกล้ชิดกันมาก อย่างไรก็ตาม ประชากรเสือดาวในกรงเลี้ยงของประเทศไทยมีความแตกต่างทางพันธุกรรมจากเสือดาวในธรรมชาติของไทย ข้อมูลเหล่านี้บ่งชี้ว่าสถานประกอบกิจการสวนสัตว์ในประเทศไทยมีการซื้อขายและแลกเปลี่ยนเสือดาวระหว่างกัน และเสือดาวในกรงเลี้ยงในประเทศไทยไม่ได้มาจากประชากรเสือดาวในธรรมชาติของประเทศไทย

660730006 : Major FORENSIC SCIENCE AND CRIMINAL JUSTICE

Keyword : Genetic marker, Wildlife forensic, Seized Wildlife

Miss Kitichaya PENCHART : Selection of Microsatellite Markers for Individual Identification and Parentage Testing in Thai Captive Leopard (*Panthera pardus*) for Forensic Purposes Thesis advisor : Sirirat Choosakoonkriang, Ph.D.

The leopard (*Panthera pardus*) is listed in CITES Appendix I and is a protected species in Thailand, permitted for possession only for zoological purposes. Although Thailand has consistently seized leopard carcasses and cubs that were illegally traded and exported, the origin of these confiscated individuals remains unclear. Microsatellite markers are widely used in human forensic science for individual identification and kinship analysis, and they have also been applied to trace the origin of wildlife evidence. This study aimed to select suitable microsatellite markers for individual identification and for verifying parent-offspring relationships, as well as to investigate the genetic relatedness between leopards held in zoological facilities and those from wild populations in Thailand, using samples from 96 individuals. The results showed that a set of 15 microsatellite markers was sufficient for individual identification and for determining parent-offspring relationships within the leopard population in Thailand. These markers exhibited between 3 and 13 alleles and could be analyzed using two multiplex PCR panels, along with one sex-determining marker (Plex I comprising 9 markers and Plex II comprising 7 markers), requiring DNA of at least 10 ng. Kinship analysis identified 112 potential parent-offspring pairs, some of which originated from different zoological facilities. Furthermore, leopards from certain facilities exhibited high genetic similarity. However, the captive leopard population in Thailand was found to be genetically distinct from wild leopards in the country. These findings suggest that leopards are traded and exchanged among zoological facilities in Thailand, and that the captive population does not originate from the wild leopard population in Thailand.

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านที่ให้ความรู้ คำแนะนำ ในด้านต่าง ๆ ที่เป็นประโยชน์ต่อการปรับปรุงงานวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น ตลอดจนให้การสนับสนุนอุปกรณ์ เครื่องมือ ในการศึกษาวิจัย ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี ดังนี้

อาจารย์ ดร. ศิริรัตน์ ชูสกุลเกรียง อาจารย์ที่ปรึกษา และ อาจารย์ ดร. ศุภชัย ศุภลักษณ์นารี กรรมการภายใน (อาจารย์ประจำภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร) ให้คำปรึกษา แนะนำแนวทางในการศึกษาวิจัยด้านนิติวิทยาศาสตร์ ตลอดจนการปรับปรุงวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ผศ.ดร. ณัฐพจน์ วาฤทธิ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม (อาจารย์ประจำภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) รศ.ดร. จูติกา กิจพิพิธ (อาจารย์ประจำหลักสูตรนิติวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์) และ รศ.ดร. ภูวดล ธนะเกียรติไกร (ประธานหลักสูตรนิติวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์) ให้คำปรึกษาแนวทางการศึกษาวิจัย และให้คำแนะนำในการจัดทำข้อเสนอองานวิจัยเพื่อประกอบการยื่นขอทุนสนับสนุนการวิจัย Kaplan Graduate Award of the PANTHERA grant ตลอดจนคอยให้กำลังใจในการเรียนเสมอมา

ผศ.ดร. วันวิwah์ ตุ่มน้อย อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม (อาจารย์ประจำภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร) รศ.ดร. ยุภาพร สมิน้อย ประธานกรรมการ (อาจารย์ประจำภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา) และ อาจารย์ ดร. อรทัย เขียวพุ่ม กรรมการภายใน (อาจารย์ประจำภาควิชาฟิสิกส์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร) ให้คำแนะนำในการปรับปรุงรูปแบบวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

อาจารย์ ดร. อัครพงษ์ สวัสดิพงษ์ (อาจารย์ประจำภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์) ให้ความรู้ และคำแนะนำในการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้านพันธุศาสตร์ ประชากร

รศ.ดร.น.สพ. วรวิทย์ วัชชวัลคุ (อาจารย์วิทยาลัยสัตวแพทยศาสตร์อัครราชกุมารี มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์) และ ผศ.ดร.น.สพ. มานะกร สุขมาก (อาจารย์ประจำภาควิชาเวชศาสตร์และทรัพยากรการผลิตสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน) อำนวยความสะดวกในการใช้อุปกรณ์ เครื่องมือ สำหรับการศึกษาวิจัย

ขอขอบพระคุณ ดร. กณิศา อู่ยถาวร ผู้บังคับบัญชา (ผู้อำนวยการศูนย์นิติวิทยาศาสตร์สัตวป่า) ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างพันธุกรรมเสือดาว และอำนวยความสะดวกในการใช้อุปกรณ์ เครื่องมือ ในห้องปฏิบัติการ สำหรับการศึกษาวิจัย ตลอดจนสนับสนุนด้านการเรียน และเป็นกำลังใจที่ดี

เสมอมา

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการศูนย์นิติวิทยาศาสตร์สัตว์ป่า สำนักอนุรักษ์สัตว์ป่า กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาเวชศาสตร์และทรัพยากรการผลิตสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (กำแพงแสน) ที่อำนวยความสะดวกจัดเตรียมสถานที่ อุปกรณ์ เครื่องมือ และช่วยสนับสนุนข้อมูลที่เป็นในการศึกษาวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณ องค์การแพนเทอร่า (PANTHERA) ที่ให้การสนับสนุนทุนศึกษาวิจัย Kaplan Graduate Award

สุดท้ายนี้ ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ พ่อ แม่ ครอบครัว และขอบคุณเพื่อน ๆ ทุกคน ที่คอยให้กำลังใจ สนับสนุน และอยู่เคียงข้างตลอดระยะเวลาของการศึกษาและการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณทุกท่านอีกครั้งมา ณ ที่นี้

กิตติยา เพ็ญชาติ



สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญรูปภาพ.....	ฐ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.1.1 ผลกระทบของการลักลอบล่าและค้าสัตว์ป่า	1
1.1.2 อนุสัญญาระหว่างประเทศและกฎหมายที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการลักลอบค้าสัตว์ป่า ของประเทศไทย.....	1
1.1.3 สถานการณ์และมาตรการป้องกันการลักลอบค้าสัตว์ป่าในประเทศไทย	5
1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย	8
1.3 สมมติฐานของการวิจัย.....	9
1.4 ขอบเขตการวิจัย	9
1.5 นิยามศัพท์.....	10
1.6 ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย	12
บทที่ 2 เอกสาร และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	13
2.1 อนุกรมวิธานและเขตการกระจายพันธุ์ของเสือดาวในธรรมชาติ	13
2.1.1 การจัดจำแนกทางอนุกรมวิธาน (Taxonomy classification) และสถานภาพของเสือ ดาว	13

2.1.2 พื้นที่การกระจายพันธุ์ของเสือดาวทั่วโลก (Distribution range).....	16
2.2 ประชากรเสือดาวในกรงเลี้ยงของประเทศไทย	19
2.3 สถานการณ์การลักลอบล่าและค้าเสือดาว.....	20
2.3.1 การลักลอบล่าและค้าเสือดาวทั่วโลก.....	20
2.3.2 กรณีการลักลอบล่าและค้าเสือดาวในประเทศไทย	22
2.3.3 เส้นทางลักลอบค้าสัตว์ป่ากลุ่มเสือ.....	26
2.4 กฎหมายของประเทศไทยที่ใช้คุ้มครองเสือดาว	28
2.5 การตรวจพิสูจน์พยานหลักฐานในงานนิติวิทยาศาสตร์สัตว์ป่าของประเทศไทย	29
2.6 สารพันธุกรรมและเครื่องหมายพันธุกรรม	30
2.7 พัฒนาการของเครื่องหมายพันธุกรรมสำหรับการตรวจพิสูจน์ทางนิติวิทยาศาสตร์.....	31
2.8 การตรวจพิสูจน์พันธุกรรมเพื่อระบุตัวและหาความสัมพันธ์ทางสายเลือดในสัตว์	32
2.9 หลักการคัดเลือกเครื่องหมายพันธุกรรมและค่าสถิติเฉพาะ	33
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	36
3.1 เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี.....	36
3.2 ขั้นตอนดำเนินการวิจัย	37
3.2.1 ตัวอย่างเสือดาวที่ใช้ในการศึกษาวิจัย.....	37
3.2.2 การคัดกรองเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์เบื้องต้นจากการตรวจเอกสาร.....	38
3.2.3 การคัดกรองเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ในห้องปฏิบัติการ	39
3.2.4 ขั้นตอนการวิเคราะห์ตัวอย่างในห้องปฏิบัติการ	41
3.2.4 การทดลองวิเคราะห์เครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์แบบมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์	42
3.2.5 การตรวจสอบประสิทธิภาพของเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์	42
3.2.6 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของตัวอย่างเสือดาว	52
3.2.7 การวิเคราะห์ความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของตัวอย่างเสือดาว	53

บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล	54
4.1 การคัดกรองเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ในห้องปฏิบัติการและการทดสอบประสิทธิภาพของ เครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์	54
4.1.1 การคัดเลือกเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์โดยพิจารณาจากการกำหนดแอลลีล	54
4.1.2 การคัดเลือกเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์จากรูปแบบชุดซ้ำของนิวคลีโอไทด์	57
4.1.4 การทดสอบความเหมาะสมของข้อมูลตัวอย่างที่ได้จากการศึกษา	62
4.1.5 การทดสอบความความไม่สมดุลของลิงเกจ (Linkage Disequilibrium; LD)	65
4.1.6 การทดสอบประสิทธิภาพของเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ที่คัดเลือกได้ในแต่ละกรณี	65
4.1.6 การทดสอบการจำแนกเพศเสือดาวด้วยเครื่องหมายพันธุกรรม	73
4.2 การวิเคราะห์ผลด้วยวิธีมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ (Multiplex PCR)	75
4.3 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางสายเลือดและการวิเคราะห์ความใกล้ชิดทางพันธุกรรม	80
4.3.1 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางสายเลือด	80
4.3.2 การวิเคราะห์ความใกล้ชิดทางพันธุกรรม	83
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย	85
5.1 เครื่องหมายพันธุกรรมที่เหมาะสมในการตรวจพิสูจน์เสือดาวในงานนิติวิทยาศาสตร์	85
5.2 การตรวจพิสูจน์พันธุกรรมเสือดาวด้วยวิธีมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ (Multiplex PCR)	86
5.3 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางสายเลือดและการวิเคราะห์ความใกล้ชิดทางพันธุกรรม	86
5.4 ข้อเสนอแนะ	87
5.4.1 แนวทางการพัฒนาเครื่องหมายพันธุกรรมของเสือดาวในงานนิติวิทยาศาสตร์	87
5.4.2 แนวทางการใช้ประโยชน์ข้อมูลพันธุกรรมเสือดาวในการบังคับใช้กฎหมายของประเทศไทย	88
5.4.3 แนวทางการใช้ประโยชน์ข้อมูลพันธุกรรมเสือดาวในการอนุรักษ์เสือดาว	89
รายการอ้างอิง	90
ภาคผนวก	90

ภาคผนวก ก รายละเอียดตัวอย่างเสือดาวที่ใช้ในการศึกษาวิจัย	91
ภาคผนวก ข เครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ที่ใช้ในการคัดกรอง	102
ภาคผนวก ค ลักษณะการซ้อนทับของพีค ระยะห่างระหว่างแอลลีล และกราฟขนาดของแอลลีล ของเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์	114
ภาคผนวก ง แสดงขนาดผลิตภัณฑ์และชุดซ้ำของเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์แต่ละเครื่องหมายที่ ตรวจสอบด้วยกระบวนการทางชีวสารสนเทศจากข้อมูลจีโนมเสือดาว	139
ภาคผนวก จ แสดงตารางวิเคราะห์ผลทางสถิติ	147
ภาคผนวก ฉ แสดงตารางค่าความถี่ของแอลลีล	154
ภาคผนวก ช แสดงตารางการกำหนดระยะห่างและความยาวของแอลลีลที่เหมาะสม (Bin)	162
ภาคผนวก ซ แสดงตารางคู่ตัวอย่างเสือดาวที่มีแอลลีลสอดคล้องเป็นแม่-ลูก หรือ พ่อ-ลูก	171
ประวัติผู้เขียน	178



สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 แสดงแหล่งที่มาของเสือดาวในกรงเลี้ยงที่ใช้เป็นตัวอย่างในการศึกษา	38
ตารางที่ 2 แสดงเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์และชนิดสีฟลูออเรสเซนซ์ที่ใช้ในการคัดกรอง เครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ในห้องปฏิบัติการ	40
ตารางที่ 3 แสดงรูปแบบนิวคลีโอไทด์ที่เป็นชุดซ้ำของเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ที่ใช้ในการคัด กรองเครื่องหมายในห้องปฏิบัติการกับตัวอย่างเสือดาวจำนวน 28 ตัวอย่าง	58
ตารางที่ 4 แสดงคู่ของรหัสตัวอย่างเสือดาวที่มีพันธุกรรมเหมือนกันทุกเครื่องหมาย	61
ตารางที่ 5 แสดงค่าสถิติที่ใช้ในการทดสอบความเหมาะสมของข้อมูลตัวอย่างที่ได้จากการศึกษาและ ชุดข้อมูลที่ได้จากการจำลอง	63
ตารางที่ 6 แสดงจำนวนแอลลีลและค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรเสือดาว	66
ตารางที่ 7 แสดงผลการวิเคราะห์โอกาสการไม่คัดออกในการใช้เครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ จำนวน 15 เครื่องหมาย ตรวจพิสูจน์ระบุตัวเสือดาว	69
ตารางที่ 8 แสดงผลการวิเคราะห์โอกาสการไม่คัดออกในการใช้เครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ จำนวน 15 เครื่องหมาย ตรวจพิสูจน์ความสัมพันธ์ทางสายเลือด ระหว่างพ่อ-ลูก และแม่-ลูก เสือดาว	70
ตารางที่ 9 แสดงชนิดสีฟลูออเรสเซนซ์ และความเข้มข้นที่เหมาะสมของแต่ละเครื่องหมายที่ใช้ ใน ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ด้วยวิธีมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์	78
ตารางที่ 10 แสดงตัวอย่างคู่ของเสือดาวที่มีโอกาสมีความสัมพันธ์ทางสายเลือดแบบแม่-ลูก หรือ พ่อลูก	80

สารบัญรูปภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 แสดงจำนวนครั้งที่สามารถตรวจยึดสัตว์ป่าของกลางทั้ง 6 ชนิดได้ในประเทศไทย ระหว่างปี 2556-2566.....	6
ภาพที่ 2 แสดงต้นไม้สายวิวัฒนาการด้วยวิธีเบย์เซียน (Bayesian phylogenetic tree) ของสมาชิกทั้งหมดในสกุลแพนเทอร่า 5 ชนิด ได้แก่ สิงโต เสือดาว เสือจากัวร์ เสือโคร่ง และเสือดาวหิมะ	14
ภาพที่ 3 แสดงต้นไม้สายวิวัฒนาการของชนิดย่อยเสือดาวจากข้อมูลไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ ด้วยวิธี Maximum parsimony (ซ้าย) และวิธี Minimum evolution (ขวา)	14
ภาพที่ 4 แสดงต้นไม้สายวิวัฒนาการของชนิดเสือดาวจากข้อมูลเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ด้วยวิธีการจัดกลุ่มระยะห่างทางพันธุกรรม (Genetic distance)	15
ภาพที่ 5 แสดงแผนที่พื้นที่กระจายพันธุ์ของเสือดาวทั่วโลกโดยรวบรวมข้อมูลตั้งแต่ปี 2543-2558.17	
ภาพที่ 6 แสดงแผนที่การกระจายพันธุ์ของเสือดาวอินโดจีนของ IUCN	18
ภาพที่ 7 แผนที่แสดงการตรวจยึดเสือลายเมฆ (Clouded Leopards: สีแดง) เสือดาวหิมะ (Snow Leopards: สีเขียว) และเสือดาว (Leopards: สีเหลือง) ระหว่างปี 2542 – 2561	21
ภาพที่ 8 แผนที่แสดงการตรวจยึดเสือเสือดาวในประเทศอินเดียระหว่างปี 2544-2553	22
ภาพที่ 9 แสดงสถิติคดีการลักลอบล่าและค้าเสือดาวที่ตรวจยึดได้ในประเทศไทยระหว่างปี 2556-2567	23
ภาพที่ 10 ซากเสือดาวที่ถูกลักลอบล่าในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าทุ่งใหญ่นเรศวร	24
ภาพที่ 11 ลูกเสือดาวอายุ 50 วัน ถูกลักลอบส่งออกจากประเทศไทยไปยังประเทศอินเดีย	24
ภาพที่ 12 ลูกเสือดาว 2 ตัว ถูกยึดได้ในประเทศไทยระหว่างกำลังขนส่งไปยังประเทศอินเดีย	24
ภาพที่ 13 ลูกเสือดาวที่ตำรวจล่าซื้อและตรวจยึดได้ในบึงน้ำมันแถวบางขุนเทียน กรุงเทพมหานคร	25
ภาพที่ 14 ของกลางที่ตรวจยึดได้ประเภทหนังเสือที่ถูกลักลอบนำเข้ามาในประเทศไทย	25
ภาพที่ 15 แสดงตลาดแลกเปลี่ยนสินค้าจำพวกเสือขนาดใหญ่และเส้นทางการขนส่งสินค้าผ่านแนวชายแดนไทยและประเทศเพื่อนบ้าน	27

ภาพที่ 16 แสดงตัวอย่างลักษณะการซ้อนทับของพิกและระยะห่างระหว่างขนาดแอลลีลของ เครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ที่ดี (เครื่องหมาย PONCD2) ที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างเลือดดาวใน ห้องปฏิบัติการจำนวน 26 ตัวอย่าง.....	55
ภาพที่ 17 แสดงตัวอย่างลักษณะกราฟจำนวนแอลลีลของตัวอย่างทั้งหมดและขนาดของแอลลีล ที่ เป็นช่วงอันตรายภาคขึ้นแยกกันอย่างชัดเจนของเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ที่ดี (เครื่องหมาย PONCD2) ที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างเลือดดาวในห้องปฏิบัติการจำนวน 26 ตัวอย่าง (52 แอลลีล)	55
ภาพที่ 18 แสดงตัวอย่างลักษณะการซ้อนทับของพิกและระยะห่างระหว่างขนาดแอลลีลของ เครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ที่ถูกคัดออก (เครื่องหมาย msF115) ที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่าง เลือดดาวในห้องปฏิบัติการจำนวน 25 ตัวอย่าง	56
ภาพที่ 19 แสดงตัวอย่างลักษณะกราฟจำนวนแอลลีลของตัวอย่างทั้งหมดและขนาดของแอลลีล ที่ ต่อเนื่องกันของเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ที่ถูกคัดออก (เครื่องหมาย msF115) ที่ได้จากการ วิเคราะห์ตัวอย่างเลือดดาวในห้องปฏิบัติการจำนวน 25 ตัวอย่าง (50 แอลลีล).....	56
ภาพที่ 20 แสดงตัวอย่างลักษณะการซ้อนทับของพิกและระยะห่างระหว่างขนาดแอลลีลของ เครื่องหมายพันธุกรรม PTZF ที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างเลือดดาวในห้องปฏิบัติการจำนวน 23 ตัวอย่าง.....	73
ภาพที่ 21 แสดงผลการวิเคราะห์เครื่องหมาย PTZF กับเลือดดาวเพศเมีย	74
ภาพที่ 22 แสดงผลการวิเคราะห์เครื่องหมาย PTZF กับเลือดดาวเพศผู้	74
ภาพที่ 23 แสดงชุดเครื่องหมายกลุ่มที่ 1 (Plex I) ที่ไม่มีขนาดผลิตภัณฑ์ซ้อนทับกันในเครื่องหมาย 76	
ภาพที่ 24 แสดงความสูงและขนาดพิกของชุดเครื่องหมายกลุ่มที่ 1 (Plex I) ที่ได้จากการวิเคราะห์ผล ด้วยวิธีมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ด้วยเครื่องวิเคราะห์สารพันธุกรรม กับ GeneScan™ 600 LIZ	76
ภาพที่ 25 แสดงชุดเครื่องหมายกลุ่มที่ 2 (Plex II) ที่ไม่มีขนาดผลิตภัณฑ์ซ้อนทับกันในเครื่องหมาย 77	
ภาพที่ 26 แสดงความสูงและขนาดพิกของชุดเครื่องหมายกลุ่มที่ 2 (Plex II) ที่ได้จากการวิเคราะห์ผล ด้วยวิธีมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ด้วยเครื่องวิเคราะห์สารพันธุกรรม กับ GeneScan™ 600 LIZ	77
ภาพที่ 27 แสดงแผนภาพความสัมพันธ์ทางสายเลือดแบบแม่-ลูก หรือ พ่อ-ลูก ระหว่างสถานที่เลี้ยง และเลือดดาวของกลางที่ได้จากการตรวจยึด.....	82

ภาพที่ 28 แผนภูมิต้นไม้สายวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) แสดงความใกล้เคียงทางพันธุกรรม
 เสือดาวของประเทศไทย.....84



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

1.1.1 ผลกระทบของการลักลอบล่าและค้าสัตว์ป่า

การลักลอบล่าและค้าสัตว์ป่าถือเป็นอาชญากรรมสัตว์ป่าซึ่งเป็นปัญหาสำคัญระดับโลกสืบเนื่องมาจากอิทธิพลความเชื่อว่า อวัยวะและชิ้นส่วนของสัตว์ป่าบางชนิดมีสรรพคุณในการรักษาโรคตลอดจนสามารถใช้เป็นเครื่องรางของขลังได้ นอกจากนี้ยังมีกลุ่มคนที่มีรสนิยมบริโภคของแปลกโดยเฉพาะอย่างยิ่งกลุ่มที่มีความชื่นชอบในการบริโภคสัตว์ป่า จึงเป็นช่องทางให้นายทุนบางกลุ่มใช้เป็นเครื่องมือในการประกอบธุรกิจโดยมิชอบด้วยกฎหมาย ซึ่งจัดเป็นภัยคุกคามต่อทรัพยากรสัตว์ป่าก่อให้เกิดผลกระทบต่อโครงสร้างของประชากรและการดำรงเผ่าพันธุ์ของสัตว์ป่าในธรรมชาติ อีกทั้งยังเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้จำนวนประชากรและความหลากหลายทางพันธุกรรมของสัตว์ป่าลดลงเสี่ยงต่อการจับคู่ผสมพันธุ์แบบเลือดชิด ซึ่งเป็นการเพิ่มโอกาสให้ลักษณะด้อยทางพันธุกรรมปรากฏได้มากยิ่งขึ้น โดยเฉพาะโรคที่ถ่ายทอดทางพันธุกรรม นำมาสู่โอกาสการสูญพันธุ์ของสัตว์ป่าที่ถูกคุกคามในอนาคต การลักลอบค้าสัตว์ป่านอกจากจะเป็นการทำลายทรัพยากรสัตว์ป่าโดยตรงอันก่อให้เกิดผลกระทบกับระบบนิเวศในธรรมชาติรวมถึงระบบห่วงโซ่อาหารแล้ว ยังอาจเป็นพาหะนำไปสู่การเกิดโรคระบาดที่มาจากสัตว์สู่มนุษย์ได้อีกด้วย โดยเฉพาะการเกิดโรคอุบัติใหม่ ซึ่งส่งผลกระทบต่อมนุษย์เป็นอย่างมาก ไม่ว่าจะเป็นด้านเศรษฐกิจ สังคม ชีวิต ความเป็นอยู่

1.1.2 อนุสัญญาระหว่างประเทศและกฎหมายที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการลักลอบค้าสัตว์ป่าของประเทศไทย

ในปี พ.ศ. 2507 องค์การระหว่างประเทศเพื่อการอนุรักษ์ธรรมชาติ (International Union for Conservation of Nature; IUCN) ได้มีการจัดทำบัญชีแดงไอยูซีเอ็นของสิ่งมีชีวิต (IUCN Red List of Threatened Species) ซึ่งบัญชีนี้ได้มีการจัดจำแนกระดับความเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ของชนิดพันธุ์ต่าง ๆ โดยประเมินจากจำนวนประชากรและความรุนแรงต่อการถูกคุกคาม (Scott, 1965) สามารถจำแนกระดับความเสี่ยงจากมากไปน้อยได้ทั้งหมด 9 สถานภาพ คือ 1) EX-Extinct: สูญพันธุ์ 2) EW-Extinct in the wild: สูญพันธุ์ในธรรมชาติ 3) CR-Critically Endangered: ใกล้สูญพันธุ์อย่างยิ่ง 4) EN-Endangered: ใกล้สูญพันธุ์ 5) VU-Vulnerable: มีแนวโน้มใกล้สูญพันธุ์ 6) NT-Near Threatened: ใกล้ถูกคุกคาม 7) LC-Least Concerned: ไม่ถูกคุกคาม 8) DD-Data Deficient: ข้อมูลไม่เพียงพอที่จะประเมิน และ 9) NE-Not Evaluated: ยังไม่มีการพิจารณาประเมินสถานภาพ

ดังนั้นจึงถือได้ว่าบัญชีแดงไอยูซีเอ็นเป็นดัชนีชี้วัดสถานภาพของความหลากหลายทางชีวภาพระดับโลก (องค์การระหว่างประเทศเพื่อการอนุรักษ์ธรรมชาติ, 2023)

ประเทศไทยเป็นภาคีอนุสัญญาว่าด้วยความหลากหลายทางชีวภาพ (The Convention on Biological Diversity; CBD) ได้ลงนามในอนุสัญญาเมื่อวันที่ 12 มิถุนายน 2535 และได้ให้สัตยาบันในปี 2546 โดยมีผลบังคับใช้ในปี 2547 ซึ่งเจตนารมณ์ของอนุสัญญาดังกล่าวเพื่อการอนุรักษ์และใช้ประโยชน์ทรัพยากรธรรมชาติอย่างยั่งยืน โดยอนุสัญญานี้อยู่ในความรับผิดชอบหลักของกระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม ซึ่งมีสำนักงานนโยบายและแผนทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อมเป็นหน่วยงานประสานหลัก (National Focal Point) (สำนักงานนโยบายและแผนสิ่งแวดล้อม, 2545) ตามมาตรา 7A ถึง 7D แห่งอนุสัญญาว่าด้วยความหลากหลายทางชีวภาพ ได้กำหนดแนวทางให้แต่ละภาคีต้องดำเนินการจำแนกระบุและติดตามตรวจสอบความหลากหลายทางชีวภาพ และกิจกรรมซึ่งมีหรือมีแนวโน้มว่าจะมีผลกระทบเสียหายอย่างสำคัญต่อการอนุรักษ์และการใช้ประโยชน์ความหลากหลายทางชีวภาพอย่างยั่งยืน ดังนั้นกิจกรรมการค้าสัตว์ป่าอย่างเสรีจึงถือเป็นกิจกรรมที่อาจก่อให้เกิดผลกระทบเสียหายต่อทรัพยากรธรรมชาติ และการใช้ประโยชน์จากทรัพยากรธรรมชาติที่มากเกินไป กระทบต่อความหลากหลายทางชีวภาพ ซึ่งไม่สอดคล้องกับเจตนารมณ์ของอนุสัญญาว่าด้วยความหลากหลายทางชีวภาพ เพื่อให้การใช้ประโยชน์จากทรัพยากรธรรมชาติอย่างยั่งยืน จึงจำเป็นต้องมีหลักเกณฑ์ในการควบคุมการใช้ประโยชน์จากทรัพยากรธรรมชาติ (สำนักงานนโยบายและแผนทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม, 2544)

อนุสัญญาไซเตส (CITES) หรือ อนุสัญญาว่าด้วยการค้าระหว่างประเทศซึ่งชนิดสัตว์ป่าและพืชป่าที่ใกล้สูญพันธุ์ (The Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora) เป็นอนุสัญญาที่เกิดจากการลงนามข้อตกลงระดับนานาชาติระหว่างรัฐบาลของประเทศหรือรัฐต่าง ๆ ซึ่งประเทศไทยได้ร่วมลงนามเมื่อวันที่ 3 มีนาคม 2516 ณ กรุงวอชิงตัน ดี.ซี. ประเทศสหรัฐอเมริกา หรือที่เรียกว่า อนุสัญญาวอชิงตัน (Washington Convention) มีผลบังคับใช้เมื่อวันที่ 1 กรกฎาคม 2518 โดยประเทศไทยได้ให้สัตยาบันในวันที่ 21 มกราคม พ.ศ. 2526 (กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม, 2566) มีเป้าหมายเพื่ออนุรักษ์ทรัพยากรที่มีชีวิตในโลกเพื่อประโยชน์ของมนุษยชาติต่อไปในอนาคต เนื่องจากในปี พ.ศ. 2503 ประเทศไทยมีการล่าและค้าสัตว์ป่าอย่างมากโดยไม่มีมาตรการในการควบคุม ดังนั้นอนุสัญญานี้จึงได้กำหนดมาตรการในการควบคุมการค้าสัตว์ป่าและพืชป่าระหว่างประเทศที่ใกล้สูญพันธุ์ ซึ่งตามมาตรา 2 แห่งอนุสัญญาว่าด้วยการค้าระหว่างประเทศซึ่งชนิดสัตว์ป่าและพืชป่าที่ใกล้สูญพันธุ์ ได้กำหนดชนิดสัตว์ป่าและพืชป่าตามสถานภาพความเสี่ยงใกล้สูญพันธุ์ไว้ทั้งหมด 3 บัญชี โดยอ้างอิงข้อมูลจากบัญชีแดงไอยูซีเอ็น (IUCN Red List of Threatened Species) ใช้เป็นข้อตกลงระหว่างภาคีว่า จะไม่อนุญาตให้มีการค้า

ตัวอย่างพันธุ์ของชนิดพันธุ์ในบัญชีแนบท้ายหมายเลข 1-3 เว้นแต่จะเป็นไปตามบทบัญญัติแห่งอนุสัญญาฉบับนี้

1) บัญชีแนบท้ายหมายเลข 1 (Appendix I) ประกอบด้วยชนิดพันธุ์ที่อยู่ในภาวะใกล้สูญพันธุ์ และได้รับหรืออาจได้รับผลกระทบจากการค้าตัวอย่างพันธุ์ของชนิดพันธุ์ดังกล่าว โดยจะอนุญาตส่งออกได้เฉพาะในกรณีพิเศษเท่านั้น ซึ่งตามมาตรา 3 แห่งอนุสัญญาว่าด้วยการค้าระหว่างประเทศซึ่งชนิดสัตว์ป่าและพืชป่าที่ใกล้สูญพันธุ์ มีข้อบังคับการค้าตัวอย่างชนิดพันธุ์ในบัญชีแนบท้ายหมายเลข 1 รวมถึงการส่งออกและนำเข้าซึ่งตัวอย่างชนิดพันธุ์ใดใดของชนิดพันธุ์ในบัญชีแนบท้ายหมายเลข 1 จะต้องได้รับและสำแดงล่วงหน้าซึ่งใบอนุญาตส่งออก (Export) นำเข้า (Import) นำผ่าน (Transit) โดยมีเจ้าหน้าที่ฝ่ายวิทยาการแห่งรัฐที่ส่งออกและนำเข้าให้ความเห็นว่า การส่งออกและการนำเข้ดังกล่าวจะไม่เป็นอันตรายต่อความอยู่รอดของชนิดพันธุ์นั้น ๆ และการได้มาของตัวอย่างพันธุ์ดังกล่าวไม่ขัดต่อกฎหมายว่าด้วยการคุ้มครองพันธุ์สัตว์และพันธุ์พืชของรัฐนั้น

2) บัญชีแนบท้ายหมายเลข 2 (Appendix II) ประกอบด้วยชนิดพันธุ์ที่ยังมีได้อยู่ในสถานะใกล้สูญพันธุ์ แต่อาจเกิดภาวะดังกล่าวได้ เว้นแต่จะมีข้อบังคับที่เข้มงวดควบคุมการค้าตัวอย่างพันธุ์ของชนิดนั้น ๆ ซึ่งตามมาตรา 4 แห่งอนุสัญญาว่าด้วยการค้าระหว่างประเทศซึ่งชนิดสัตว์ป่าและพืชป่าที่ใกล้สูญพันธุ์ กำหนดข้อบังคับการค้าตัวอย่างชนิดพันธุ์ในบัญชีแนบท้ายหมายเลข 2 จะต้องได้รับและสำแดงล่วงหน้าซึ่งใบอนุญาตส่งออกและนำเข้า หรือใบรับรองส่งกลับออกไป (Re-export) โดยมีเจ้าหน้าที่ฝ่ายวิทยาการแห่งรัฐที่ส่งออกและนำเข้าให้ความเห็นว่า การส่งออกและการนำเข้ดังกล่าวจะไม่เป็นอันตรายต่อความอยู่รอดของชนิดพันธุ์นั้น ๆ และการได้มาของตัวอย่างพันธุ์ดังกล่าวไม่ขัดต่อกฎหมายว่าด้วยการคุ้มครองพันธุ์สัตว์และพันธุ์พืชของรัฐนั้น นอกจากนี้เจ้าหน้าที่ฝ่ายวิทยาการของทุกภาคีจะต้องตรวจสอบการออกใบอนุญาตส่งออกโดยรัฐแห่งตนและจำนวนที่ส่งออกจริง ตลอดจนให้ความเห็นว่าสมควรจำกัดปริมาณเพื่อเป็นการบำรุงรักษาชนิดพันธุ์นั้น ๆ หรือไม่ โดยจะต้องมีมาตรการที่เหมาะสมในการจำกัดการออกใบอนุญาตส่งออกซึ่งตัวอย่างพันธุ์ของชนิดพันธุ์นั้น ๆ ด้วย

3) บัญชีแนบท้ายหมายเลข 3 (Appendix III) ประกอบด้วยชนิดพันธุ์ทุกชนิดซึ่งภาคีใดภาคีหนึ่งได้กำหนดให้อยู่ภายใต้ข้อบังคับควบคุมในเขตอำนาจแห่งตน เพื่อให้ภาคีอื่น ๆ ร่วมมือในการควบคุมการค้าชนิดพันธุ์ดังกล่าวด้วย ซึ่งตามมาตรา 5 แห่งอนุสัญญาว่าด้วยการค้าระหว่างประเทศซึ่งชนิดสัตว์ป่าและพืชป่าที่ใกล้สูญพันธุ์ มีข้อบังคับการค้าตัวอย่างชนิดพันธุ์ในบัญชีแนบท้ายหมายเลข 3 ว่า จะต้องได้รับและสำแดงล่วงหน้าซึ่งใบอนุญาตส่งออกและนำเข้า ซึ่งการส่งออกและนำเข้าตัวอย่างพันธุ์ดังกล่าวจะต้องไม่ขัดต่อกฎหมายว่าด้วยการคุ้มครองพันธุ์สัตว์และพันธุ์พืชของรัฐนั้น ในกรณีส่งกลับออกไปอนุโลมให้ รัฐผู้นำเข้ารับใบรับรองซึ่งออกโดยเจ้าหน้าที่ฝ่ายปฏิบัติการแห่งรัฐผู้ส่งกลับออกไป และได้ระบุตัวอย่างพันธุ์นั้น ๆ ได้ผ่านการแปรรูปในรัฐดังกล่าว หรือกำลังส่งกลับออกไปจากรัฐดังกล่าว

เนื่องจากประเทศไทยเป็นประเทศภาคีในอนุสัญญาไซเตส ดังนั้นการค้าระหว่างประเทศ ซึ่งชนิดสัตว์ป่าและพืชป่าที่ใกล้สูญพันธุ์ จึงต้องปฏิบัติตามข้อกำหนดการนำเข้าส่งออกซึ่งชนิดพันธุ์ ระหว่างประเทศของอนุสัญญาไซเตส อย่างไรก็ตามในขณะนั้นประเทศไทยมีพระราชบัญญัติสงวนและคุ้มครองสัตว์ป่า พ.ศ. 2503 และพระราชบัญญัติพันธุ์พืช พ.ศ. 2518 บังคับใช้อยู่ ซึ่งบทบัญญัติแห่งกฎหมายทั้งสองฉบับไม่ครอบคลุมหลักเกณฑ์การค้าระหว่างประเทศซึ่งชนิดสัตว์ป่าและพืชป่าที่ใกล้สูญพันธุ์ของอนุสัญญาไซเตส ทำให้ประเทศไทยสามารถนำเข้าชนิดพันธุ์สัตว์ป่าและพืชป่าที่ใกล้สูญพันธุ์ เพื่อการค้าได้อย่างเสรี โดยเฉพาะการนำเข้าสัตว์ป่าในบัญชีแนบท้ายหมายเลข 1 ด้วยเหตุนี้จึงทำให้ ประเทศไทยถูกคว่ำบาตรทางการค้า (Trade ban) เมื่อวันที่ 18 เมษายน 2534 ผลกระทบจากการถูกคว่ำบาตรครั้งนั้นทำให้ประเทศไทยไม่สามารถส่งออกสินค้าที่อยู่ในความควบคุมของอนุสัญญาไซเตสได้ สร้างความเสียหายให้กับประเทศไทยมูลค่าหลายพันล้านบาท หลังจากนั้นประเทศไทยจึงได้ตราพระราชบัญญัติสงวนและคุ้มครองสัตว์ป่า พ.ศ. 2535 ขึ้น ซึ่งในมาตรา 23 และ 24 แห่งพระราชบัญญัตินี้มีมาตรการควบคุมการค้าสัตว์ป่าระหว่างประเทศตามข้อตกลงของอนุสัญญาไซเตส เป็นผลให้ประเทศไทยไม่ถูกคว่ำบาตรทางการค้าจากคณะกรรมการอนุสัญญาไซเตสตั้งแต่เดือนเมษายน 2535 เป็นต้นมา (สุปานิ บุญวงศ์, 2539)

ในปี 2557 ประเทศไทยถูกจับตาจากคณะกรรมการอนุสัญญาไซเตส เนื่องจากประเทศไทย มีตลาดค้างาช้าง และมีการตรวจยึดการนำเข้างาช้างได้จำนวนมาก จึงอาจเป็นช่องทางเอื้อให้ เครือข่ายอาชญากรรมสามารถฟอกงาช้างที่ถูกลักลอบนำเข้าอย่างผิดกฎหมายได้ ประเทศไทยจึงตก อยู่ในสถานการณ์เสี่ยงต่อการถูกคว่ำบาตรทางการค้าอีกครั้ง หากประเทศไทยยังไม่มีมาตรการ ควบคุมการฟอกงาช้างที่ลักลอบนำเข้าภายในระยะเวลา 1 ปี ประเทศไทยจะต้องสูญเสียรายได้ มากกว่า 9,700 ล้านบาทต่อปี จากการถูกคว่ำบาตรทางการค้า (องค์การสัตว์ป่าโลกสากลแห่ง ประเทศไทย, 2557) ในครั้งนั้นประเทศไทยได้ตราพระราชบัญญัติงาช้าง พ.ศ. 2558 ขึ้น บังคับให้ ผู้ครอบครองงาช้าง และ/หรือ ผลิตภัณฑ์ที่ทำจากงาช้างมาขึ้นทะเบียนครอบครอง และมีการประกาศ ให้ช้างแอฟริกา (*Loxodonta Africana*) เป็นสัตว์ป่าคุ้มครองเช่นเดียวกับช้าง (*Elephas maximus*) หรือช้างเอเชีย ซึ่งเป็นช้างชนิดพันธุ์ของไทย ตามกฎกระทรวง กำหนดให้สัตว์ป่าบางชนิดเป็นสัตว์ป่า คุ้มครอง พ.ศ. 2558 ทั้งนี้มีเจตนารมณ์เพื่อควบคุมการค้า การครอบครอง การนำเข้า การส่งออก และ การนำผ่านงาช้างหรือผลิตภัณฑ์ที่ทำจากงาช้าง เพื่อมิให้งาช้างหรือผลิตภัณฑ์งาช้างที่ถูกลักลอบ นำเข้ามาปะปนกับงาช้างที่ได้มาโดยชอบด้วยกฎหมาย นั่นคืองาช้างหรือผลิตภัณฑ์งาช้างที่ได้มาจาก ช้างตามกฎหมายว่าด้วยสัตว์พาหนะ นอกจากนี้ยังมีคำสั่งหัวหน้าคณะรักษาความสงบแห่งชาติ ที่ 60/2559 เรื่อง มาตรการป้องกันการนำช้างป่ามาสวมสิทธิเป็นช้างบ้าน ใช้บังคับเมื่อวันที่ 28 กันยายน 2559 โดยได้กำหนดระยะเวลาให้เจ้าของช้างนำช้างพาหนะมาขึ้นทะเบียนและเก็บตัวอย่าง เลือดเพื่อตรวจสอบพันธุกรรมภายในเวลาหนึ่งร้อยแปดสิบวันนับตั้งแต่คำสั่งนี้มีผลใช้บังคับ ซึ่งคำสั่งนี้

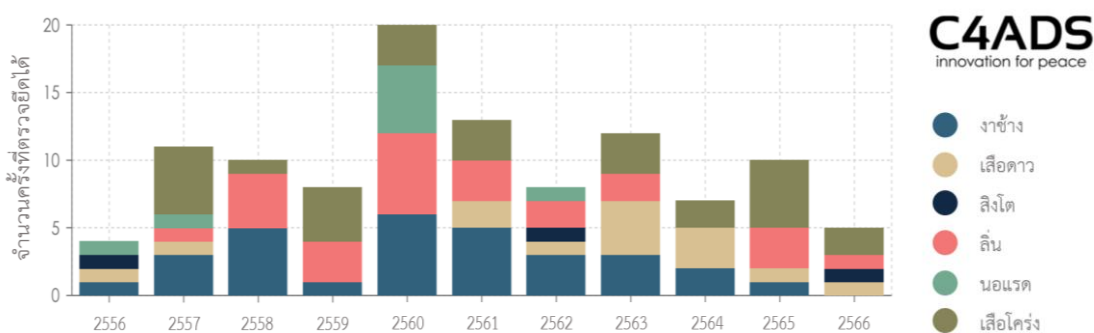
มีเจตนารมณ์เดียวกับพระราชบัญญัติงาช้าง พ.ศ. 2558 เพื่อมิให้ประเทศไทยถูกระงับการนำเข้า และส่งออกสัตว์ป่าและพืชป่าตามอนุสัญญาไซเตส อันจะส่งผลกระทบต่อเศรษฐกิจและความน่าเชื่อถือของประเทศได้ ผลจากการดำเนินการดังกล่าวทั้งหมดทำให้ประเทศไทยไม่ถูกคว่ำบาตรทางการค้าจาก คณะกรรมาธิการไซเตส

ปัจจุบันประเทศไทยได้มีการตราพระราชบัญญัติสงวนและคุ้มครองสัตว์ป่า พ.ศ. 2562 ซึ่งบังคับใช้ตั้งแต่วันที่ 29 พฤษภาคม 2562 จนถึงปัจจุบัน โดยพระราชบัญญัตินี้ได้มีการปรับปรุง บัญชีรายชื่อสัตว์ป่าสงวน รวมถึงอาศัยอำนาจตามความในมาตรา 9 แห่งพระราชบัญญัตินี้ ออกประกาศกระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม เรื่อง กำหนดให้สัตว์บางชนิดเป็นสัตว์ป่า ควบคุม พ.ศ. 2565 ซึ่งสัตว์ป่าควบคุมทั้งหมดเป็นสัตว์ป่าชนิดที่มีถิ่นกำเนิดนอกประเทศ ในส่วนบัญชี รายชื่อสัตว์ป่าคุ้มครองได้กำหนดตามบัญชีท้ายกฎกระทรวงกำหนดให้สัตว์ป่าบางชนิดเป็นสัตว์ป่าคุ้มครอง พ.ศ. 2567 นอกจากนี้พระราชบัญญัติสงวนและคุ้มครองสัตว์ป่า พ.ศ. 2562 ได้เพิ่มบทลงโทษกรณี ลักลอบล่า ค้า นำเข้าหรือส่งออกสัตว์ป่าสงวน สัตว์ป่าคุ้มครอง และสัตว์ป่าควบคุมโดยไม่ได้รับอนุญาต ผู้ฝ่าฝืนมีโทษตามมาตรา 89 หรือ 93 จำคุกไม่เกินสิบปี หรือปรับไม่เกินหนึ่งล้านบาท หรือทั้งจำทั้งปรับ สำหรับผู้ครอบครองสัตว์ป่าสงวนและสัตว์ป่าคุ้มครองโดยไม่ได้รับอนุญาต ผู้ฝ่าฝืนมีโทษตามมาตรา 92 จำคุกไม่เกินห้าปี หรือปรับไม่เกินห้าแสนบาท หรือทั้งจำทั้งปรับ

1.1.3 สถานการณ์และมาตรการป้องกันการลักลอบค้าสัตว์ป่าในประเทศไทย

ปัจจุบันมีการตรวจยึดซากสัตว์ป่ารวมถึงผลิตภัณฑ์จากสัตว์ป่าได้ทั่วโลก ประเภทสัตว์ป่า ของกลางที่ศูนย์ศึกษาชั้นสูงด้านความมั่นคง (Center for Advanced Defense Studies; C4ADS) ให้ความสำคัญ ได้แก่ งาช้าง เสือดาว สิงโต ลิ้น นอแรด และเสือโคร่ง จากข้อมูลการตรวจยึดสัตว์ป่า ของกลางประเภทดังกล่าวในประเทศไทยระหว่างปี 2556-2566 พบว่า มีการตรวจยึดของกลางที่ได้จากการกระทำความผิดเกี่ยวกับสัตว์ป่าชนิดที่มีเขตการกระจายพันธุ์และมีการขยายพันธุ์ในกรงเลี้ยงจำนวนมากในประเทศไทยนั้น ส่วนใหญ่เป็นสัตว์ในกลุ่มเสือ โดยเฉพาะเสือโคร่ง และเสือดาว ซึ่งสามารถตรวจ ยึดของกลางได้ทุกปี (ภาพที่ 1) (C4ADS, 2024) โดยทั้ง 2 ชนิดดังกล่าว จัดเป็นสัตว์ป่าคุ้มครองของไทย ตามพระราชบัญญัติสงวนและคุ้มครองสัตว์ป่า พ.ศ. 2562 และอยู่ในบัญชีแนบท้ายหมายเลข 1 แห่งอนุสัญญาไซเตส ซึ่งมักมีการลักลอบล่า ค้าซาก หนัง เขี้ยว เล็บ รวมไปถึงการลักลอบส่งออก ลูกเสือที่มีชีวิต กระนั้นการตรวจยึดของกลางได้ในแต่ละครั้ง เจ้าหน้าที่ไม่สามารถสืบหาแหล่งที่มาของ ลูกเสือของกลางเพื่อใช้ในการขยายผลดำเนินคดีกับผู้ประกอบการหรือผู้กระทำความผิดรายใหญ่ได้ จากการ สืบสวนสอบสวนของเจ้าหน้าที่พบว่า มีความเป็นไปได้ที่ลูกเสือของกลางอาจมีที่มาจากสถานประกอบการ สวนสัตว์ที่ได้รับใบอนุญาตจัดตั้งถูกต้องตามกฎหมาย (Wildlife Friend Foundation, 2019) อย่างไรก็ตาม ที่ผ่านมามีหลักฐานเพียงพอสำหรับใช้ในการดำเนินคดีกับสถานประกอบกิจการสวนสัตว์ ที่ต้องสงสัยได้ แม้ว่าการมอทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช จะมีการจัดทำทะเบียนประวัติเสือโคร่ง

ด้วยการฝังรหัสไมโครชิพเสือโคร่งแต่ละตัว แต่บ่อยครั้งก็ไม่สามารถสแกนหาไมโครชิพเดิมที่เคยฝังไปแล้วได้ จึงต้องมีการฝังไมโครชิพรหัสใหม่ ทำให้เกิดความสับสนในการระบุตัว และบางครั้งจำเป็นต้องอาศัยการเปรียบเทียบลายเสือโคร่งด้วยสายตาจากภาพถ่ายที่มีการบันทึกไว้ในทะเบียนประวัติกับเสือโคร่งต้องสงสัย ทำให้ยากต่อการระบุตัวเสือโคร่ง



ภาพที่ 1 แสดงจำนวนครั้งที่สามารถตรวจยึดสัตว์ป่าของกลางทั้ง 6 ชนิดได้ในประเทศไทย

ระหว่างปี 2556-2566

แหล่งที่มา: (C4ADS, 2024)

กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช ในฐานะหน่วยงานที่มีหน้าที่กำกับดูแลผู้ครอบครองสัตว์ป่า ซากสัตว์ป่า รวมถึงสถานที่ประกอบกิจการสวนสัตว์ ได้เห็นความสำคัญของปัญหาการลักลอบค้าสัตว์ป่า จึงได้มีการเพิ่มมาตรการให้ผู้ครอบครองเสือโคร่งแจ้งเจ้าหน้าที่กรณีมีเสือโคร่งที่อยู่ในความดูแลเกิด และ/หรือ ตาย พร้อมทั้งให้เจ้าหน้าที่ดำเนินการเก็บตัวอย่างเลือดหรือชิ้นเนื้อส่งศูนย์นิติวิทยาศาสตร์สัตว์ป่า กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช เพื่อตรวจพิสูจน์พันธุ์กรรมสำหรับจัดทำฐานข้อมูลพันธุ์กรรมเสือโคร่งในกรงเลี้ยง รวมถึงระบุตัว และ/หรือ หาความสัมพันธ์ทางสายเลือดของเสือโคร่งเหล่านั้นในกรณีที่มีข้อสงสัย ร่วมกับการจัดทำทะเบียนประวัติรายตัวของเสือโคร่งในกรงเลี้ยงของภาคเอกชนทั้งหมดทั่วประเทศ ด้วยวิธีการฝังไมโครชิพ การบันทึกภาพถ่ายลายเสือโคร่ง ซึ่งเป็นไปตามหนังสือกรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช ด่วนที่สุด ที่ ทส 0909.302/12617 ลงวันที่ 30 มิถุนายน 2559 เรื่อง การดำเนินการเกี่ยวกับสัตว์ป่าและซากสัตว์ป่าคุ้มครอง (เสือโคร่ง) ของผู้แจ้งการครอบครองตามมาตรา 61 และมาตรา 67 แห่งพระราชบัญญัติสงวนและคุ้มครองสัตว์ป่า พ.ศ. 2535 ถือเป็นมาตรการนำร่องสำหรับใช้ในการติดตามและควบคุมจำนวนประชากรเสือโคร่งในกรงเลี้ยงของผู้ครอบครองและสถานประกอบกิจการสวนสัตว์เอกชน ป้องกันมิให้ผู้ประกอบกิจการสวนสัตว์เอกชนและผู้ครอบครองเสือโคร่งใช้ช่องทางการขออนุญาตดังกล่าวโดยมีวัตถุประสงค์แอบแฝงในการลักลอบเพาะพันธุ์เสือโคร่งป้อนเข้าสู่ขบวนการลักลอบค้าสัตว์ป่า และหลังจากประกาศใช้พระราชบัญญัติสงวนและคุ้มครองสัตว์ป่า พ.ศ. 2562 จึงได้ออกระเบียบใช้ในการควบคุมกิจกรรมที่อาจเอื้อต่อการลักลอบค้าสัตว์ป่า

ซึ่งผู้ประกอบการที่กำหนดไว้ในระเบียบจะต้องปฏิบัติตาม “ระเบียบกรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช ว่าด้วยการแจ้งและการรับแจ้ง การออกใบอนุญาตหรือใบรับรอง การกำหนดอายุ ใบอนุญาตหรือใบรับรอง การต่ออายุใบอนุญาตหรือใบรับรอง การโอนใบอนุญาตหรือใบรับรอง การออกใบแทนใบอนุญาตหรือใบรับรองสำหรับการครอบครองสัตว์ป่าสงวน ซากสัตว์ป่าสงวน สัตว์ป่าคุ้มครองซากสัตว์ป่าคุ้มครอง ผลิตภัณฑ์จากซากสัตว์ป่าคุ้มครอง และการจำหน่าย จ่าย หรือโอนสัตว์ป่าสงวนและสัตว์ป่าคุ้มครอง พ.ศ. 2564” โดยที่ผ่านมารกรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช ได้มีการใช้ข้อมูลทางพันธุกรรมของเสือโคร่งเป็นพยานหลักฐานในการดำเนินคดีการลักลอบสวมทะเบียนเสือโคร่งในกรงเลี้ยงของไทยมาแล้ว เช่น กรณีตรวจยึดเสือโคร่งและพักใบอนุญาตสถานประกอบการสวนสัตว์ในจังหวัดมุกดาหาร (ไทยพีบีเอส, 2563) กรณีการตรวจสอบสายพันธุ์ลูกเสือโคร่งของกลางเพื่อสืบหาแหล่งที่มา (ไทยพีบีเอส, 2565)

การจัดทำฐานข้อมูลพันธุกรรมของสัตว์ป่าในกรงเลี้ยงจึงเป็นแนวทางสำหรับการเฝ้าระวังการลักลอบเพาะพันธุ์สัตว์ป่าในกรงเลี้ยงป้อนเข้าสู่ขบวนการลักลอบค้าสัตว์ป่าได้อย่างมีประสิทธิภาพ สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการสืบสวนสอบสวนหาแหล่งที่มาสัตว์ป่าของกลางที่อาจเชื่อมโยงมาจากขบวนการลักลอบเพาะพันธุ์ในกรงเลี้ยงได้ ทั้งนี้ศูนย์นิติวิทยาศาสตร์สัตว์ป่า กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช ได้จัดทำฐานข้อมูลพันธุกรรมรายตัวของเสือโคร่งในกรงเลี้ยงด้วยเทคนิคการวิเคราะห์เครื่องหมายพันธุกรรมประเภทเครื่องหมายสโนิปส์ (Single Nucleotide Polymorphisms; SNPs) ภายใต้โครงการต่อต้านการค้าสัตว์ป่า (Combating Illegal Wildlife Trade, focusing on Ivory, Rhino Horn, Tiger and Pangolins in Thailand; CIWT-GEF6) ซึ่งได้รับการสนับสนุนจากโครงการพัฒนาแห่งสหประชาชาติ (United Nations Development Programme; UNDP) กองทุนสิ่งแวดล้อมโลกครั้งที่ 6 (Global Environment Facility; GEF6) ในระหว่างปี 2562-2566 โดยมีองค์กร TRACE-Wildlife Forensic Network เป็นผู้พัฒนาเครื่องหมายสโนิปส์ของเสือโคร่ง แต่เนื่องจากเทคนิคการวิเคราะห์พันธุกรรมด้วยเครื่องหมายสโนิปส์เป็นเทคนิคที่ค่อนข้างใหม่ ต้องใช้เครื่องมือและเทคโนโลยีขั้นสูงในการวิเคราะห์ผล นอกจากนี้การพัฒนาเครื่องหมายสโนิปส์ในโครงการดังกล่าวยังอยู่ในระหว่างการพัฒนาทดสอบเครื่องหมายที่พัฒนาได้ ทำให้ปัจจุบันการระบุตัวและการตรวจพิสูจน์ความสัมพันธ์ทางสายเลือดของเสือโคร่งในทางคดียังคงใช้วิธีเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลท์ (Microsatellite markers) เป็นหลัก (ไทยพีบีเอส, 2564)

ในขณะที่ปัญหาการลักลอบค้าเสือดาวยังคงมีการตรวจยึดซากเสือดาว และลูกเสือดาวที่มีชีวิตขณะกำลังลักลอบส่งออกไปยังต่างประเทศอย่างต่อเนื่อง แต่ก็ยังไม่มีการพัฒนาหรือการศึกษาเครื่องหมายพันธุกรรมสำหรับจัดทำฐานข้อมูลพันธุกรรมเสือดาวในกรงเลี้ยงของไทยอย่างจริงจัง

นอกจากนี้กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช ยังไม่มีมาตรการที่เข้มงวดในการเฝ้าระวัง การลักลอบเพาะพันธุ์เสือดาวในกรงเลี้ยงป้อนเข้าสู่ขบวนการลักลอบค้าสัตว์ป่า ซึ่งการจัดทำทะเบียน ประวัติเสือดาวในกรงเลี้ยงของกรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืชในปัจจุบันเป็นเพียงการให้ ผู้ครอบครองเสือดาว และสถานประกอบกิจการสวนสัตว์เอกชนแจ้งจำนวนเสือดาวที่ครอบครอง โดยมีการฝังรหัสไมโครชิพเพื่อใช้ระบุตัวเท่านั้น ซึ่งไม่ได้มีการบันทึกภาพถ่ายลายเสือดาวจัดเก็บใน ทะเบียนประวัติ เนื่องจากลักษณะลวดลายที่เฉพาะของเสือดาวนั้นยากต่อการใช้ระบุตัว ประกอบกับ เสือดาวบางตัวมีสีพื้นของลำตัวเป็นสีเทาเข้มไปจนถึงสีดำกลืนไปกับลายดอกสีด้า (rosettes spots) ซึ่งเป็นลักษณะด้อยที่สามารถพบได้ทั่วไปหรือที่เรียกว่า เสือดำ ทำให้การใช้รูปแบบของลายในการระบุตัว เสือดาวจึงไม่สามารถทำได้ทุกกรณี ดังนั้นเพื่อเป็นการพัฒนาเครื่องมือตรวจพิสูจน์หลักฐานทาง นิติวิทยาศาสตร์ใช้ในการติดตามแหล่งที่มาเสือดาวของกลาง และเฝ้าระวังการลักลอบล่าและค้า เสือดาว ตลอดจนเพื่อให้กฎหมายที่ตราขึ้นโดยมีเจตนารมณ์ในการดูแลรักษาทรัพยากรธรรมชาติ สามารถบังคับใช้กับผู้กระทำความผิดได้อย่างมีประสิทธิภาพ เพื่อไม่ให้ประเทศไทยเป็นที่จับตา จากคณะกรรมการอนุสัญญาไซเตสอันเนื่องมาจากไม่มีมาตรการในการควบคุมและเฝ้าระวังการ ลักลอบค้าเสือดาวจนอาจนำไปสู่การถูกคว่ำบาตรทางการค้า ซึ่งจะก่อให้เกิดความเสียหายต่อเศรษฐกิจของ ประเทศไทย จึงจำเป็นต้องมีการศึกษาเครื่องหมายพันธุกรรมเสือดาวสำหรับใช้ในการระบุตัว และ หาความสัมพันธ์ทางสายเลือด ตลอดจนใช้ในการจัดทำฐานข้อมูลพันธุกรรมเสือดาวในกรงเลี้ยงของ ประเทศไทยสำหรับใช้ประโยชน์ในการสืบสวนสอบสวนแหล่งที่มาเสือดาวของกลางที่ตรวจยึดได้ เช่นเดียวกับการตรวจพิสูจน์หลักฐานในคดีการกระทำความผิดเกี่ยวกับเสือโคร่ง

1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย

1.2.1 เพื่อคัดเลือกเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ (STRs) ที่มีประสิทธิภาพสำหรับใช้ในการ ตรวจพิสูจน์ระบุตัวและหาความสัมพันธ์ทางสายเลือดระหว่างพ่อ กับ ลูก และ แม่ กับ ลูก (Parentage testing) ของเสือดาวในกรงเลี้ยงของประเทศไทยในงานนิติวิทยาศาสตร์

1.2.2 เพื่อจัดกลุ่มชุดเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์เสือดาวที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ผล ด้วยวิธีมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ (Multiplex PCR)

1.2.3 เพื่อศึกษาความใกล้ชิดทางพันธุกรรมระหว่างเสือดาวในกรงเลี้ยง เสือดาวในป่าของ ประเทศไทย และเสือดาวของกลางที่กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช ตรวจยึดได้ เชื่อมโยง หาแหล่งที่มาของการลักลอบค้าเสือดาวในประเทศไทย

1.3 สมมติฐานของการวิจัย

1.3.1 การคัดเลือกเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ของเลือดดาวที่มีประสิทธิภาพสำหรับใช้ในการระบุตัวและตรวจพิสูจน์ความสัมพันธ์ระหว่างพ่อ กับ ลูก และ แม่ กับ ลูก (Parentage testing) สามารถทำได้ด้วยวิธีการคัดเลือกเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ในกลุ่มสัตว์ที่มีสายวิวัฒนาการ (Evolution) ใกล้เคียงกับเลือดดาว (Cross-species amplification) และ/หรือ เครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ที่มีรายงานการทดสอบกับตัวอย่างเลือดดาวมาแล้ว

1.3.2 การวิเคราะห์เครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์เลือดดาวด้วยวิธีมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ (MultiPlex PCR) ทำให้สามารถวิเคราะห์เครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ได้ในคราวเดียวกันมากกว่า 5 เครื่องหมาย

1.3.3 ข้อมูลดีเอ็นเอ (DNA profiling) ของเลือดดาวที่ได้จากวิธีการวิเคราะห์เครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ ทำให้ทราบถึงความใกล้ชิดทางพันธุกรรมระหว่างเลือดดาวของกลางที่ตรวจยึดมาได้จากสถานประกอบการกิจการสวนสัตว์เอกชนในประเทศไทย และ/หรือ เลือดดาวในป่าของประเทศไทย นำไปสู่การเชื่อมโยงแหล่งที่มาของเลือดดาวในกรณีเลี้ยง และเลือดดาวของกลางที่ตรวจยึดได้ในประเทศไทย

1.4 ขอบเขตการวิจัย

ตัวอย่างเลือดดาวที่ใช้ในการศึกษานี้เป็นตัวอย่างเลือดดาวในกรณีเลี้ยงของประเทศไทย และตัวอย่างเลือดดาวของกลางที่ศูนย์นิติวิทยาศาสตร์สัตว์ป่า กรมอุทยานแห่งชาติสัตว์ป่า และพันธุ์พืช ได้เก็บรวบรวมไว้ทั้งหมด 111 ตัวอย่าง และตัวอย่างเลือดดาวในป่าของประเทศไทยจากกลุ่มงานวิจัย สัตว์ป่า กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช 24 ตัวอย่าง ซึ่งตัวอย่างทั้งหมดได้ถูกเก็บรวบรวมสะสมไว้ตั้งแต่ปี 2555 จนถึงปี 2565 ประกอบด้วยตัวอย่างเลือด ชินเนื้อ ขน และมูล

ในส่วนของการค้นหาเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ที่เหมาะสมกับเลือดดาว จะใช้วิธีการคัดเลือกเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์จากสัตว์ที่มีสายวิวัฒนาการ (Evolution) ใกล้เคียงกับเลือดดาว (Cross-species amplification) และ/หรือ เครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ที่มีรายงานการทดสอบกับตัวอย่างเลือดดาวมาแล้ว ร่วมกับเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ที่ใช้กับเสือโคร่งของกรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช ที่มีอยู่แล้ว โดยเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ที่นำมาคัดเลือกในเบื้องต้นทั้งหมดเป็นเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ชนิด tetranucleotide repeats และ pentanucleotide repeats รวมจำนวนไม่น้อยกว่า 25 เครื่องหมาย โดยคัดเลือกเครื่องหมายให้ได้จำนวนน้อยที่สุดไม่ต่ำกว่า 12 เครื่องหมาย อ้างอิงจากแนวทางการรับรองวิธีการตรวจพิสูจน์ความสัมพันธ์ทางสายเลือดวัว (Parentage Testing in Cattle) ของคณะกรรมการระหว่างประเทศเพื่อการบันทึกสัตว์ (The International Committee for Animal Recording; ICAR) ซึ่งเป็นหน่วยงานที่ออกใบรับรองให้กับห้องปฏิบัติการที่บริการตรวจพิสูจน์ความสัมพันธ์ระหว่างพ่อแม่ลูกของสัตว์ ตามมาตรฐานของสมาคมพันธุศาสตร์สัตว์ระหว่างประเทศ (International Society for

Animal Genetics; ISAG) (ICAR, 2021) นอกจากนี้การคัดเลือกเครื่องหมายดังกล่าวยังสอดคล้องกับคำแนะนำ (Stand Guideline) ของสมาคมนิติวิทยาศาสตร์สัตว์ป่าสากล (Society for Wildlife Forensic Science; SWFS) อีกด้วย ทั้งนี้เพื่อให้ได้เครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ที่มีประสิทธิภาพเพียงพอสำหรับการระบุตัวและตรวจพิสูจน์ความสัมพันธ์ระหว่างพ่อ กับ ลูก และ แม่ กับ ลูก (Parentage testing) ของเสือดาวในกรงเลี้ยงของประเทศไทย สำหรับการออกแบบการวิเคราะห์เครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ด้วยวิธีมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ (Multiplex PCR) จะใช้ระบบสีฟลูออเรสเซนซ์ 5 ชนิด (5 dye-labels) ได้แก่ 6-FAM™, VIC®, NED™, PET®, และ LIZ® ในการจัดกลุ่มเครื่องหมายที่เหมาะสมเพื่อประหยัดเวลา และค่าใช้จ่ายในการใช้วิเคราะห์ผลมากที่สุด ตลอดจนนำตัวอย่างสารพันธุกรรมของเสือดาวทั้งหมดที่ได้จากการวิเคราะห์เครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์มาใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพของเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ด้วยค่าทางสถิติเฉพาะในงานด้านนิติวิทยาศาสตร์

1.5 นิยามศัพท์

1.5.1 การตรวจความสัมพันธ์ทางสายเลือด (Parentage testing) หมายถึง การตรวจพิสูจน์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่าง พ่อ กับ ลูก และ/หรือ แม่ กับ ลูก ด้วยวิธีเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์

1.5.2 การทดสอบประสิทธิภาพของเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ หมายถึง การทดสอบโอกาสที่จะสามารถใช้ชุดเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ที่คัดเลือกมาได้ในกระบวนการระบุตัวและหาความสัมพันธ์ทางสายเลือดของเสือดาว โดยประเมินได้จากโอกาสการไม่คัดออกที่ไม่ใช่ตัวเดียวกัน และโอกาสการไม่คัดออกที่ไม่ใช่พ่อหรือแม่ ซึ่งหากค่าดังกล่าวเข้าใกล้ 0 แสดงได้ว่าชุดเครื่องหมายที่ได้มีประสิทธิภาพสูงในการใช้ระบุตัว และตรวจความสัมพันธ์ทางสายเลือดระหว่าง พ่อ กับ ลูก และ/หรือ แม่ กับ ลูก ตามลำดับ

1.5.3 การผสมแบบเลือดชิด (inbreeding) หมายถึง การจับคู่ผสมพันธุ์กันภายในหมู่เครือญาติ

1.5.4 การระบุตัว (individual identification) หมายถึง การใช้ข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์เครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์มาเปรียบเทียบเพื่อยืนยันว่าเป็นเสือดาวตัวเดียวกันหรือไม่

1.5.5 การทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ส (Chain Polymerase Reaction; PCR) หมายถึง การใช้เครื่องหมายพันธุกรรมเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของดีเอ็นเอเป้าหมายสายสั้น ๆ

1.5.6 เครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ (microsatellites หรือ Short Tandem Repeats; STRs) หมายถึง เครื่องหมายพันธุกรรมที่แปลผลแอลลีลจากความยาวของดีเอ็นเอสายสั้น ๆ ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ส ซึ่งความยาวของสายดีเอ็นเอดังกล่าวจะขึ้นกับจำนวนชุดซ้ำของนิวคลีโอไทด์

1.5.7 โอกาสการไม่คัดออกที่ไม่ใช่ตัวเดียวกัน แสดงถึงประสิทธิภาพของเครื่องหมายไมโครแซตเทลโลด์สำหรับการตรวจสอบพิสูจน์เพื่อระบุตัว โดยค่ายิ่งต่ำจะแสดงให้เห็นถึงความสามารถในการแยกแยะตัวที่ต่างกันได้ง่าย แบ่งเป็น 2 กรณี ดังนี้

(1) โอกาสการไม่คัดออกที่ไม่ใช่ตัวเดียวกัน กรณีที่เลือดดาวไม่มีความสัมพันธ์แบบพี่น้อง (non-exclusion probability (identity); NE-I) หมายถึง ความน่าจะเป็นที่เครื่องหมายไมโครแซตเทลโลด์จะไม่สามารถแยกแยะเลือดดาวแต่ละตัวได้ แสดงถึงประสิทธิภาพของเครื่องหมายไมโครแซตเทลโลด์สำหรับการใช้ระบุตัว ถ้าค่ายิ่งต่ำ หรือเข้าใกล้ 0 แสดงว่าสามารถแยกแยะระหว่างตัวได้ง่าย

(2) โอกาสการไม่คัดออกที่ไม่ใช่ตัวเดียวกัน กรณีที่เลือดดาวที่มีความสัมพันธ์แบบพี่น้อง (non-exclusion probability (sib identity); NE-SI) หมายถึง ความน่าจะเป็นที่เครื่องหมายไมโครแซตเทลโลด์จะไม่สามารถแยกแยะเลือดดาวที่เป็นพี่กับน้องได้ เนื่องจากมีพันธุกรรมที่ใกล้เคียงกัน ใช้ในกรณีที่ต้องการตรวจสอบระหว่างพี่กับน้อง

1.5.8 โอกาสการไม่คัดออกที่ไม่ใช่พ่อหรือแม่ แสดงถึงประสิทธิภาพของเครื่องหมายไมโครแซตเทลโลด์สำหรับการตรวจสอบพิสูจน์ความสัมพันธ์ทางสายเลือด โดยค่ายิ่งต่ำจะแสดงให้เห็นถึงความสามารถในการแยกแยะพ่อ แม่ ที่แท้จริงได้ง่าย แบ่งเป็น 3 กรณี ดังนี้

(1) โอกาสการไม่คัดออกที่ไม่ใช่พ่อหรือแม่ กรณีที่ไม่ทราบข้อมูลของพ่อหรือแม่ที่แท้จริง (non-exclusion probability in case First Parent; NE-1P) หมายถึง ความน่าจะเป็นที่เลือดดาวที่สุ่มมาจากประชากรที่ไม่ใช่พ่อหรือแม่ของลูกที่แท้จริงจะไม่ถูกคัดออก ใช้ในกรณีที่การตรวจสอบความสัมพันธ์ทางสายเลือดไม่ทราบข้อมูลของพ่อและแม่ที่แท้จริง ตัวอย่างเช่น มีเลือดดาว 2 ตัว และต้องการตรวจสอบพิสูจน์เป็นแม่ลูกกันหรือไม่

(2) โอกาสการไม่คัดออกที่ไม่ใช่พ่อหรือแม่ กรณีที่ทราบพ่อหรือแม่ตัวใดตัวหนึ่งแล้ว (non-exclusion probability in case Second Parent; NE-2P) หมายถึง ความน่าจะเป็นที่เลือดดาวที่สุ่มมาจากประชากรที่ไม่ใช่พ่อหรือแม่ของลูกที่แท้จริงจะไม่ถูกคัดออก ใช้ในกรณีที่ทราบพ่อหรือแม่ตัวใดตัวหนึ่งแล้ว ตัวอย่างเช่น มีเลือดดาวแม่ลูก และต้องการตรวจสอบพิสูจน์ว่า เลือดดาวเพศผู้เป็นพ่อของลูกจริงหรือไม่

(3) โอกาสการไม่คัดออกที่ไม่ใช่พ่อหรือแม่ กรณีที่ทราบทั้งพ่อและแม่ (non-exclusion probability in case Pair Parent; NE-PP) หมายถึง ความน่าจะเป็นที่เลือดดาวที่สุ่มมาจากประชากรที่ไม่ใช่พ่อหรือแม่ของลูกที่แท้จริงจะไม่ถูกคัดออก ใช้ในกรณีที่ทราบคู่พ่อกับแม่แล้ว ตัวอย่างเช่น ต้องการตรวจสอบพิสูจน์ว่า ลูกเลือดดาวเป็นลูกของพ่อกับแม่จริงหรือไม่

1.5.9 ความไม่สมดุลของลิงเกจ (Linkage Disequilibrium; LD) หมายถึง การตรวจสอบความเชื่อมโยงกันของแอลลีลระหว่างเครื่องหมายพันธุกรรม

1.6 ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

ได้เครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการใช้ระบุตัวและตรวจพิสูจน์ความสัมพันธ์ทางสายเลือด (Parentage testing) ของเสือดาวในกรงเลี้ยงของประเทศไทย เหมาะสำหรับการใช้ในการตรวจพิสูจน์ทางนิติวิทยาศาสตร์ โดยเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ที่ผ่านการคัดเลือกได้นั้นมีขั้นตอนการตรวจพิสูจน์ที่ง่าย ประหยัดเวลา ค่าใช้จ่ายในการตรวจพิสูจน์ และมีความแม่นยำในการตรวจพิสูจน์ตามคำแนะนำการทดสอบเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์สำหรับใช้ในงานนิติวิทยาศาสตร์ (STR analysis for forensic validation) ของสมาคมนิติวิทยาศาสตร์สัตว์ป่าสากล (Society for Wildlife Forensic Science; SWFS) และสมาคมพันธุศาสตร์สัตว์ระหว่างประเทศ (International Society for Animal Genetics; ISAG) สามารถใช้ประโยชน์ในการสืบสวนสอบสวน เชื่อมโยงแหล่งที่มาของเสือดาวของกลางที่ตรวจยึดมาได้กับสถานประกอบการสวนสัตว์หรือผู้ครอบครองและเพาะพันธุ์เสือดาวที่ต้องสงสัยที่ได้รับอนุญาตจากกรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช อีกทั้งยังสามารถใช้เครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ในการระบุตัวของเสือดาวตรวจสอบคู่ขนานไปกับวิธีการระบุตัวแบบเดิม นั่นคือ การฝังไมโครชิพ ที่อาจสูญหายหรือถูกสับเปลี่ยนในกรณีที่มีการลักลอบสวมทะเบียนสัตว์ ซึ่งเป็นแนวทางในการปราบปรามและป้องกันไม่ให้เกิดการลักลอบเพาะพันธุ์เสือดาวในกรงเลี้ยงของประเทศไทย บ่อนเข้าสู่ขบวนการค้าสัตว์ป่าที่ผิดกฎหมาย โดยอาศัยช่องทางการขอใบอนุญาตครอบครองและเพาะพันธุ์ที่ออกให้โดยหน่วยงานรัฐเป็นเครื่องมือประกอบการกระทำความผิด

ข้อมูลพันธุกรรมที่ได้จากการค้นหาเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ของเสือดาวในงานวิจัยนี้ นอกจากจะใช้เป็นฐานข้อมูลพันธุกรรมของเสือดาวในกรงเลี้ยงของประเทศไทย ของกรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช สำหรับใช้เป็นพยานหลักฐานในทางนิติวิทยาศาสตร์เพื่อประโยชน์ในการสืบสวนสอบสวนแล้ว ยังสามารถนำข้อมูลเครื่องหมายพันธุกรรมที่ได้มาใช้ประโยชน์ในการจัดการในกรงเลี้ยง โดยการวางแผนจับคู่พ่อแม่พันธุ์ให้เกิดความหลากหลายทางพันธุกรรม เป็นการลดโอกาสการจับคู่ผสมแบบเลือดชิด ซึ่งลดโอกาสการแสดงออกของลักษณะด้อยในรุ่นลูก เป็นการอนุรักษ์พันธุกรรมของเสือดาวในกรงเลี้ยง (*In Situ Conservation of Genetic Resources*) อีกทั้งยังมีประโยชน์ในการประเมินและทำนายจำนวนประชากรเสือดาวในธรรมชาติในอนาคตได้อีกด้วย

บทที่ 2

เอกสาร และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 อนุกรมวิธานและเขตการกระจายพันธุ์ของเสือดาวในธรรมชาติ

2.1.1 การจัดจำแนกทางอนุกรมวิธาน (Taxonomy classification) และสถานภาพของเสือดาว

ชื่อวิทยาศาสตร์เสือดาว: *Panthera pardus* (Linnaeus, 1758) Leopard

Kingdom: Animalia

Phylum: Chordata

Class: Mammalia

Order: Carnivora

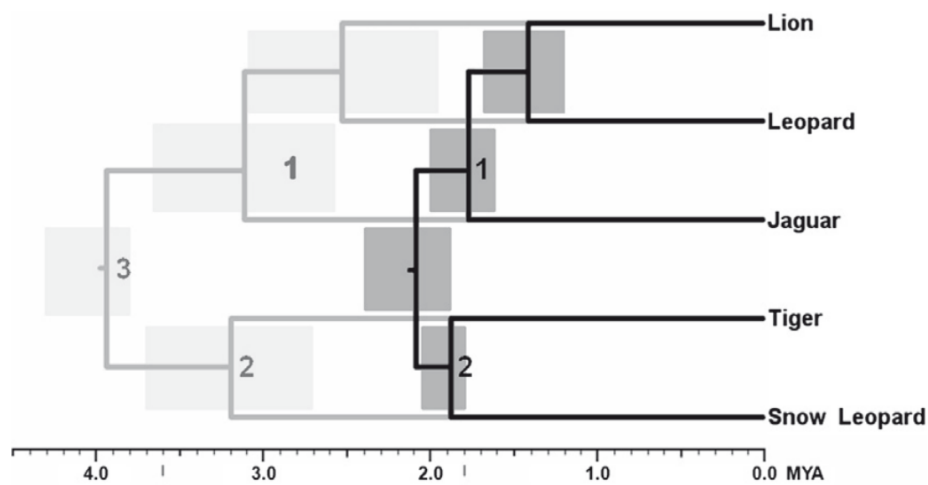
Family: Felidae

Genus: *Panthera*

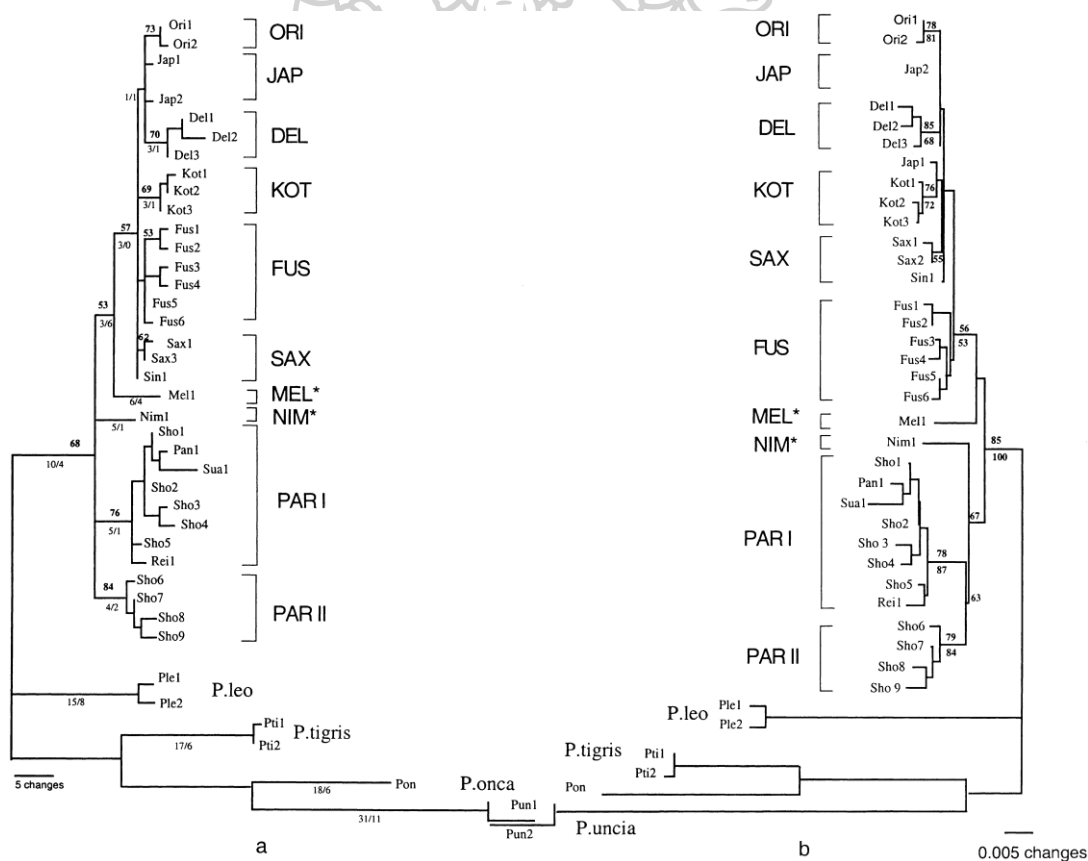
(Stein & Hayssen, 2013)

Species: *pardus*

เสือดาว หรือ เสือด่า (*Panthera pardus*) เป็นสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Class: Mammalia) อันดับสัตว์กินเนื้อ (Order: Carnivora) วงศ์แมว (Family: Felidae) จัดเป็นกลุ่มแมวขนาดใหญ่ (big cat) ในสกุลแพนเทอร่า (*Panthera*) ซึ่งมีสมาชิกในสกุลทั้งหมด 5 ชนิด (species) ได้แก่ สิงโต (Lion; *Panthera leo*) เสือดาว (Leopard; *Panthera pardus*) เสือดาวหิมะ (Snow Leopard; *Panthera uncia*) เสือโคร่ง (Tiger; *Panthera tigris*) และเสือจากัวร์ (Jaguar; *Panthera onca*) การศึกษาความใกล้ชิดทางสายวิวัฒนาการ (evolution) จากต้นไม้สายวิวัฒนาการที่ได้จากข้อมูลพันธุกรรม (phylogenetic tree) ของสมาชิกในสกุลแพนเทอร่าทั้งหมดพบว่า เสือดาวมีพันธุกรรมใกล้ชิดกับสิงโตมากที่สุด โดยมีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับเสือจากัวร์มากกว่าเสือโคร่ง และเสือดาวหิมะ (ภาพที่ 2) (Davis et al., 2010) นอกจากนี้ยังสามารถจัดจำแนกชนิดย่อยของเสือดาวโดยใช้ข้อมูลพันธุกรรมจากไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ (Mitochondrial DNA) ในส่วนของยีน *NADH-2* และส่วนของ Control Region ได้ทั้งหมด 9 ชนิดย่อย (subspecies) ได้แก่ เสือดาวอามูร์ (ORI; Amur leopard; *P. p. orientalis*) เสือดาวอาระเบีย (NIM; Arabian leopard; *P. p. nimr*) เสือดาวชวา (MEL; Javan leopard; *P. p. melas*) เสือดาวอินโดจีน (DEL; Indochinese leopard; *P. p. delacouri*) เสือดาวจีนเหนือ (JAP; Northern Chinese Leopard; *P. p. japonensis*) เสือดาวเปอร์เซีย (SAX; Persian leopard; *P. p. saxicolor*) เสือดาวศรีลังกา (KOT; Sri-Lankan leopard; *P. p. kotiya*) เสือดาวแอฟริกา (PAR I และ PAR II; African leopard; *P. p. pardus*) และเสือดาวอินเดีย (Indian leopard; *P. p. fusca*) (ภาพที่ 3) (Uphyrkina et al., 2001)

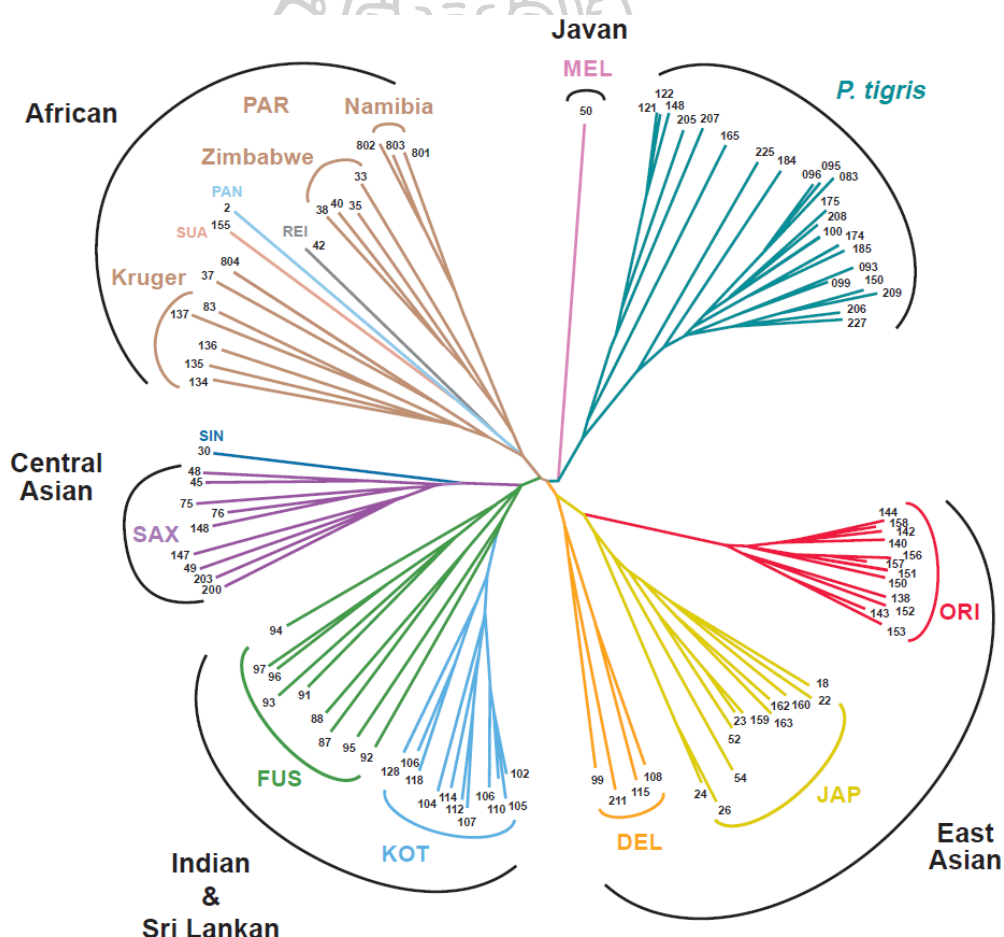


ภาพที่ 2 แสดงต้นไม้สายวิวัฒนาการด้วยวิธีเบย์เซียน (Bayesian phylogenetic tree) ของสมาชิกทั้งหมดในสกุลแพนเทอร่า 5 ชนิด ได้แก่ สิงโต เสือดำ เสือจากัวร์ เสือโคร่ง และเสือดาวหิมะ แหล่งที่มา: (Davis et al., 2010)



ภาพที่ 3 แสดงต้นไม้สายวิวัฒนาการของชนิดย่อยเสือดาวจากข้อมูลไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ ด้วยวิธี Maximum parsimony (ซ้าย) และวิธี Minimum evolution (ขวา) แหล่งที่มา: (Uphyrkina et al., 2001)

จากการจัดกลุ่มประชากรเสือดาวโดยใช้ความใกล้ชิดทางพันธุกรรมด้วยวิธีการเปรียบเทียบระยะห่างทางพันธุกรรม (Genetic distance) จากข้อมูลเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ (Microsatellites) จำนวน 25 เครื่องหมาย สามารถแบ่งกลุ่มประชากรเสือดาวตามเขตพื้นที่การกระจายพันธุ์ได้ 5 ประชากร ได้แก่ 1) กลุ่มประชากรที่แพร่กระจายพันธุ์บนเกาะชวาประกอบด้วย 1 ชนิดย่อย คือ เสือดาวชวา 2) กลุ่มประชากรที่แพร่กระจายพันธุ์ในทวีปแอฟริกา ประกอบด้วย 1 ชนิดย่อย คือ เสือดาวแอฟริกา 3) กลุ่มประชากรที่แพร่กระจายพันธุ์ในแถบภูมิภาคเอเชียกลาง ประกอบด้วย 1 ชนิดย่อย คือ เสือดาวเปอร์เซีย 4) กลุ่มประชากรที่แพร่กระจายพันธุ์ในอนุทวีปอินเดียและเกาะศรีลังกา ประกอบด้วย 2 ชนิดย่อย คือ เสือดาวอินเดีย และเสือดาวศรีลังกา 5) กลุ่มประชากรที่แพร่กระจายพันธุ์ในแถบเอเชียตะวันออก ประกอบด้วย 3 ชนิดย่อย คือ เสือดาวอินโดจีน เสือดาวามูร์ และเสือดาวจีนเหนือ (ภาพที่ 4) (Uphyrkina et al., 2001)



ภาพที่ 4 แสดงต้นไม้สายวิวัฒนาการของชนิดเสือดาวจากข้อมูลเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ด้วยวิธีการจัดกลุ่มระยะห่างทางพันธุกรรม (Genetic distance)

แหล่งที่มา: (Uphyrkina et al., 2001)

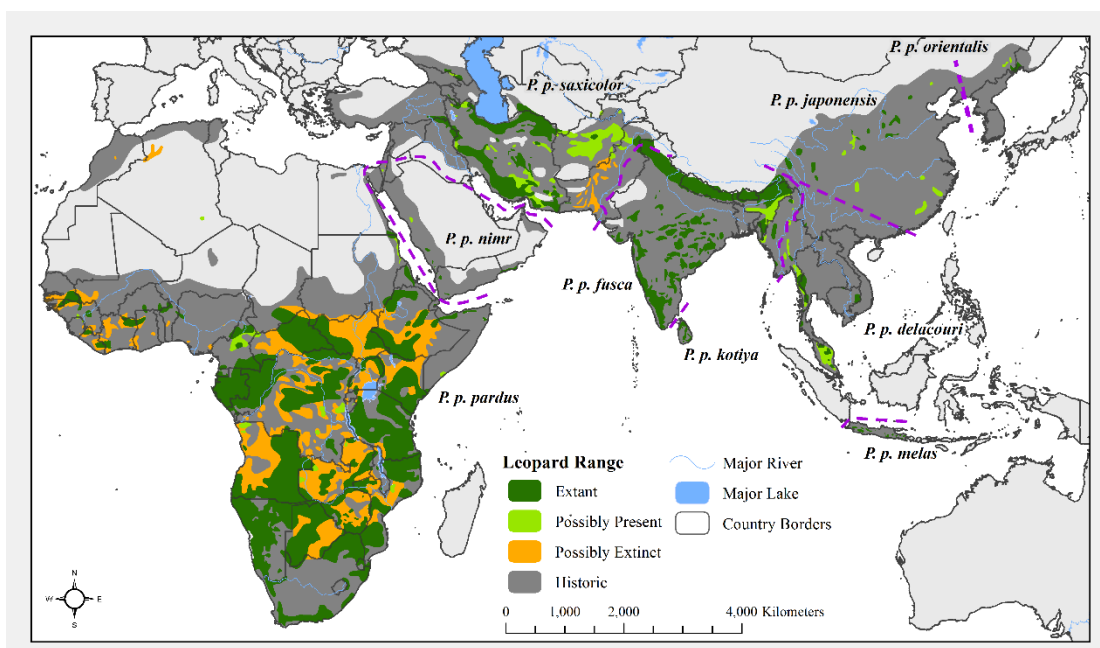
เมื่อปี พ.ศ. 2554 องค์การระหว่างประเทศเพื่อการอนุรักษ์ธรรมชาติ (IUCN) ได้จัดให้เสือดาว (*Panthera pardus*) อยู่ในสถานภาพสัตว์ป่าใกล้สูญคุกคาม (NT-Near Threatened) (Oswell, 2010) ปัจจุบันองค์การระหว่างประเทศเพื่อการอนุรักษ์ธรรมชาติได้รวบรวมข้อมูลการศึกษาจำนวนประชากรเสือดาว และพบว่ามีการลดลงอย่างมาก จึงได้จัดให้เสือดาวอยู่ในสถานภาพสัตว์ป่าที่มีแนวโน้มใกล้สูญพันธุ์ (VU-Vulnerable) แต่เนื่องจากการศึกษาประชากรของเสือดาวแต่ละชนิดย่อย และจากข้อมูลการศึกษาพบว่า เสือดาวบางชนิดย่อยมีจำนวนประชากรอยู่ในขั้นวิกฤตจนเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ เช่น เสือดาวอามูร์มีรายงานว่ามีประชากรตัวเต็มวัยที่เหลืออยู่ในปัจจุบัน <60 ตัวเท่านั้น ในขณะที่เสือดาวอินเดียยังมีประชากรในธรรมชาติ >15,000 ตัว ดังนั้นองค์การระหว่างประเทศเพื่อการอนุรักษ์ธรรมชาติจึงได้จัดสถานภาพเสือดาวชนิดย่อยด้วย โดยเสือดาว 4 ชนิดย่อย (subspecies) ที่จัดอยู่ในกลุ่มสัตว์ที่มีความเสี่ยงขั้นวิกฤตต่อการสูญพันธุ์ (CR-Critically endangered) ได้แก่ เสือดาวอามูร์ เสือดาวอาระเบีย เสือดาวอินโดจีน และเสือดาวจีนเหนือ ขณะที่เสือดาว 3 ชนิดย่อยจัดอยู่ในกลุ่มสัตว์ที่ใกล้สูญพันธุ์ (EN-Endangered) ได้แก่ เสือดาวชวา เสือดาวเปอร์เซีย และเสือดาวศรีลังกา ส่วนเสือดาวอีก 2 ชนิดย่อยสุดท้ายจัดอยู่ในกลุ่มสัตว์ใกล้สูญคุกคาม (NT-Near threatened) ได้แก่ เสือดาวแอฟริกา และเสือดาวอินเดีย (Castelló, 2020; Rostro-García et al., 2019; Stein et al., 2023) แม้ว่าจะสามารถจำแนกชนิดย่อยเสือดาวได้ อย่างไรก็ตามการจำแนกชนิดย่อยของเสือดาวจากลักษณะสัณฐานภายนอกที่มีความคล้ายคลึงกันมาก ไม่ว่าจะเป็นสีขน ขนาดตัว ความหนาของขน บ่อยครั้งทำให้เกิดความสับสน และการจำแนกชนิดย่อยของเสือดาวต้องอาศัยข้อมูลทางพันธุกรรมร่วมด้วย ดังนั้นในการควบคุมการค้าเสือดาวระหว่างประเทศตามอนุสัญญาไซเตสจึงจัดให้เสือดาวทุกชนิดย่อยอยู่ในบัญชีแนบท้ายหมายเลข 1 ของอนุสัญญาไซเตส ห้ามส่งออกเพื่อการค้าโดยเด็ดขาด

2.1.2 พื้นที่การกระจายพันธุ์ของเสือดาวทั่วโลก (Distribution range)

เสือดาวมีการกระจายพันธุ์ตั้งแต่ทวีปแอฟริกา ตะวันออกกลาง ไปจนถึงภูมิภาคเอเชีย ซึ่งเสือดาวแต่ละชนิดมีพื้นที่การกระจายพันธุ์ในธรรมชาติแยกจากกัน เนื่องจากมีแนวเขตธรรมชาติแบ่งกั้นพื้นที่การกระจายพันธุ์ของเสือดาวแต่ละชนิด (biological barriers) ตามแนวเส้นประสีม่วง ได้แก่ แม่น้ำ ภูเขา ทะเล เกาะ เป็นต้น รายงานการศึกษาพื้นที่การกระจายพันธุ์ในธรรมชาติของเสือดาวทั่วโลกโดยใช้การรวบรวมข้อมูล 15 ปีย้อนหลัง ตั้งแต่ปี 2543-2558 พบว่า พื้นที่ที่มีการกระจายพันธุ์ของเสือดาวเหลืออยู่มีเพียง 25-37% (พื้นที่สีเขียวเข้ม) ของพื้นที่ที่เคยเป็นพื้นที่กระจายพันธุ์ทั้งหมดหลังปี 2293 (พื้นที่สีเทาเข้ม) (ภาพที่ 5) (Jacobson et al., 2016) ดังนั้นจำนวนประชากรเสือดาวที่ลดลงอย่างต่อเนื่อง จึงมีแนวโน้มให้เสือดาวอาจจะสูญพันธุ์ได้ในไม่ช้า

ปัจจุบันยังไม่ทราบจำนวนประชากรของเสือดาวที่อาศัยในธรรมชาติทั่วโลกที่แน่นอน กระนั้น มีรายงานการประเมินจำนวนตัวเสือดาวชนิดย่อย ได้แก่ เสือดาวอามูร์ คาดว่ามีจำนวนประชากร

เหลืออยู่เพียงไม่เกิน 60 ตัวเท่านั้น เสือดาวอาระเบีย 84 ตัว เสือดาวขาว 319 ตัว เสือดาวศรีลังกา 776-777 ตัว เสือดาวเปอร์เซีย 450-626 ตัว เสือดาวอินเดียมากกว่า 15,000 ตัว (Stein et al., 2023) เสือดาวอินโดจีน 950-2,500 ตัว เสือดาวอาระเบีย 80-290 ตัว (Castelló, 2020) เสือดาวแอฟริกาประมาณ 700,000 ตัว (Scott, 2013) เสือดาวจีนเหนือ 174-348 ตัว (Laguardia et al., 2017)



ภาพที่ 5 แสดงแผนที่พื้นที่กระจายพันธุ์ของเสือดาวทั่วโลกโดยรวบรวมข้อมูลตั้งแต่ปี 2543-2558 สีเขียวเข้ม (Extant) หมายถึง พื้นที่การกระจายพันธุ์ของเสือดาวที่ยังมีเสือดาวหลงเหลืออยู่ สีเขียวอ่อน (Possibly Present) หมายถึง พื้นที่การกระจายพันธุ์ของเสือดาวที่น่าจะมีเสือดาวหลงเหลืออยู่ สีส้ม (Possibly Extinct) หมายถึง พื้นที่การกระจายพันธุ์ของเสือดาวที่น่าจะไม่พบเสือดาวแล้ว (สูญพันธุ์ไปจากพื้นที่)

สีเทาเข้ม (Historic) หมายถึง พื้นที่ที่เคยมีการกระจายพันธุ์ของเสือดาวในปี 2293

แหล่งที่มา: (Jacobson et al., 2016)

ประเทศไทยเป็นพื้นที่กระจายพันธุ์ของเสือดาวอินโดจีน ซึ่งแต่เดิมเสือดาวอินโดจีนมีการกระจายพันธุ์ครอบคลุมภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ทั้งหมด 8 ประเทศ ได้แก่ จีน พม่า ไทย ลาว เวียดนาม กัมพูชา มาเลเซีย และสิงคโปร์ แต่ในปัจจุบันไม่มีรายงานการพบเสือดาวในประเทศลาว เวียดนาม และสิงคโปร์ ซึ่งเป็นไปได้ว่าเสือดาวที่เคยมีการกระจายพันธุ์อยู่ในประเทศเหล่านี้อาจสูญพันธุ์ไปจากพื้นที่แล้ว (Rostro-García et al., 2019) (ภาพที่ 6)



Range

- Extant (resident)
- Extinct
- Possibly Extant (resident)
- Possibly Extinct

Compiled by:

Rostro-García et al.



ภาพที่ 6 แสดงแผนที่การกระจายพันธุ์ของเสือดาวอินโดจีนของ IUCN

สีเหลือง (*Extant; resident*) หมายถึง พื้นที่ที่ยังมีการกระจายพันธุ์ของเสือดาวอินโดจีน

สีแดง (*Extinct*) หมายถึง พื้นที่ที่เคยเป็นที่กระจายพันธุ์ของเสือดาวอินโดจีน แต่ปัจจุบันไม่พบเสือดาวอินโดจีนในพื้นที่นี้แล้ว (สูญพันธุ์ไปจากพื้นที่แล้ว)

สีม่วง (*Possibly Extant; resident*) หมายถึง พื้นที่ที่น่าจะยังมีการกระจายพันธุ์ของเสือดาวอินโดจีนอยู่

สีส้ม (*Possibly Extinct*) หมายถึง พื้นที่ที่เคยเป็นที่กระจายพันธุ์ของเสือดาวอินโดจีน แต่ปัจจุบันน่าจะไม่มีพบเสือดาวอินโดจีนในพื้นที่นี้แล้ว (น่าจะสูญพันธุ์ไปจากพื้นที่แล้ว)

แหล่งที่มา: (Rostro-García et al., 2019)

จากการศึกษาพื้นที่อยู่อาศัย (Habitat) และพฤติกรรมของเสือดาวในประเทศไทย หนึ่งในคณะวิจัยอ้างว่า ในช่วงปี 2528-2529 เคยเก็บตัวอย่างมูลเสือดาวได้จากเส้นทางเดินกิโลเมตรที่ 8 บนดอยม่อนจอง (เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าอมก๋อย) ซึ่งหลังจากนั้นได้มีการสำรวจโดยวางกล้องดักถ่ายภาพ (Camera trap) ในพื้นที่ดังกล่าวอย่างเข้มข้น แต่ก็ไม่พบเสือดาวในพื้นที่ดังกล่าวอีกเลย ซึ่งเป็นไปได้ว่า เสือดาวอาจสูญพันธุ์ไปจากพื้นที่นั้นแล้ว (Lovari & Mori, 2017) ในช่วงปลายปี 2533 จนถึงต้นปี 2543 มีการรายงานการพบเสือดาวในพื้นที่กลุ่มป่าภูเขียว-น้ำหนาว (Borries & Koenig, 2014) และกลุ่มป่าดงพญาเย็น-เขาใหญ่ (อุทยานแห่งชาติตาพระยา) (Lynam et al., 2006; Ngoprasert et al., 2012) และระหว่างปี 2540-2553 ประเทศไทยเคยมีรายงานการกระจายพันธุ์ของเสือดาวในธรรมชาติในกลุ่มป่าฮาลา-บาลา (เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าฮาลา-บาลา) เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าทุ่งใหญ่นเรศวร รวมถึงกลุ่มป่าคลองแสง-เขาสก (Ngoprasert et al., 2012) ในระหว่างปี 2539-2541 มีข้อมูลการศึกษาประเมินความหนาแน่นของประชากรเสือดาวในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง พบว่า ประชากรเสือดาวมีแนวโน้มลดลงในแต่ละปีโดยมีความหนาแน่นในปี 2539 ปี 2540 และปี 2541 เท่ากับ 7.88, 5.21 และ 4.86 ตัว/100 km² ตามลำดับ โดยเสือดาวขนาดโตเต็มวัยเพศเมียจำนวน 6 ตัว จะใช้ขนาดพื้นที่หากินประมาณ 26±8.2 ตารางกิโลเมตร และเสือดาวขนาดโตเต็มวัยเพศผู้จำนวน 2 ตัว จะใช้ขนาดพื้นที่หากินมากถึง 45.7±14.8 ตารางกิโลเมตร (Raza et al., 2012; Simcharoen & Duangchantrasiri, 2008) โดยมีการประเมินจำนวนประชากรเสือดาวในธรรมชาติที่เหลือนอยู่ในประเทศไทยทั้งหมด 416–832 ตัว (Rostro-Garcia et al., 2016) ปัจจุบันพบการกระจายพันธุ์ของเสือดาวในธรรมชาติของประเทศไทยในพื้นที่หลักเพียง 2 กลุ่มป่า จากกลุ่มป่าที่มีในประเทศไทยทั้งหมด 19 กลุ่มป่า คือ กลุ่มป่าตะวันตก (Western Forest Complex; WEFCON) ได้แก่ เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าทุ่งใหญ่นเรศวร และกลุ่มป่าแก่งกระจาน-กุยบุรี (Kaeng Krachan-Kuiburi Complex; KKC) ได้แก่ อุทยานแห่งชาติแก่งกระจาน ซึ่งทั้งสองกลุ่มป่าของประเทศไทยนี้เชื่อมต่อกับกลุ่มป่าใต้ (Southern Forest Complex) และกลุ่มป่าที่เชื่อมต่อกับเทือกเขาตะนาวศรี (Northern Tenasserim Forest Complex) ของประเทศพม่า (ภาพที่ 6) (Rostro-Garcia et al., 2019)

2.2 ประชากรเสือดาวในกรงเลี้ยงของประเทศไทย

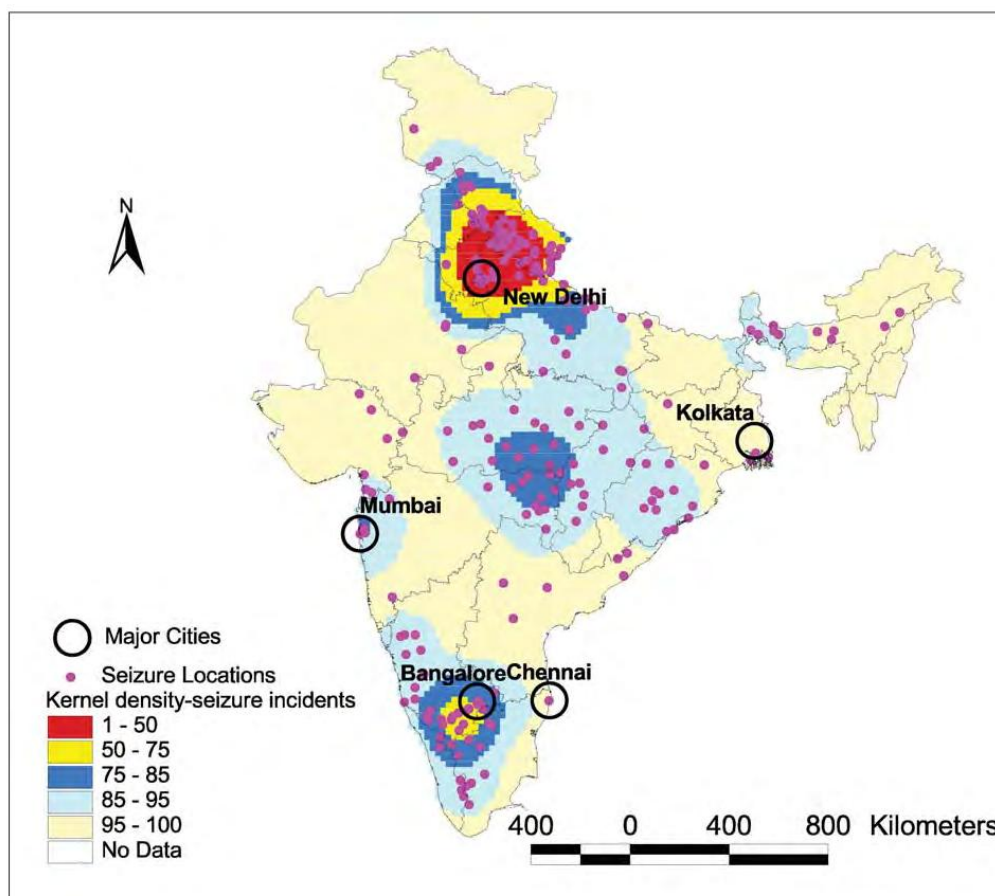
ปัจจุบันพระราชบัญญัติสงวนและคุ้มครองสัตว์ป่า พ.ศ. 2562 อนุญาตให้เลี้ยงและขยายพันธุ์เสือดาวได้เฉพาะเพื่อวัตถุประสงค์ในการประกอบกิจการสวนสัตว์เท่านั้น จากข้อมูลของส่วนคุ้มครองสัตว์ป่า และกลุ่มงานเพาะเลี้ยงสัตว์ป่า สำนักอนุรักษ์สัตว์ป่า กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช เมื่อวันที่ 13 กุมภาพันธ์ 2567 เสือดาวที่ได้รับอนุญาตครอบครองจากกรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช มีจำนวนทั้งสิ้น 144 ตัว โดยเป็นการครอบครองเพื่อประกอบกิจการสวนสัตว์สาธารณะ

จำนวน 12 ราย (139 ตัว) อย่างไรก็ตามยังมีผู้ครอบครองเสือดาวส่วนบุคคลที่ไม่ได้ครอบครองเพื่อวัตถุประสงค์ในการประกอบกิจการสวนสัตว์ ซึ่งได้รับอนุญาตครอบครองถูกต้องตามพระราชบัญญัติสงวนและคุ้มครองสัตว์ป่า พ.ศ. 2535 อีกจำนวน 2 ราย (5 ตัว) นอกจากนี้ยังมีเสือดาวของกลางที่ได้จากการตรวจยึดและอยู่ในความดูแลของกรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช ซึ่งอยู่ในความดูแลของศูนย์ช่วยเหลือสัตว์ป่าที่ 3 (เขาประทับช้าง) สถานีเพาะเลี้ยงสัตว์ป่าเขาสน สถานีเพาะเลี้ยงสัตว์ป่าภูเขียว สถานีเพาะเลี้ยงสัตว์ป่าจุฬาภรณ์ และสถานีเพาะเลี้ยงสัตว์ป่าห้วยขาแข้ง จำนวนทั้งหมด 15 ตัว รวมมีเสือดาวในกรงเลี้ยงของประเทศไทยที่อยู่ในการดูแลและกำกับดูแลของกรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช จำนวนทั้งสิ้น 159 ตัว โดยเสือดาวกลุ่มนี้ได้มีการทำเครื่องหมายประจำตัวสัตว์ด้วยการฝังรหัสไมโครชิพเพียงเท่านั้น และเคยมีการเก็บตัวอย่างเลือด เส้นขน และชิ้นเนื้อ รวบรวมไว้ที่ศูนย์นิติวิทยาศาสตร์สัตว์ป่า สำนักอนุรักษ์สัตว์ป่า กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช ตั้งแต่ปี 2555 จนถึงปัจจุบัน ประมาณ 100 ตัวอย่าง ถึงกระนั้นยังมีเสือดาวในกรงเลี้ยงของประเทศไทยที่อยู่ในความดูแลขององค์การสวนสัตว์แห่งประเทศไทย ในพระบรมราชูปถัมภ์ และยังไม่ได้แจ้งจำนวนเสือดาวที่อยู่ในความดูแลทั้งหมดให้กับกรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช อีกจำนวนหนึ่ง

2.3 สถานการณ์การลักลอบล่าและค้าเสือดาว

2.3.1 การลักลอบล่าและค้าเสือดาวทั่วโลก

การลักลอบล่าและค้าเสือดาวเป็นปัญหาสำคัญที่ทำให้ประชากรเสือดาวในธรรมชาติทั่วโลกลดลง การค้าเสือดาวและชิ้นส่วนของเสือดาวที่พบบ่อย ได้แก่ หนัง กรงเล็บ กระดูก และกะโหลก ประเทศจีนเป็นประเทศหลักที่มีความต้องการผลิตภัณฑ์และวัตถุดิบจากสัตว์ป่าสำหรับการแปรรูปเป็นยาแผนโบราณ ยิ่งไปกว่านั้นมียางานว่า เมื่อวันที่ 16 มีนาคม 2561 หน่วยงานป่าไม้ของจีนซึ่งเป็นหน่วยงานของรัฐ (China's State Forestry Administration; SFA) ได้ออกใบอนุญาตให้กับบริษัทยา Chinese Medicine Stock Co Ltd ในการขายกระดูกเสือดาวจำนวนมากกว่าหนึ่งพัน กิโลกรัมให้กับบริษัทยา Inner Mongolia Hongmao Pharmaceutical Co Ltd สำหรับใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตยาแผนโบราณ (Environmental Investigation Agency UK, 2018a) นอกจากนี้ ข้อมูลเสือดาวของกลางที่ตรวจยึดได้ทั่วโลกจากการลักลอบค้าสัตว์ป่าระหว่างปี 2542-2561 ยังแสดงให้เห็นว่า ปัญหาการลักลอบล่าและค้าเสือดาวเกือบทั้งหมดเกิดขึ้นในภูมิภาคเอเชีย โดยมีการตรวจยึดเสือดาวของกลางได้สูงสุดในแถบอนุทวีปอินเดีย รองลงมาเป็นภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ รวมถึงประเทศไทย ดังที่แสดงในแผนที่ตำแหน่งพื้นที่ตรวจยึดเสือดาวของกลางทั่วโลกของหน่วยงานประเมินผลกระทบสิ่งแวดล้อมแห่งสหราชอาณาจักร (Environmental Investigation Agency UK; EIA UK) (ภาพที่ 7) (Environmental Investigation Agency UK, 2018b)

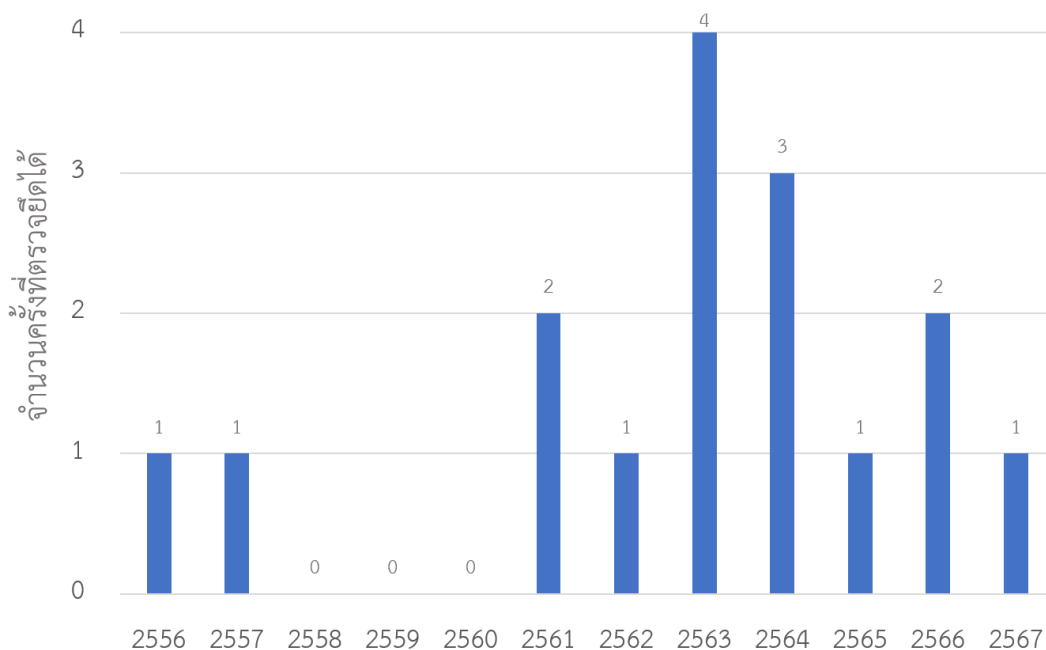


ภาพที่ 8 แผนที่แสดงการตรวจยึดเสือเสือดาวในประเทศอินเดียระหว่างปี 2544-2553
แหล่งที่มา: (Raza et al., 2012)

2.3.2 กรณีการลักลอบล่าและค้าเสือดาวในประเทศไทย

จากสถิติการลักลอบล่าและค้าเสือดาวในช่วงปี 2556-2567 มีจำนวนทั้งหมด 16 คดี (ภาพที่ 9) (C4ADS, 2024) ในปี 2561 มีการลักลอบล่าเสือดาวในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าทุ่งใหญ่นเรศวร 1 คดี ซึ่งเป็นข่าวดังไปทั่วโลก โดยผู้ล่าเป็นบุคคลที่มีชื่อเสียง (ภาพที่ 10) (Thaitrakulpanich, 2018) ในปีถัดมา (ปี 2562) ทางกรมไทยและอินเดียสามารถตรวจยึดลูกเสือดาวของกลางที่ส่งออกนอกประเทศไทย อย่างผิดกฎหมายได้ติดกัน 2 ครั้ง ครั้งแรกลูกเสือดาว 1 ตัว ถูกตรวจยึดโดยเจ้าหน้าที่ทางการของ อินเดียที่ทำอากาศยานนานาชาติเซไน (Chennai) ประเทศอินเดีย ซึ่งถูกลักลอบใส่กระเป๋าเดินทาง ส่งมาจากประเทศไทย (ภาพที่ 11) (Oppili, 2019) จากนั้นอีกประมาณ 1 เดือน เจ้าหน้าที่ทางการไทย ตรวจยึดลูกเสือดาว 2 ตัว ได้ที่ทำอากาศยานนานาชาติสุวรรณภูมิ ขณะกำลังเตรียมลักลอบส่งออกไป ประเทศอินเดียเช่นเดียวกัน (ภาพที่ 12) (Wildlife Friend Foundation, 2019) และกรณีล่าสุด ทางกรมไทยได้ตรวจยึดลูกเสือดาวเผือกได้ที่กรุงเทพฯ ในปี 2564 ขณะกำลังเตรียมลักลอบส่งออกไปยังประเทศอินเดีย (ภาพที่ 13) (The Nation, 2021) ไม่เพียงแต่ลูกเสือดาวที่มีชีวิตเท่านั้น

ที่ทางการไทยตรวจยึดได้ ยังรวมถึงหนังสือดาวที่ถูกลักลอบนำเข้าไทยจากประเทศเพื่อนบ้านอีกด้วย เช่น ในปี 2565 เจ้าหน้าที่กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช ตรวจยึดหนังสือ ได้แก่ หนังสือโครงหนังสือดาว และหนังสือลายเมฆ รวมทั้งหมด 6 ผืน ในคราวเดียวกันยังสามารถตรวจยึดลูกแมวดาวได้อีกจำนวน 3 ตัว ของกลางทั้งหมดถูกตรวจยึดได้ในพื้นที่อำเภอสังขละบุรี จังหวัดกาญจนบุรี ซึ่งลักลอบนำเข้ามาจากประเทศพม่า (ภาพที่ 14) (DNP news, 2565) อย่างไรก็ตามของกลางที่ตรวจยึดได้ทั้งหมด เจ้าหน้าที่ไม่สามารถตรวจสอบแหล่งที่มาได้ จากหลักฐานแวดล้อมที่เจ้าหน้าที่สืบสวนสอบสวนได้รับจากการค้าซากเสือดาวและลูกเสือดาวอย่างผิดกฎหมาย อาจเกี่ยวข้องกับสถานประกอบการการสวนสัตว์ที่ได้รับอนุญาตถูกต้องตามกฎหมาย แต่หลักฐานแวดล้อมที่ได้ไม่มีน้ำหนักพอสำหรับใช้ดำเนินการทางกฎหมายกับสถานที่ประกอบการการสวนสัตว์ที่ต้องสงสัยได้ และเนื่องจากซากเสือดาวที่ล่าในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ 1 ตัว มีมูลค่า 3,000 ดอลลาร์ (ประมาณ 107,000 บาท) (Stein et al., 2023) และลูกเสือดาวที่มีชีวิต 1 ตัว มีมูลค่าสูงถึง 430,000 บาท (Thai PBS, 2564) ประกอบกับทางภาครัฐยังไม่มีมาตรการเฝ้าระวังการลักลอบเพาะพันธุ์เสือดาวในกรงเลี้ยงที่มีประสิทธิภาพ ทำให้การติดตามแหล่งที่มาเสือดาวของกลางเพื่อนำตัวผู้กระทำผิดรายใหญ่มารับโทษทางกฎหมายทำได้ยาก ดังนั้นจึงเป็นเหตุแรงจูงใจให้มีการลักลอบล่าและค้าเสือดาวเรื่อยมา



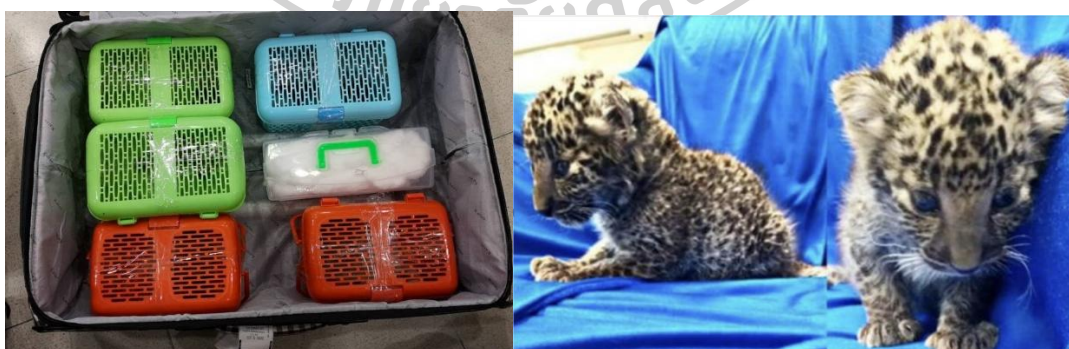
ภาพที่ 9 แสดงสถิติคดีการลักลอบล่าและค้าเสือดาวที่ตรวจยึดได้ในประเทศไทยระหว่างปี 2556-2567



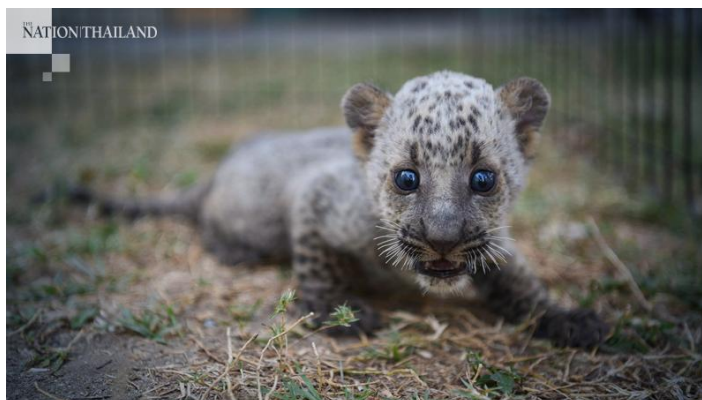
ภาพที่ 10 ซากเสือดำที่ถูกลักลอบล่าในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าทุ่งใหญ่นเรศวร
ที่มา: (Thaitrakulpanich, 2018)



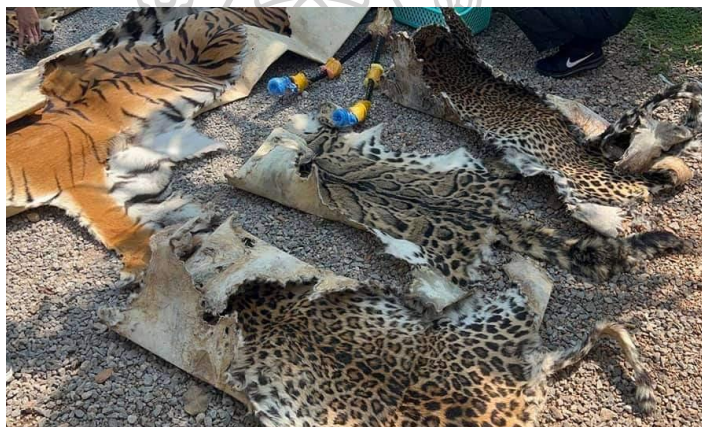
ภาพที่ 11 ลูกเสือดาวอายุ 50 วัน ถูกลักลอบส่งออกจากประเทศไทยไปยังประเทศอินเดีย
ที่มา: (Oppili, 2019)



ภาพที่ 12 ลูกเสือดาว 2 ตัว ถูกยึดได้ในประเทศไทยระหว่างกำลังขนส่งไปยังประเทศอินเดีย
ที่มา: (Wildlife Friend Foundation, 2019)



ภาพที่ 13 ลูกเสือดาวที่ตำรวจล่าซื้อและตรวจยึดได้ในบ่อน้ำมันแถวบางขุนเทียน กรุงเทพมหานคร
ที่มา: (The Nation, 2021)



ภาพที่ 14 ของกลางที่ตรวจยึดได้ประเภทหนังเสือที่ถูกลักลอบนำเข้ามาในประเทศไทย
ที่มา: (DNP news, 2565)

2.3.3 เส้นทางการลักลอบค้าสัตว์ป่ากลุ่มเสือ

เสือเป็นสัตว์ป่ากลุ่มเป้าหมายที่ถูกลักลอบล่าและค้ามาตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน จากรายงานการรวบรวมข้อมูลการค้าเสือขนาดใหญ่ (big cats) บริเวณแนวชายแดนประเทศไทยและประเทศเพื่อนบ้านระหว่างปี 2544 ถึง 2553 พบว่ามีทั้งร้านค้าและตลาดแลกเปลี่ยนสินค้าสัตว์ป่าจำพวกเสือโคร่ง เสือดาว เสือลายเมฆ สิงโต เสือดาวหิมะ ตามแนวชายแดนจำนวนมาก ชากเสือที่วางขายได้แก่ หนัง เขี้ยว เล็บ นอกจากนี้ชาวบ้านในแถบนี้ยังมีวิธีการดำรงชีวิตแบบดั้งเดิมโดยการเข้าป่าล่าสัตว์ รวมถึงมีการรับจ้างล่าเสือขนาดใหญ่ให้กับนายทุนต่างชาติ และอาศัยเส้นทางขนส่งสินค้าผ่านตามแนวชายแดนมาเลเซีย พม่า ไทย ลาว และเวียดนาม ไปยังประเทศจีน โดยจะมีตลาดค้าสัตว์ป่าตามแนวชายแดนรับช่วงในการกระจายสินค้าไปยังประเทศเป้าหมาย ตลาดค้าสัตว์ป่าตามแนวชายแดนของไทยและประเทศเพื่อนบ้านที่สำคัญ ได้แก่ ตลาดเกาะสอง (Kawthaung) ตั้งอยู่ในประเทศพม่าตรงข้ามกับจุดผ่านแดนถาวรระนอง จังหวัดระนอง ตลาดเจดีย์สามองค์ ตั้งอยู่บริเวณจุดผ่านแดนชั่วคราวเจดีย์สามองค์ จังหวัดกาญจนบุรี ตลาดท่าขี้เหล็ก (Tachileik) ตั้งอยู่ในประเทศพม่าตรงข้ามกับจุดผ่านแดนถาวรแม่สาย จังหวัดเชียงราย ตลาดเวียงทอง (Vieng Thong) ตั้งอยู่ในประเทศลาวตรงข้ามกับจังหวัดบึงกาฬ ตลาดท่าแขก (Thakek) ตั้งอยู่ในประเทศลาว ตรงข้ามกับจังหวัดนครพนม และตลาดช่องเม็ก (Chong Mek) ตั้งอยู่บริเวณจุดผ่านแดนถาวรช่องเม็ก จังหวัดอุบลราชธานี (ภาพที่ 15) (Oswell, 2010) ในช่วงปี 2533 ถึง 2543 มีรายงานว่า ตลาดท่าขี้เหล็ก ถือเป็นจุดศูนย์กลางการค้าหนังเสือ ได้แก่ เสือโคร่ง เสือดาว เสือลายเมฆ เสือไฟ แมวดาว โดยผู้ซื้อส่วนใหญ่เป็นชาวไทย อย่างไรก็ตามปัจจุบันมีการเฝ้าระวังการลักลอบค้าสัตว์ป่าที่เข้มงวดมากยิ่งขึ้น ตลอดจนมีการรับแจ้งเบาะแสการค้าจากประชาชน ทำให้ตลาดค้าสัตว์ป่าที่เคยค้าตามตลาดชายแดนได้อย่างเปิดเผยเปลี่ยนไปเป็นรูปแบบการค้าโดยใช้ช่องทางออนไลน์มากขึ้น สำหรับประเทศไทยการค้าสัตว์ป่ากลุ่มแมวอย่างผิดกฎหมายในตลาดอย่างเปิดเผยถูกจำกัด แต่ในขณะเดียวกันก็มีการค้าในช่องทางออนไลน์ที่สูงมากขึ้น (Nijman et al., 2019) ช่องทางการค้าสัตว์ป่าออนไลน์ในปัจจุบันมีหลายช่องทาง ช่องทางหลัก ๆ ที่ใช้ในการค้าสัตว์ป่า เช่น ebay, Facebook, Google, Instagram ฯลฯ (Allan, n.d.) จากรายงานการใช้ช่องทาง Facebook โพสต์ขายสัตว์ป่าผิดกฎหมายพบทั้งหมด 268 บัญชี สามารถสืบค้นแหล่งที่มาได้ 183 บัญชี ซึ่งบัญชีที่ตรวจพบเกือบทั้งหมดอยู่ในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ผู้ใช้บัญชี Facebook ในการค้าสัตว์ป่าส่วนใหญ่เชื่อมโยงกับบัญชีผู้ใช้ในไต้หวัน มาเลเซีย ฮ่องกง จีน และไทย ตามลำดับ โดยบัญชีที่อยู่ในประเทศไทยมีทั้งหมดจำนวน 15 บัญชี และมีเพียง 2 บัญชีที่อยู่ในสหรัฐอเมริกาและสหรัฐอเมริกา (Xu et al., 2020) สำหรับสถิติช่องทางการลักลอบค้าเสือดาวระหว่างปี 2556-2566 ช่องทางการขนส่งส่วนใหญ่ยังคงใช้ช่องทางบกเป็นหลักมากถึง 82.4% และช่องทางอากาศ 17.6% โดยประเทศไทยเกี่ยวข้องเป็นประเทศต้นทาง ประเทศนำผ่าน และประเทศปลายทาง 31.3% 43.8% และ 25% ตามลำดับ ซึ่งประเทศอินเดียเป็นประเทศนำผ่าน และประเทศ

ปลายทางของการลักลอบค้าเสือดาวระหว่างประเทศไทย โดยสามารถตรวจยึดเสือดาวของกลางได้ทั้งในประเทศไทยและอินเดีย (C4ADS, 2024)



ภาพที่ 15 แสดงตลาดแลกเปลี่ยนสินค้าจำพวกเสือขนาดใหญ่และเส้นทางการขนส่งสินค้าผ่านแนวชายแดนไทยและประเทศเพื่อนบ้าน
ที่มา: (Oswell, 2010)

2.4 กฎหมายของประเทศไทยที่ใช้คุ้มครองเสือดาว

เสือดาว หรือ เสือด้า (*Panthera pardus*) จัดเป็นสัตว์ป่าคุ้มครองบัญชี 1 บัญชีสัตว์ป่าคุ้มครอง ที่มีใช้สัตว์น้ำ ลำดับที่ 159 ตามกฎกระทรวง กำหนดให้สัตว์ป่าบางชนิดเป็นสัตว์ป่าคุ้มครอง พ.ศ. 2567 ห้ามมิให้ผู้ใดล่า ตามมาตรา 12 แห่งพระราชบัญญัติสงวนและคุ้มครองสัตว์ป่า พ.ศ. 2562 ถึงกระนั้น เสือดาวไม่จัดอยู่ในบัญชีสัตว์ป่าคุ้มครองที่อนุญาตให้เพาะพันธุ์เพิ่มจำนวนเพื่อการค้าได้โดยชอบด้วยกฎหมาย ตามกฎกระทรวง กำหนดชนิดของสัตว์ป่าคุ้มครองให้เป็นสัตว์ป่าชนิดที่เพาะพันธุ์ได้ พ.ศ. 2567 ปัจจุบันการครอบครอง ส่งออก นำเข้า นำผ่าน เสือดาวรวมถึงซากเสือดาวโดยชอบด้วยกฎหมาย สามารถกระทำการได้เฉพาะกรณีกระทำเพื่อกิจการสวนสัตว์ที่หน่วยงานของรัฐจัดตั้งตามหน้าที่และ ผู้ประกอบกิจการสวนสัตว์เอกชนที่ได้รับใบอนุญาตเท่านั้น ซึ่งเป็นไปตามมาตรา 17(1) และมาตรา 23 วรรคสอง แห่งพระราชบัญญัติสงวนและคุ้มครองสัตว์ป่า พ.ศ. 2562 นอกจากนี้เสือดาวยังจัดอยู่ในบัญชีแนบท้ายหมายเลข 1 แห่งอนุสัญญาไซเตส เป็นชนิดพันธุ์ที่ใกล้สูญพันธุ์ และตามข้อตกลง แห่งอนุสัญญาไซเตสได้ห้ามประเทศภาคีนำเข้า ส่งออกชนิดพันธุ์ที่ใกล้จะสูญพันธุ์ที่อยู่ในบัญชีแนบท้าย หมายเลข 1 เพื่อวัตถุประสงค์ทางการค้าโดยเด็ดขาด

พระราชบัญญัติสงวนและคุ้มครองสัตว์ป่า พ.ศ. 2562 อนุญาตให้ครอบครองเสือดาว ซากเสือดาวเพื่อกิจการสวนสัตว์ได้ทั้งสวนสัตว์ของภาคเอกชน และสวนสัตว์ที่หน่วยงานของรัฐจัดตั้งตามหน้าที่ โดยผู้ประกอบกิจการสวนสัตว์ภาคเอกชนจะต้องได้รับอนุญาตจัดตั้งสวนสัตว์และประกอบกิจการสวนสัตว์ตามหลักเกณฑ์ที่กำหนดตามมาตรา 33 ซึ่งจะต้องมีการทำบัญชีแจ้งจำนวนเสือดาวที่ครอบครองให้กับกรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช ด้วย สำหรับกิจการสวนสัตว์ของหน่วยงานภาครัฐ ตามมาตรา 38 วรรคสอง บังคับให้ต้องจัดส่งข้อมูลเกี่ยวกับจำนวนเสือดาวที่อยู่ในความครอบครองให้กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช เช่นเดียวกัน แม้ว่าพระราชบัญญัติสงวนและคุ้มครองสัตว์ป่า พ.ศ. 2562 จะอนุญาตให้ครอบครองเสือดาวได้เฉพาะวัตถุประสงค์เพื่อกิจการสวนสัตว์เท่านั้น ถึงกระนั้นในปัจจุบันก็ยังมีบุคคลที่ไม่ได้ครอบครองเสือดาวเพื่อวัตถุประสงค์ดังกล่าวอยู่อีกจำนวนหนึ่ง เนื่องจากมาตรา 117 แห่งพระราชบัญญัติสงวนและคุ้มครองสัตว์ป่า พ.ศ. 2562 อนุโลมให้การอนุญาต ใบอนุญาต หลักฐานการแจ้งการครอบครอง และใบรับรองที่ออกให้แก่บุคคลใด ๆ ตามพระราชบัญญัติสงวนและคุ้มครองสัตว์ป่า พ.ศ. 2535 ให้ยังคงใช้ได้ต่อไปจนกว่าจะสิ้นอายุหรือถูกเพิกถอน โดยบุคคลกลุ่มนี้เป็นบุคคลทั่วไปที่ได้รับอนุญาตครอบครองเสือดาวตามกฎหมายกำหนดแบบ และวิธีการแจ้งการครอบครองสัตว์ป่าคุ้มครองและซากของสัตว์ป่าคุ้มครอง การออกใบอนุญาตให้ครอบครองสัตว์ป่าคุ้มครองชั่วคราวและการออกใบรับรองการครอบครองซากของสัตว์ป่าคุ้มครอง พ.ศ. 2550 ซึ่งออกโดยอาศัยอำนาจตามความในมาตรา 5 และมาตรา 61 แห่งพระราชบัญญัติสงวนและคุ้มครองสัตว์ป่า พ.ศ. 2535

แม้ว่าผู้ได้รับอนุญาตครอบครองเสือดาวในกรณีต่าง ๆ ข้างต้นจะสามารถเลี้ยงเสือดาวได้ โดยชอบด้วยกฎหมาย อย่างไรก็ตามผู้ได้รับอนุญาตดังกล่าวจะไม่สามารถดำเนินการเพาะขยายพันธุ์ เพิ่มจำนวนเสือดาวเพื่อการค้าโดยชอบด้วยกฎหมายได้ และหากมีลูกเสือดาวเกิด หรือตายในกรงเลี้ยง หรือมีการเปลี่ยนแปลง หรือโอนกรรมสิทธิ์การครอบครอง ผู้ได้รับใบอนุญาตครอบครองจะต้องแจ้ง ต่ออธิบดีกรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช ทั้งนี้เป็นไปตามมาตรา 35 วรรคสาม แห่งพระราชบัญญัติสงวนและคุ้มครองสัตว์ป่า พ.ศ. 2562

การคุ้มครองเสือดาวในถิ่นที่อยู่อาศัยตามธรรมชาติ พระราชบัญญัติสงวนและคุ้มครองสัตว์ป่า พ.ศ. 2562 ได้กำหนดให้ป่าคุ้มครองบางพื้นที่เป็นเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่า หรือเขตห้ามล่าสัตว์ป่า ทั้งนี้ เพื่อการคุ้มครองแหล่งที่อยู่อาศัยของสัตว์ป่า โดยพื้นที่ดังกล่าวนี้จะมีข้อกำหนด กฎเกณฑ์ที่ค่อนข้าง เข้มงวดในการเข้าพื้นที่ และมีข้อห้ามต่าง ๆ ตามมาตรา 55 หรือมาตรา 67 ได้แก่ ห้ามล่าสัตว์ป่า ห้ามเก็บหรือการทำอันตรายแก่รังของสัตว์ป่า ห้ามล่อหรือนำสัตว์ป่าออกจากพื้นที่ ห้ามทำลายระบบ นิเวศในรูปแบบต่าง ๆ เป็นต้น โดยผู้กระทำการฝ่าฝืนในพื้นที่นั้น ๆ จะต้องได้รับโทษตามแต่ละพื้นที่ กำหนด นอกจากนี้พระราชบัญญัติอุทยานแห่งชาติ พ.ศ. 2562 ยังได้กำหนดให้ป่าคุ้มครองบางพื้นที่ เป็นอุทยานแห่งชาติ ซึ่งมีกฎเกณฑ์ ข้อห้ามต่าง ๆ คล้าย ๆ กับเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่า ซึ่งหากมีการ กระทำผิดดังกล่าว ผู้กระทำผิดจะได้รับโทษตามพระราชบัญญัติอุทยานแห่งชาติ พ.ศ. 2562

2.5 การตรวจพิสูจน์พยานหลักฐานในงานนิติวิทยาศาสตร์สัตว์ป่าของประเทศไทย

เนื่องจากพระราชบัญญัติสงวนและคุ้มครองสัตว์ป่า พ.ศ. 2562 มีเจตนารมณ์เพื่อคุ้มครอง สัตว์ป่าที่มีแหล่งกระจายพันธุ์ในประเทศไทย รวมถึงให้การคุ้มครองสัตว์ป่าต่างถิ่นที่อยู่ในบัญชีแนบท้าย ของอนุสัญญาไซเตสทั้ง 3 บัญชี ซึ่งพระราชบัญญัติฉบับนี้ได้แบ่งสัตว์ป่าออกเป็น 4 ประเภท คือ สัตว์ป่าสงวน สัตว์ป่าคุ้มครอง สัตว์ป่าควบคุม และสัตว์ป่าอันตราย โดยชนิดของสัตว์ป่าแต่ละประเภท และชนิดสัตว์ป่าที่สามารถใช้ประโยชน์ทางเศรษฐกิจได้จะถูกกำหนดไว้ในกฎกระทรวง และประกาศ กระทรวง ตามลำดับ นอกจากนี้ การกระทำผิดโดยการล่าสัตว์ป่าที่อาศัยอยู่ในพื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่า เขตห้ามล่าสัตว์ป่า และอุทยานแห่งชาติ ผู้กระทำผิดอาจได้รับโทษที่แตกต่างกัน ดังนั้น เมื่อมีคดี การกระทำความผิดเกี่ยวกับสัตว์ป่าเกิดขึ้น หน่วยงานที่มีอำนาจหน้าที่ในการบังคับใช้กฎหมาย จึงจำเป็นต้องทราบชนิดของสัตว์ป่าของกลางที่ตรวจยึดได้ เพื่อใช้ในการจำแนกประเภทของสัตว์ป่า และลำดับหมายเลขบัญชีแนบท้ายของอนุสัญญาไซเตส รวมถึงแหล่งที่มาของสัตว์ป่าของกลางชนิดนั้น ๆ ดังนั้น การตรวจพิสูจน์พยานหลักฐานในงานนิติวิทยาศาสตร์สัตว์ป่าของประเทศไทยจึงมุ่งเน้นไปที่ การตรวจพิสูจน์ชนิดและแหล่งที่มาของสัตว์ป่าของกลาง ซึ่งอาจสามารถตรวจพิสูจน์ได้ด้วยวิธีการ สันฐานวิทยา และการใช้เครื่องหมายพันธุกรรม

2.6 สารพันธุกรรมและเครื่องหมายพันธุกรรม

สารพันธุกรรมมีบทบาทสำคัญในการควบคุมและกำหนดลักษณะของสิ่งมีชีวิต สารพันธุกรรมแบ่งเป็น 2 ประเภท คือ ดีเอ็นเอ (deoxyribonucleic acid; DNA) และอาร์เอ็นเอ (Ribonucleic acid; RNA) ทั้งสองประเภทนี้มีโครงสร้างที่แตกต่างกัน โดยดีเอ็นเอ มีโครงสร้างเป็นสายคู่ (double-stranded) ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) ซึ่งมีน้ำตาลดีออกซีไรโบส (deoxyribose sugar) กรดฟอสฟอริก (phosphoric acid) และสารประกอบไนโตรจีนัสเบส (nitrogenous base) เป็นส่วนประกอบ ในขณะที่อาร์เอ็นเอมีโครงสร้างเป็นสายเดี่ยว (single strand) มีองค์ประกอบคล้ายกับดีเอ็นเอ แต่แทนที่น้ำตาลดีออกซีไรโบสด้วยน้ำตาลไรโบส (ribose sugar) สารประกอบไนโตรจีนัสเบสของสารพันธุกรรมทั้งสองประเภทแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มพิวรีนเบส (Purine) ได้แก่ ไทมีน (Thymine; T) ยูราซิล (Uracil; U) ไซโตซีน (Cytosine; C) และกลุ่มไพริมิดีนเบส (Pyrimidine) ได้แก่ อะดีนีน (Adenine; A) กัวนีน (Guanine; G) โดยตำแหน่งไทมีนในอาร์เอ็นเอจะถูกแทนด้วยยูราซิล ดังนั้นสารพันธุกรรมแต่ละประเภทจึงประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกัน 4 ชนิด มาเรียงต่อกันเป็นสายยาว ด้วยโครงสร้างที่แตกต่างกันของดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอดังกล่าวจึงทำให้ดีเอ็นเอคงทนต่อสภาพแวดล้อมได้มากกว่าสารพันธุกรรมประเภทอาร์เอ็นเอ (สถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, 2567) ดังนั้นการตรวจพิสูจน์พันธุกรรมในงานนิติวิทยาศาสตร์จึงตรวจพิสูจน์จากสารพันธุกรรมประเภทดีเอ็นเอเป็นหลัก

สิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดมีลักษณะพันธุกรรมที่แตกต่างกัน นอกจากนี้สิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันในแต่ละตัวยังมีลักษณะทางพันธุกรรมที่เป็นเอกลักษณ์เฉพาะ ซึ่งการแสดงออกของลักษณะทางพันธุกรรมที่ปรากฏนั้น ๆ ถูกควบคุมด้วยยีน เช่น สีผิว สีตา ลักษณะผมหยิก ความสูง ฯลฯ โดยลักษณะดังกล่าวสามารถถ่ายทอดไปยังรุ่นลูกหลานได้ คุณสมบัติพิเศษของสารพันธุกรรมนี้จึงมีประโยชน์ในการใช้ตรวจพิสูจน์ในงานนิติวิทยาศาสตร์ เช่น การตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคล การตรวจความสัมพันธ์ทางสายเลือดของสิ่งมีชีวิต ซึ่งการตรวจพันธุกรรมจะต้องคัดเลือกเครื่องหมายพันธุกรรมที่เหมาะสม

เครื่องหมายพันธุกรรม (Genetic Markers) คือ ส่วนของพันธุกรรมที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความแตกต่างเฉพาะเจาะจงระหว่างบุคคลหรือระหว่างประชากร จึงสามารถใช้ระบุความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างบุคคลหรือประชากรได้ (อนุรุทธิ์ หมิดเสน, 2560) เครื่องหมายพันธุกรรมแบ่งเป็น 2 ประเภท คือ 1) เครื่องหมายพันธุกรรมแบบซ่มสมบูรณ์ (dominant marker) เป็นเครื่องหมายพันธุกรรมที่แสดงเฉพาะลักษณะเด่นที่ได้รับการถ่ายทอดทางพันธุกรรม แม้ว่าในสิ่งมีชีวิตนั้น ๆ จะมียีนลักษณะด้อยอยู่ด้วยก็ตาม เครื่องหมายพันธุกรรมประเภทนี้จะไม่สามารถจำแนกความแตกต่างของแอลลีลที่เป็น heterozygotes ได้ เช่น เครื่องหมายอาร์เอฟพีดี (Random Amplified Polymorphic DNA; RAPD) เครื่องหมายเอเอฟแอลพี (Amplified Fragment Length Polymorphism; AFLP) 2) เครื่องหมายพันธุกรรมแบบซ่มร่วม (codominant marker)

เป็นเครื่องหมายพันธุกรรมที่สามารถแสดงลักษณะแอลลีลที่แตกต่างกันได้ โดยเฉพาะแอลลีลที่มีลักษณะด้อยและลักษณะเด่นอยู่ด้วยกัน (heterozygous) เช่น เครื่องหมายวีเอ็นทีอาร์ (Variable Number Tandem Repeats; VNTRs) หรือเครื่องหมายมินิแซตเทลไลต์ (minisatellite)) เครื่องหมายอาร์เอฟแอลพี (Restriction Fragment Length Polymorphism; RFLP) เครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ (microsatellite หรือ Simple Sequence Repeats; SSRs หรือ Short Tandem Repeats; STRs) เครื่องหมายสนิปส์ (Single Nucleotide Polymorphisms; SNPs) (Garcia et al., 2004) ดังนั้น เครื่องหมายพันธุกรรมแบบข่มร่วมจึงสามารถใช้ในการระบุตัวและตรวจพิสูจน์ความสัมพันธ์ทางสายเลือดของสิ่งมีชีวิตได้

2.7 พัฒนาการของเครื่องหมายพันธุกรรมสำหรับการใช้ในการตรวจพิสูจน์ทางนิติวิทยาศาสตร์

พยานหลักฐานทางพันธุกรรมถูกนำมาใช้ในงานนิติวิทยาศาสตร์ครั้งแรกในปี ค.ศ. 1988 ในคดีของ Colin Pitchfork ผู้กระทำความผิดคดีฆาตกรรมเด็กในประเทศอังกฤษ โดยใช้วิธีการตรวจพิสูจน์พันธุกรรมด้วยเครื่องหมายมินิแซตเทลไลต์ ซึ่งพัฒนาขึ้นในปี ค.ศ. 1985 เครื่องหมายประเภทนี้สามารถใช้ในการระบุเอกลักษณ์บุคคล และตรวจพิสูจน์ความสัมพันธ์ทางสายเลือดได้ (Jeffreys et al., 1985) เป็นเครื่องหมายที่สามารถจำแนกลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้ำ ๆ ที่แตกต่างกันระหว่าง 9-80 นิวคลีโอไทด์ อย่างไรก็ตามตัวอย่างที่จะใช้ตรวจพิสูจน์ด้วยเครื่องหมายมินิแซตเทลไลต์จะต้องมีคุณภาพสูง สารพันธุกรรมไม่เสื่อมสภาพ ต่อมาในช่วงทศวรรษที่ 1990 ได้มีการนำเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์มาใช้ในการระบุเอกลักษณ์บุคคล รวมถึงใช้ในการจำแนกเพศ ซึ่งข้อได้เปรียบของเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์นี้ คือ สามารถจำแนกลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้ำ ๆ ที่แตกต่างกันเพียง 2-7 นิวคลีโอไทด์เท่านั้น ทำให้สามารถตรวจพิสูจน์ตัวอย่างสารพันธุกรรมเสื่อมสภาพได้ อีกทั้งยังมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง (high polymorphism) จึงเหมาะกับงานนิติวิทยาศาสตร์มากกว่าเครื่องหมายมินิแซตเทลไลต์ นอกจากนี้ได้มีการพัฒนาการตรวจพิสูจน์เครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์แบบมัลติเพล็กซ์ (multiplex system) สามารถวิเคราะห์ผลได้พร้อม ๆ กันถึง 4 เครื่องหมาย และยังมีการพัฒนาชุดตรวจเอกลักษณ์บุคคลสำเร็จรูปด้วยวิธีเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์สำหรับมนุษย์ขึ้นมาอีกหลายชุดตรวจ โดยแต่ละชุดตรวจจะใช้เครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ตั้งแต่ 12-27 เครื่องหมาย ในปี ค.ศ. 2017 หน่วยงานของสหรัฐอเมริกาที่รวบรวมข้อมูลและจัดทำฐานข้อมูลดีเอ็นเอของมนุษย์ หรือ CODIS (Combined DNA Index System) สนับสนุนการใช้เครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ในการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลสำหรับมนุษย์จำนวน 20 เครื่องหมาย นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาชุดตรวจสำเร็จรูปของสัตว์เลี้ยง ได้แก่ สุนัข และแมว ซึ่งมีเครื่องหมายที่ใช้ตรวจพิสูจน์จำนวน 18 และ 11 เครื่องหมาย ตามลำดับ เครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ยังใช้ประโยชน์ในงานนิติวิทยาศาสตร์สัตว์ป่า โดยเฉพาะการตรวจพิสูจน์การลักลอบค้าค้างคาว รวมถึงการลักลอบล่าและค้าสัตว์ป่าชนิดพันธุ์หายากอื่น ๆ

แม้ว่าเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์จะมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง และนำมาใช้ในงานนิติวิทยาศาสตร์อย่างแพร่หลายก็ตาม แต่ตำแหน่งพันธุกรรมที่วิเคราะห์ได้จากเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ก็มีโอกาสเกิดการกลายพันธุ์ได้สูง ไม่ว่าจะเป็นการเกิด insertions หรือ deletions (indels) ดังนั้นจึงมีการพัฒนาเครื่องหมายสเนปส์ (Single Nucleotide polymorphisms; SNPs) เพื่อใช้ตรวจพิสูจน์ควบคู่กับเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ ข้อได้เปรียบของเครื่องหมายสเนปส์ คือ มีการกลายพันธุ์ต่ำ และสามารถใช้ตรวจพิสูจน์ตัวอย่างที่สารพันธุกรรมเสื่อมสภาพได้อย่างมีประสิทธิภาพ เนื่องจากการตรวจพิสูจน์ด้วยเครื่องหมายสเนปส์หนึ่งเครื่องหมายจะใช้การวิเคราะห์ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่เปลี่ยนแปลงไปเพียง 1 นิวคลีโอไทด์เท่านั้น ถึงกระนั้นเครื่องหมายสเนปส์ก็มีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำกว่าเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ โดยจากการประเมินค่าโอกาสการแยกแยะรวม (Total Probability of Discrimination) ของการตรวจพิสูจน์ด้วยเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์จำนวน 15 เครื่องหมาย จะมีค่าการแยกแยะเท่ากับการตรวจพิสูจน์ด้วยเครื่องหมายสเนปส์จำนวน 40-60 เครื่องหมาย ดังนั้นในปัจจุบันเครื่องหมายสเนปส์จึงเป็นเพียงเครื่องมือเสริมสำหรับช่วยในการตรวจพิสูจน์ในงานนิติวิทยาศาสตร์เท่านั้น (Kowalczyk et al., 2018)

2.8 การตรวจพิสูจน์พันธุกรรมเพื่อระบุตัวและหาความสัมพันธ์ทางสายเลือดในสัตว์

จากการรวบรวมงานวิจัยต่าง ๆ ของคณะกรรมการระหว่างประเทศในการบันทึกข้อมูลเกี่ยวกับสัตว์ (International Committee for Animal Recording; ICAR) ในกรณีการตรวจพิสูจน์ความสัมพันธ์ทางสายเลือดด้วยวิธีเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์และเครื่องหมายสเนปส์ พบว่าความแม่นยำในการตรวจพิสูจน์ความสัมพันธ์ทางสายเลือดด้วยเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์มีอัตราการผิดพลาด (error rate) 1-5% (Baruch & Weller, 2008) ในขณะที่เครื่องหมายสเนปส์มีอัตราการผิดพลาดเพียง 0.1% เท่านั้น (Cooper et al., 2013) โดยเครื่องหมายสเนปส์ 2-3 เครื่องหมายให้ค่าความแม่นยำการคัดออก (Exclusion accuracy) เท่ากับเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ 1 เครื่องหมาย (Vignal et al., 2002) ตัวอย่างเช่น การตรวจพิสูจน์ความสัมพันธ์ทางสายเลือดของวัวในฟาร์มปศุสัตว์ คณะกรรมการระหว่างประเทศในการบันทึกข้อมูลเกี่ยวกับสัตว์ได้กำหนดมาตรฐานจำนวนเครื่องหมายสเนปส์ขั้นต่ำไว้ 100-200 เครื่องหมาย (ICAR, 2017) และหากตรวจพิสูจน์ดังกล่าวด้วยเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ต้องใช้จำนวนเครื่องหมายขั้นต่ำ 12 เครื่องหมาย (ICAR, 2015) ในส่วนของการแปรผลการตรวจพิสูจน์ความสัมพันธ์ทางสายเลือดในสัตว์ สมาคมระหว่างประเทศด้านพันธุศาสตร์สัตว์ (International Society for Animal Genetics หรือ ISAG) ได้กำหนดวิธีการแปรผลไว้เป็นมาตรฐานที่แน่นอน โดยผลที่ไม่ปฏิเสธความเป็นแม่-ลูก หรือ พ่อ-ลูก ที่วิเคราะห์ได้ด้วยวิธีเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์จะต้องมีเครื่องหมายที่ปฏิเสธความสัมพันธ์ทางสายเลือดได้ไม่เกิน 1 เครื่องหมาย และ 3-4 เครื่องหมาย สำหรับการวิเคราะห์ผลด้วยวิธีเครื่องหมายสเนปส์ (ISAG, 2007)

การตรวจพิสูจน์พันธุกรรมด้วยวิธีเครื่องหมายสปีส์ในสัตว์มีการพัฒนาอย่างต่อเนื่องสำหรับใช้ประโยชน์ในการศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากร การระบุตัว และการตรวจพิสูจน์ความสัมพันธ์ทางสายเลือด ซึ่งเครื่องหมายสปีส์เหมาะสำหรับใช้ในการตรวจพิสูจน์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในประชากรขนาดใหญ่ ทำให้นักวิจัยสนใจศึกษา autosomal SNPs มากขึ้น (Sobrinho & Carracedo, 2005) นอกจากนี้เครื่องหมายสปีส์ยังสามารถใช้ตรวจพิสูจน์พันธุกรรมในตัวอย่างที่ถูกย่อยสลาย เสื่อมสภาพ หรือแม้แต่ DNA amplicons สั้น ๆ ได้ (Canturk et al., 2014) แม้ว่าปัจจุบันมีการศึกษาวิจัยพัฒนาเครื่องหมายสปีส์สำหรับสัตว์มากขึ้น แต่กระบวนการวิเคราะห์ด้วยวิธีเครื่องหมายสปีส์ในการหาความสัมพันธ์ทางสายเลือดในสัตว์จำเป็นต้องใช้เครื่องหมายสปีส์ขั้นต่ำ 100-500 เครื่องหมาย ต่างจากการวิเคราะห์ด้วยวิธีเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ที่ใช้เพียงไม่กี่เครื่องหมายเท่านั้น ซึ่งการวิเคราะห์เครื่องหมายสปีส์ที่มีจำนวนมากจำเป็นต้องใช้เทคโนโลยีขั้นสูงและเครื่องมือที่มีราคาแพง ได้แก่ Next-Generation DNA sequencing (NGS) และ SNP arrays (Flanagan & Jones, 2019) ทำให้การตรวจพิสูจน์พันธุกรรมเพื่อวัตถุประสงค์ในการระบุตัว และการตรวจพิสูจน์ความสัมพันธ์ทางสายเลือด ด้วยเครื่องหมายสปีส์ในงานนิติวิทยาศาสตร์ยังไม่แพร่หลายมากนัก

2.9 หลักการคัดเลือกเครื่องหมายพันธุกรรมและค่าสถิติเฉพาะ

เครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์และเครื่องหมายสปีส์เป็นเครื่องหมายพันธุกรรมที่ได้รับการยอมรับในงานนิติวิทยาศาสตร์ สำหรับการพัฒนาเครื่องหมายพันธุกรรมดังกล่าวเพื่อใช้ในงานนิติวิทยาศาสตร์สัตว์นั้นได้จากการศึกษาวิจัยจำพวกการประเมินและการเปรียบเทียบความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรสัตว์ชนิดนั้น ๆ ที่มีการรายงานเครื่องหมายที่ได้จากการศึกษาวิจัยไว้ ต่างจากการพัฒนาเครื่องหมายพันธุกรรมของมนุษย์สำหรับใช้ในงานนิติวิทยาศาสตร์ที่อาศัยความร่วมมือจากหลายองค์กร ได้แก่ องค์กร International Society for Forensic Genetics (ISFG), European DNA Profiling (EDNAP), European Network of Forensic Science Institutes (ENFSI), Scientific Working Group on DNA Analysis Methods (SWGDM) เป็นต้น ร่วมกันพัฒนาเครื่องหมายพันธุกรรมซึ่งเป็นที่ยอมรับในระดับสากล (Jacewicz, 2018) สำหรับองค์กรที่กำหนดมาตรฐานในการตรวจพิสูจน์พันธุกรรมสัตว์ด้วยวิธีเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์และเครื่องหมายสปีส์ซึ่งเป็นที่ยอมรับในระดับสากล ได้แก่ International Society of Animal Genetics (ISAG), International Society for Forensic Genetics (ISFG), และ Society for Wildlife Forensic Science (SWFS) (ISAG, 2007; Linacre et al., 2011; Moore et al., 2021) เป็นต้น

ปัจจุบันมีการพัฒนาชุดตรวจพันธุกรรมสำเร็จรูปทางการค้ากับสัตว์เลี้ยงหลายชนิด เพื่อใช้ในการตรวจพิสูจน์ระบุตัว และพิสูจน์ความสัมพันธ์ทางสายเลือดในสัตว์ ซึ่งชุดตรวจที่พัฒนาขึ้นมานั้นอ้างอิงตามคำแนะนำการพัฒนาเครื่องหมายพันธุกรรมของสมาคมระหว่างประเทศด้านพันธุศาสตร์สัตว์ (ISAG) เป็นหลัก ชุดตรวจพันธุกรรมสำเร็จรูปด้วยวิธีเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ในสัตว์เลี้ยง ได้แก่ ชุดตรวจพันธุกรรมของสุนัข (Thermo Scientific™ Canine Genotypes Panel 1.1) จำนวน 19 เครื่องหมาย ชุดตรวจพันธุกรรมของวัว (Bovine Genotypes™ Panels 1.2) จำนวน 12 เครื่องหมาย และชุดตรวจพันธุกรรมของม้า (Equine Genotypes™ Panel 1.1) จำนวน 17 เครื่องหมาย (Kanthaswamy, 2015) นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาชุดตรวจพันธุกรรมสำเร็จรูปเพื่อใช้ระบุตัวและหาความสัมพันธ์ทางสายเลือดด้วยวิธีเครื่องหมายสปีส์ของสัตว์เลี้ยง ได้แก่ ชุดตรวจพันธุกรรมของวัว (Bovine ISAG SNP Parentage Panel (2013)) จำนวน 200 เครื่องหมาย (Schütz & Brenig, 2015) ชุดตรวจพันธุกรรมของแมว (AgriSeq™ Feline Parentage and ID Plus Traits and Disorders Panel) จำนวน 111 เครื่องหมาย และชุดตรวจพันธุกรรมของสุนัข (AgriSeq™ Canine SNP Parentage and ID Panel) จำนวน 381 เครื่องหมาย เป็นต้น

การทดสอบประสิทธิภาพและจำนวนเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ที่เหมาะสมสำหรับการระบุตัวสัตว์ พิจารณาจากค่า Probability of Identity (P_{ID}) หรือ Probability of Identity siblings (PID_{sib}) หรือ Total Probability of Discrimination (TPD) ในส่วนของการทดสอบประสิทธิภาพ และจำนวนเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ที่เหมาะสมสำหรับการตรวจความสัมพันธ์ทางสายเลือดจะพิจารณาจากค่า Combined Probability of Parentage Exclusion (CPE) (Budowle et al., 2005; Choi et al., 2012; Jan & Fumagalli, 2016) โดยค่า TPD, P_{ID} , PID_{sib} และ CPE รวมของทุกเครื่องหมายจะแสดงถึงประสิทธิภาพและจำนวนของเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ที่เหมาะสมสำหรับการระบุตัว และตรวจพิสูจน์ความสัมพันธ์ทางสายเลือด ตัวอย่างเช่น การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์จำนวน 15 เครื่องหมาย สำหรับใช้ในการระบุเอกลักษณ์และตรวจพิสูจน์ความสัมพันธ์ทางสายเลือดของเสือโคร่งในกรงเลี้ยง มีค่า TPD และ CPE รวมของทุกเครื่องหมายเท่ากับ 0.999999999999995 และ 0.999999472 ตามลำดับ (Zhao et al., 2020) การพัฒนาและคัดเลือกเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ของสัตว์ป่าส่วนใหญ่มุ่งเน้นเพื่อวัตถุประสงค์การระบุตัวสัตว์ สำหรับใช้ในการศึกษาประเมินจำนวนประชากรเป็นหลัก ดังนั้นจึงมีการรายงานเฉพาะค่า Probability of Identify ซึ่งบ่งบอกประสิทธิภาพของเครื่องหมายในการใช้ระบุตัว นอกจากนี้การคัดเลือกเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ยังต้องพิจารณาค่าทางสถิติอื่น ๆ ได้แก่ Hardy–Weinberg Equilibrium (HWE), Polymorphic Information Content (PIC), Linkage Disequilibrium (LD),

Observed Heterozygosity (Ho), Expected Heterozygosity (He), Number of Alleles (NA) และ Null allele รวมถึงรูปแบบชุดซ้ำของนิวคลีโอไทด์ (Di/Tri/Tetra/Penta-nucleotide repeats) และขนาดของแอลลีลสำหรับใช้วางแผนในการออกแบบ Multiplex microsatellites (Ning et al., 2022; Pandey et al., 2021)

การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์สามารถทำได้โดยการค้นหาตำแหน่งนิวคลีโอไทป์ที่มีชุดซ้ำทั้งจีโนมด้วยวิธี Whole genome survey จำเป็นต้องมีข้อมูลจีโนมของสัตว์ชนิดนั้น ๆ สามารถทำได้โดยการถอดรหัสพันธุกรรมทั้งจีโนม ซึ่งมีค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูง หรือหากมีข้อมูลจีโนมที่มีรายงานบนฐานข้อมูลพันธุกรรมของศูนย์ข้อมูลเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (National Center for Biotechnology Information; NCBI) อยู่แล้ว ก็สามารถดาวน์โหลดข้อมูลจีโนมจากฐานข้อมูลดังกล่าวมาใช้ได้เลย ถึงกระนั้นก็มีขั้นตอนที่ซับซ้อนและต้องใช้ซอฟต์แวร์ที่จำเพาะ ประกอบกับข้อมูลจีโนมที่มีจำนวนมากจำเป็นต้องใช้ฮาร์ดแวร์และซอฟต์แวร์ที่มีประสิทธิภาพสูง เช่น การค้นหาเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ของเสือขนาดใหญ่ ในสกุล *Panthera* ในการระบุอัตลักษณ์เสือโคร่ง เสือดาว และสิงโต จำนวน 12 เครื่องหมาย มีค่า Probability of Identify เท่ากับ $1.59E-12$, $8.64E-12$ และ $1.03E-08$ ตามลำดับ (Hyun et al., 2021) ดังนั้นการคัดเลือกเครื่องหมายด้วยวิธี Cross-species amplification จึงเป็นทางเลือกอีกวิธีหนึ่งที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากการคัดเลือกเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์จากชนิดสัตว์ที่ใกล้เคียงกับสัตว์ที่เราต้องการคัดเลือกเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ที่มีการศึกษาวิจัยเผยแพร่ไว้ก่อนหน้านี้ สำหรับเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ของสัตว์ในกลุ่มเสือที่ใช้กันอย่างแพร่หลายมาถึงปัจจุบัน ส่วนใหญ่อ้างอิงมาจากเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ของแมว (Menotti-Raymond et al., 1999; Menotti-Raymond et al., 2005) เช่นการคัดเลือกเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์เสือโคร่ง (Sharma et al., 2008) เสือดาวหิมะ (Janečka et al., 2008) หรือการใช้เครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์จำนวน 16 เครื่องหมาย ซึ่งส่วนใหญ่อ้างอิงเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์มาจากเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ของแมวเพื่อใช้ในการระบุตัวเสือดาวในธรรมชาติ ในการศึกษาโครงสร้างประชากร ซึ่งมีค่า Probability of Identify เท่ากับ $5.24E-04$ (Dutta et al., 2012) หรือการระบุเอกลักษณ์ในกลุ่มเสือขนาดใหญ่ (Big cats) 3 ชนิด คือ เสือโคร่ง เสือดาว และสิงโต ได้จำนวนเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ทั้งหมด 12 เครื่องหมาย ซึ่งมีค่า Probability of Identify เท่ากับ $1.45E-08$, $1.88E-12$ และ $1.54E-10$ ตามลำดับ (Pandey et al., 2021) นอกจากนี้เครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ของแมวยังสามารถนำมาใช้กับเสือจากัวร์ได้อีกด้วย (Corner et al., 2019)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี

- 1) เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (Applied Biosystems™ VeritiPro Thermal Cycler)
- 2) เครื่องวิเคราะห์สารพันธุกรรม (Applied Biosystems™ 3500XL Genetic Analyzer)
- 3) เครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรม (Thermo Scientific™ NanoDrop Lite Spectrophotometer)
- 4) เครื่องปั่นเหวี่ยงสาร (Sorvall™ Legend™ Micro 21 Microcentrifuge)
- 5) เครื่องผสมสารละลาย (Vortex-Gemie® 2 Operating Instructions)
- 6) เครื่องอุ่นหลอดทดลองแบบแห้ง (Heating Block Elite Dry Bath Incubator)
- 7) หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Auto Clave)
- 8) ตู้อบลมร้อน (Hot Air Oven)
- 9) ตู้ปฏิบัติการพีซีอาร์ (PCR cabinet รุ่น BW-PCR-001 ยี่ห้อ Biowerks)
- 10) ชุดเครื่องดูดจ่ายสารละลาย 1 channel (Eppendorf Research® plus micropipette) ขนาด 0.1-2.5 μL , 0.5-10 μL , 2-20 μL , 20-200 μL และ 100-1000 μL
- 11) ชุดเครื่องดูดจ่ายสารละลาย 8 channels (8-Channels Eppendorf Research® plus micropipette) ขนาด 0.5-10 μL
- 12) ตู้แช่แข็ง อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส สำหรับเก็บรักษาสารพันธุกรรม และสารเคมี
- 13) เตาอบไมโครเวฟ
- 14) เครื่องคอมพิวเตอร์สำหรับวิเคราะห์ข้อมูล (HP Pavilion x360 Core i7 8th Gen, Installed RAM 24.0 GB)
- 15) หลอดไมโครเซ็นตริฟิวก์ (microcentrifuge tube) ขนาด 0.2 ml และ 1.5 ml
- 16) ปิเปตทิป (Pipette Tip) ขนาด 10 μL , 200 μL และ 1000 μL
- 17) พีซีอาร์เพลท (96-well PCR Plate for ABI cyclers, half skirted)
- 18) แผ่นซิลิโคนปิดเพลท (MicroAmp™ 96-Well Full Plate Cover)
- 19) ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป Qiagen DNeasy Blood & Tissue และ QIAamp DNA Stool Mini Kit

- 20) ชุดเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส (Qiagen Type-it® Microsatellite PCR Kit)
- 21) ไพรเมอร์ติดสีฟลูออเรสเซนต์ (fluorescent primer)
- 22) ขนาดดีเอ็นเอมาตรฐาน (GeneScan™ 600 LIZ™ dye Size Standard v2.0)
- 23) ซอฟต์แวร์สำหรับวิเคราะห์แอลลีล (GeneMapper® V5)
- 24) ซอฟต์แวร์สำหรับวิเคราะห์ค่าสถิติเฉพาะ ได้แก่ GenAEx 6.503, Cervus 3.0.6, Genepop 4.7.x, Familas Version 3.3.1 และ Populations-1.2.32
- 25) คอมพิวเตอร์สำหรับใช้วิเคราะห์ผล (HP Pavilion x360 Core i7 8th Gen)

3.2 ขั้นตอนดำเนินการวิจัย

3.2.1 ตัวอย่างเลือดที่ใช้ในการศึกษาวิจัย

ผู้วิจัยได้ตรวจสอบบัญชีแหล่งที่มาของตัวอย่างเลือดจากศูนย์นิติวิทยาศาสตร์สัตว์ป่า สำนักอนุรักษ์สัตว์ป่า กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช ได้รวบรวมไว้ตั้งแต่ปี 2555-2565 มีจำนวนทั้งสิ้น 116 ตัวอย่าง เป็นตัวอย่างประเภทเลือด ชี้นื้อ ขน และมูล ที่ได้จากตัวอย่างเลือด ในกรงเลี้ยงของภาคเอกชนของประเทศไทยที่แจ้งครอบครองถูกต้องตามกฎหมายทั้งหมด 13 แห่ง จำนวน 100 ตัวอย่าง (ใช้รหัส A ถึง M แทนชื่อสถานที่ครอบครองเลือดของภาคเอกชน) (ตารางที่ 1) ตัวอย่างเลือดของกลางที่สิ้นสุดคดีแล้วจำนวน 11 ตัวอย่าง และตัวอย่างเลือดที่ไม่ทราบแหล่งที่มาจำนวน 5 ตัวอย่าง รายละเอียดตัวอย่างเพิ่มเติมตามภาคผนวก ก ตารางผนวกที่ ก-1 นอกจากนี้ยังมีตัวอย่างเลือดจากเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง ซึ่งใช้เป็นตัวแทนประชากรเลือดที่มีการกระจายพันธุ์ในธรรมชาติของประเทศไทย โดยได้รับความอนุเคราะห์ตัวอย่างจากกลุ่มงานวิจัย สัตว์ป่า สำนักอนุรักษ์สัตว์ป่า กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช ซึ่งได้เก็บรวบรวมไว้เมื่อปี 2562-2563 จำนวนทั้งหมด 24 ตัวอย่าง เป็นตัวอย่างประเภทมูล และขน รายละเอียดตัวอย่างเพิ่มเติมตามภาคผนวก ก ตารางผนวกที่ ก-2

สำหรับตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ประกอบด้วย ตัวอย่างเลือดในกรงเลี้ยง จำนวน 100 ตัวอย่าง ตัวอย่างเลือดของกลางที่สิ้นสุดคดีจำนวน 11 ตัวอย่าง รวมเป็น 111 ตัวอย่าง แบ่งเป็นตัวอย่างจากเลือดจากเพศผู้จำนวน 47 ตัวอย่าง ตัวอย่างจากเลือดจากเพศเมียจำนวน 45 ตัวอย่าง และตัวอย่างเลือดที่ไม่ระบุเพศจำนวน 19 ตัวอย่าง รวมกับตัวอย่างเลือดที่ใช้เป็นตัวแทนประชากรเลือดในธรรมชาติของประเทศไทยจำนวน 24 ตัวอย่าง ดังนั้น จึงมีตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาวิจัยทั้งหมด 135 ตัวอย่าง ซึ่งผู้วิจัยได้นำตัวอย่างเหล่านี้มาสกัดสารพันธุกรรมเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลพันธุกรรมในการศึกษาต่อไป

ตารางที่ 1 แสดงแหล่งที่มาของเลือดดาวในกรงเลี้ยงที่ใช้เป็นตัวอย่างในการศึกษา

ลำดับ	สถานที่ครอบครอง	จังหวัด	ภาค	จำนวนตัวอย่าง
1	A	สุราษฎร์ธานี	ใต้	4
2	B	ชัยนาท	กลาง	2
3	C	ปัตตานี	ใต้	2
4	D	มุกดาหาร	ตะวันออกเฉียงเหนือ	25
5	E	สุราษฎร์ธานี	ใต้	10
6	F	นครราชสีมา	ตะวันออกเฉียงเหนือ	3
7	G	อุบลราชธานี	ตะวันออกเฉียงเหนือ	19
8	H	ชลบุรี	ตะวันออก	2
9	I	ชลบุรี	ตะวันออก	2
10	J	สมุทรปราการ	กลาง	20
11	K	ชลบุรี	ตะวันออก	1
12	L	นครราชสีมา	ตะวันออกเฉียงเหนือ	8
13	M	กาญจนบุรี	ตะวันตก	2
รวม				100

3.2.2 การคัดกรองเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์เบื้องต้นจากการตรวจเอกสาร

การศึกษาวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยเลือกการคัดกรองเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ที่เหมาะสมกับเลือดดาวด้วยวิธี Cross- species amplification จากการตรวจเอกสารบทความวิจัยที่ศึกษาเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ของสัตว์ตระกูลแมว (Felidae) ได้แก่ แมวบ้าน (*Felis catus*) และกลุ่มแมวขนาดใหญ่ (Big cats) ในสกุล *Panthera* spp. ซึ่งมีทั้งหมด 5 ชนิด ได้แก่ เสือโคร่ง (*Panthera tigris*) เสือดาว (*Panthera pardus*) เสือจากัวร์ (*Panthera onca*) สิงโต (*Panthera leo*) และเสือดาวหิมะ (*Panthera uncia*) ร่วมกับการคัดเลือกจากเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์เสือโคร่งที่ใช้ในการตรวจพิสูจน์ในงานนิติวิทยาศาสตร์ ของศูนย์นิติวิทยาศาสตร์สัตว์ป่า กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช โดยคัดเลือกเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ที่มีจำนวนไม่น้อยกว่า 4 แอลลิล และเป็นเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ที่มีจำนวนซ้ำตั้งแต่ 4-5 ซ้ำในแต่ละชุด (Tetranucleotide repeat หรือ Pentanucleotide repeat) ได้จำนวนทั้งหมด 51 เครื่องหมาย จากงานศึกษาวิจัยจำนวน 13 เรื่อง (Corner et al., 2019; Hyun et al., 2021; Mondol et al., 2009; Mondol et al., 2015;

Mondol et al., 2012; Pandey et al., 2021; Sharma et al., 2008; Singh et al., 2022; Wu et al., 2009; Xu et al., 2005; Zhang et al., 2006; Zhao et al., 2020; ZOU et al., 2015) และเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์สำหรับจำแนกเพศเสือโคร่งจำนวน 1 เครื่องหมาย ซึ่งศูนย์นิติวิทยาศาสตร์สัตว์ป่าใช้ในการตรวจระบุเพศเสือโคร่ง (McEwing et al., 2012) รายละเอียดเพิ่มเติมตามภาคผนวก ข ตารางผนวกที่ ข-1

3.2.3 การคัดกรองเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ในห้องปฏิบัติการ

เนื่องจากการศึกษาครั้งนี้เป็นการวิเคราะห์เครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ด้วยเทคนิค Capillary Electrophoresis (CE) ด้วยเครื่อง Applied Biosystems® 3500xL Genetic Analyzer ซึ่งติดตั้งด้วย Applied Biosystems™ DS-33 Matrix Standard Kit Dx (Dye Set G5) ดังนั้นเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ที่รองรับการใช้งานด้วยเครื่องดังกล่าวจึงสามารถตรวจจับสีฟลูออเรสเซนต์ได้สูงสุด 5 ชนิด ได้แก่ 6-FAM™ (สีน้ำเงิน), VIC™ (สีเขียว), NED™ (สีเหลือง) PET™ (สีแดง) และ LIZ™ (สีส้ม) ทำให้การสังเคราะห์เครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์มีค่าใช้จ่ายในแต่ละเครื่องหมายค่อนข้างสูง ผู้วิจัยจึงคัดเลือกเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์โดยพิจารณาจากเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ของเสือโคร่งที่ศูนย์นิติวิทยาศาสตร์สัตว์ป่ามีอยู่แล้วเป็นอันดับแรก ซึ่งผ่านการคัดเลือกเบื้องต้นในข้อ 3.2.2 จำนวน 6 เครื่องหมาย ได้แก่ msF41, msFCA391, msFCA441, msFCA453, Pati20 และ PTZF นอกจากนี้ยังได้คัดเลือกเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์เพิ่มเติมจากการคัดเลือกเบื้องต้นอีกจำนวน 19 เครื่องหมาย ได้แก่ F42, F85, FCA272, Fca742a, msF115, Pan3A2, Pan4A2, Pan7A1, PONCA1, PONCB3, PONCB4, PONCC1, PONCD1, PONCD2, PONCD3, PONCD4, PONCE1, PONCE3 และ PttD5 รวมเป็น 25 เครื่องหมาย โดยเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ที่มีขนาดผลิตภัณฑ์ใกล้เคียงกันจะถูกติดด้วยสีฟลูออเรสเซนต์ที่แตกต่างกันให้ได้มากที่สุด โดยติดสีฟลูออเรสเซนต์ที่ด้านปลาย 5' ของ Forward primer (ตารางที่ 2) เพื่อประโยชน์ในการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการแบบมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ (Multiplex PCR) ซึ่งทำให้ประหยัดเวลาและค่าใช้จ่ายเพิ่มขึ้น

ในการคัดกรองเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ในห้องปฏิบัติการนี้จะวิเคราะห์ด้วยวิธีซิงเกิลเพล็กซ์พีซีอาร์ (SinglePlex PCR) กับตัวอย่างเลือดจำนวน 28 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 20.74 ของตัวอย่างทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษาวิจัย โดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรมข้างต้น ทั้งหมด 25 เครื่องหมาย เพื่อตรวจสอบระยะห่างของแต่ละแอลลีลในแต่ละเครื่องหมาย โดยแต่ละแอลลีลควรมีระยะห่างเท่า ๆ กัน และไม่มีการซ้อนทับกันของขนาดแอลลีลที่แตกต่างกัน ให้พีคที่คมชัด โดยอ่านผลจากซอฟต์แวร์ GeneMapper® V5 ร่วมกับการพล็อตกราฟขนาดความยาวของแอลลีลที่เครื่องอ่านได้

ตารางที่ 2 แสดงเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์และชนิดสีฟลูออเรสเซนต์ที่ใช้ในการคัดกรอง
เครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ในห้องปฏิบัติการ

เครื่องหมาย (Locus)	สีฟลูออเรสเซนต์ (Fluorescent label)	ช่วงความยาว (bp)	ชนิดสัตว์ ที่ทดสอบ	เอกสารอ้างอิง
F42	VIC	226 – 250	เสือดาว	(Mondol et al., 2009)
F85	NED	150 – 170	เสือดาว	(Pandey et al., 2021)
FCA272	NED	100 – 130	เสือดาว	(Singh et al., 2022)
Fca742a	VIC	191 – 207	เสือดาว	(Pandey et al., 2021)
msF115	6-FAM	158 – 174	เสือดาว	(Mondol et al., 2012)
msF41*	6-FAM	102 – 122	เสือดาว	(Mondol et al., 2012)
msFCA391*	PET	128 – 156	เสือดาว	(Mondol et al., 2015)
msFCA441*	PET	94 – 118	เสือดาว	(Mondol et al., 2015)
msFCA543*	VIC	70 – 90	เสือดาว	(Mondol et al., 2015)
Pan3A2	6-FAM	202 – 214	เสือดาว	(Hyun et al., 2021)
Pan4A2	PET	138 – 162	เสือดาว	(Hyun et al., 2021)
Pan7A1	NED	165 – 185	เสือดาว	(Hyun et al., 2021)
Pati20*	6-FAM	247 – 279	เสือโคร่ง	(Wu et al., 2009)
PONCA1	NED	222 – 250	เสือดากัวร์	(Corner et al., 2019)
PONCB3	NED	277 – 306	เสือดากัวร์	(Corner et al., 2019)
PONCB4	PET	250 – 268	เสือดากัวร์	(Corner et al., 2019)
PONCC1	VIC	222 – 249	เสือดากัวร์	(Corner et al., 2019)
PONCD1	6-FAM	328 – 347	เสือดากัวร์	(Corner et al., 2019)
PONCD2	6-FAM	158 – 175	เสือดากัวร์	(Corner et al., 2019)
PONCD3	NED	128 – 150	เสือดากัวร์	(Corner et al., 2019)
PONCD4	NED	367 – 396	เสือดากัวร์	(Corner et al., 2019)
PONCE1	VIC	327 – 360	เสือดากัวร์	(Corner et al., 2019)
PONCE3	VIC	129 – 154	เสือดากัวร์	(Corner et al., 2019)
PttD5	6-FAM	235 – 259	เสือดาว	(Pandey et al., 2021)
PTZF*	6-FAM	138 / 150	เสือโคร่ง	(McEwing et al., 2012)

* หมายถึง เครื่องหมายพันธุกรรมที่ใช้ในการตรวจพิสูจน์พันธุ์กรรมเสือโคร่งในห้องปฏิบัติการของ

ศูนย์นิติวิทยาศาสตร์สัตว์ป่า กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช

3.2.4 ขั้นตอนการวิเคราะห์ตัวอย่างในห้องปฏิบัติการ

1) สกัดสารพันธุกรรมจากตัวอย่างเลือดด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป Qiagen DNeasy® Blood & Tissue Kit กับตัวอย่างประเภทเลือด ขึ้นเนื้อ และขน ส่วนตัวอย่างประเภทมูลจะใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ Qiagen QIAamp® DNA Stool Mini Kit โดยวิธีการและขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเออ้างอิงตามคู่มือของแต่ละผลิตภัณฑ์

2) ตรวจวัดปริมาณและคุณภาพของสารพันธุกรรมที่ได้จากการสกัดด้วยเครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรม (Thermo Scientific™ NanoDrop Lite Spectrophotometer) ได้แก่ ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (ng/μl) และความบริสุทธิ์ของสารพันธุกรรมที่สกัดได้ (A260/280)

3) นำสารพันธุกรรมที่ได้มาเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ (Polymerase Chain Reaction; PCR) กับเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ที่คัดเลือกได้ทั้งหมด ด้วยชุดเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอร์ Qiagen Type-it® Microsatellite PCR Kit การเตรียมส่วนผสมปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ และการตั้งโปรแกรมในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม รุ่น Applied Biosystems™ VeritiPro Thermal Cycler ดังนี้

การเตรียมส่วนผสมปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ด้วยชุดเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอร์ Qiagen Type-it® Microsatellite PCR Kit ปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร (μl) ต่อปฏิกิริยาประกอบด้วย

2x Type-it Multiplex PCR Master Mix	ปริมาตร	12.5	μl
10x primer mix (2 μM ในแต่ละเครื่องหมาย)	ปริมาตร	2.5	μl
RNase-free water	ปริมาตร	3	μl
5x Q-Solution	ปริมาตร	5	μl
สารพันธุกรรม (> 10 ng)	ปริมาตร	2	μl

การตั้งโปรแกรมในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR condition) รุ่น Applied Biosystems™ VeritiPro Thermal Cycler

ขั้นที่ 1	Initial heat activation	5	นาที	95	°C
ขั้นที่ 2 *	Denaturation	30	วินาที	95	°C
ขั้นที่ 3 *	Annealing	90	วินาที	57	°C
ขั้นที่ 4 *	Extension	30	วินาที	72	°C
ขั้นที่ 5	Final extension	30	นาที	60	°C

* ขั้นที่ 2-4 ทำซ้ำทั้งหมด 28 รอบ

4) วิเคราะห์ขนาดผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค Capillary Electrophoresis (CE) ด้วยเครื่อง Applied Biosystems® 3500xL Genetic Analyzer โดยใช้ขนาดดีเอ็นเอมาตรฐานชนิด GeneScan™ 600 LIZ™ Size Standard v2.0 และวิเคราะห์ขนาดผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอด้วยซอฟต์แวร์ GeneMapper® V5

3.2.4 การทดลองวิเคราะห์เครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์แบบมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์

สำหรับการทดลองวิเคราะห์เครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์แบบมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ จะทดลองกับเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.2.3 มาวิเคราะห์กับตัวอย่างเลือดวทที่เหลือทั้งหมดจำนวน 107 ตัวอย่าง โดยจัดกลุ่มเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ที่ให้ช่วงขนาดของ แอลลีลที่มีขนาดไม่ซ้อนทับกันและติดสปีฟลูออเรสเซนซ์ชนิดเดียวกัน หรือเครื่องหมายที่มีขนาดของ แอลลีลซ้อนทับกันแต่ติดสปีฟลูออเรสเซนซ์ต่างชนิดกันไว้ในกลุ่มเดียวกัน เนื่องจากการวิเคราะห์แบบ มัลติเพล็กซ์พีซีอาร์นั้น ในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์จะใส่เครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ (primer) รวมกันมากกว่าหนึ่งเครื่องหมาย เพื่อให้สามารถวิเคราะห์เครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ หลายเครื่องหมายได้ในครั้งเดียวกัน โดยใช้โปรแกรมเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR condition) เหมือนกัน อย่างไรก็ตาม แต่ละเครื่องหมายมีความไว (sensitivity) ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ แตกต่างกัน ดังนั้น จึงจำเป็นต้องมีการทดลองปรับเพิ่ม-ลด ส่วนผสมปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ในส่วน primer mix (2 μ M ในแต่ละเครื่องหมาย) โดยพิจารณาจากความสูงของพีค (peak) ที่ได้จากการ วิเคราะห์ผลในแต่ละครั้ง ซึ่งความสูงของพีคที่ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์แบบ มัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ในแต่ละเครื่องหมายควรจะมีค่าสูงใกล้เคียงกัน

3.2.5 การตรวจสอบประสิทธิภาพของเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์

การตรวจสอบประสิทธิภาพของเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ที่คัดเลือกได้นั้น นอกจาก การพิจารณาขนาดของขนาดแอลลีลแล้ว ยังต้องพิจารณาความถี่ของแอลลีล (Allele frequency) ในแต่ละเครื่องหมาย ซึ่งควรจะมีค่าความถี่ของแอลลีลเท่า ๆ กันตามสมมูลของฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก (Hardy-Weinberg Equilibrium; HWE) นอกจากนี้ ต้องทดสอบความไม่สมดุลของลิงเกจ (Linkage Disequilibrium; LD) ของแต่ละเครื่องหมาย จำนวนเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ขั้นต่ำที่ใช้ในการ ตรวจสอบพิสูจน์เพื่อระบุตัว (non-exclusion probability (Identity); NE-I) การระบุตัวระหว่างพี่น้อง (non-exclusion probability (sib identity); NE-SI) การตรวจสอบพิสูจน์ความสัมพันธ์ทางสายเลือด ระหว่าง พ่อ-แม่-ลูก (Parentage testing) ในกรณีต่าง ๆ ได้แก่ First Parent (non-exclusion probability; NE-1P), Second Parents (non-exclusion probability; NE-2P) และ Pair Parents (non-

exclusion probability; NE-PP) รายละเอียดเพิ่มเติมกรณีการตรวจพิสูจน์ความสัมพันธ์ระหว่าง พ่อ-แม่-ลูก กรณีต่าง ๆ ดังกล่าว อธิบายไว้ในนิยามศัพท์ข้อที่ 1.5.8 ทั้งนี้ การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ ดังกล่าวจะใช้ข้อมูลแอลลีลที่ได้จากวิเคราะห์ผลจากตัวอย่างเลือดจากเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ที่ผ่านการคัดเลือกในข้อ 3.2.3 และวิเคราะห์ค่าสถิติโดยใช้ซอฟต์แวร์ GenAEx 6.503, Cervus 3.0.6 และ Genepop 4.7.x

(1) สูตรที่ใช้ในการคำนวณความถี่ของแอลลีล (Allele frequency) (Wright, 1931)

$$p = \frac{2(AA) + (Aa)}{2N}$$

$$q = \frac{2(aa) + (Aa)}{2N}$$

โดยที่

N คือ จำนวนเลือด

p คือ ความถี่ของแอลลีล A

q คือ ความถี่ของแอลลีล a

$$p + q = 1$$

(2) สูตรที่ใช้ในการคำนวณความถี่ของแอลลีลที่คาดหวังตามสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก (Expected allele frequency) (Hardy, 1908; Weinberg, 1908)

$$P^2 + 2pq + q^2 = 1$$

โดยที่

p คือ ความถี่ของแอลลีล A

q คือ ความถี่ของแอลลีล a

P^2 คือ ความถี่ของจีโนไทป์แบบ homozygous (AA)

$2pq$ คือ ความถี่ของจีโนไทป์แบบ heterozygous (Aa)

q^2 คือ ความถี่ของจีโนไทป์แบบ homozygous (aa)

การทดสอบสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก (Hardy-Weinberg Equilibrium; HWE) โดยใช้วิธี Chi-square test (χ^2) เพื่อตรวจสอบอัตราส่วนของจีโนไทป์ที่สังเกตได้แตกต่างจากค่าคาดหวังหรือไม่

(3) การทดสอบสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก (Hardy-Weinberg Equilibrium; HWE) (Emigh, 1980; Hardy, 1908; Pearson, 1900; Weinberg, 1908)

$$\chi^2 = \sum \frac{(O-E)^2}{E}$$

โดยที่

O คือ จำนวนที่สังเกตได้ของจีโนไทป์แต่ละประเภท

E คือ จำนวนที่คาดหวังของจีโนไทป์แต่ละประเภทตามสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก

หากค่า *p-value* ที่ได้จากการทดสอบมีค่าต่ำกว่าระดับนัยสำคัญ 0.05 จะปฏิเสธสมมติฐานว่าอยู่ในสมดุลของฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก

(4) การทดสอบความไม่สมดุลของลิงเกจ (Linkage Disequilibrium; LD) โดยใช้วิธี Chi-square test (χ^2) (Slatkin, 2008)

$$\chi^2 = \sum \frac{(O-E)^2}{E}$$

โดยที่

O คือ ความถี่ที่สังเกตได้ของแต่ละจีโนไทป์

E คือ ความถี่ที่คาดหวังของแต่ละจีโนไทป์

หากค่า *p-value* ที่ได้จากการทดสอบมีค่าต่ำกว่าระดับนัยสำคัญ 0.05 แสดงว่าแอลลีลของเครื่องหมายที่ทดสอบมีความเชื่อมโยงกันอย่างมีนัยสำคัญ

หากค่า *p-value* ที่ได้จากการทดสอบมีค่ามากกว่าหรือเท่ากับระดับนัยสำคัญ 0.05 แสดงว่าแอลลีลของเครื่องหมายที่ทดสอบแยกออกจากกันอย่างอิสระ

(5) การคำนวณค่า NE-I (non-exclusion probability (Identity))

(5.1) สูตรคำนวณค่า NE-I (non-exclusion probability (Identity))

ของแต่ละเครื่องหมาย (locus) (Waits et al., 2001)

$$NE-I = \sum_{i=1}^n p_i^4 + \sum_{i=1}^n \sum_{j \neq i} 2p_i^2 p_j^2$$

โดยที่

p_i คือ ความถี่ของแอลลีลที่ i

n คือ จำนวนแอลลีลที่พบในประชากร

(5.2) สูตรคำนวณค่า $NE-I_{combined}$ (Combined non-exclusion probability Identity)) ของทุกเครื่องหมายรวมกัน (locus) (Waits et al., 2001)

$$NE-I_{combined} = \prod_{l=1}^L NE-I_l$$

โดยที่

L คือ จำนวนเครื่องหมาย (locus) ที่ใช้ในการวิเคราะห์

$NE-I_l$ คือ ค่า non-exclusion probability (Identity) ของแต่ละเครื่องหมาย (locus)

$\prod$ คือ การคูณค่าทั้งหมดเข้าด้วยกัน

$NE-I_{combined}$ มีค่าสูง มีโอกาสสูงที่เสือดาวสองตัวในประชากรจะมี จีโนไทป์เหมือนกันทุกเครื่องหมาย (locus) (ประชากรมีความ หลากหลายทางพันธุกรรมต่ำ)

$NE-I_{combined}$ มีค่าต่ำ มีโอกาสต่ำที่เสือดาวสองตัวจะมีจีโนไทป์เหมือนกัน ทุกเครื่องหมาย (locus) (ประชากรมีความหลากหลายทาง พันธุกรรมสูง)

(6) สูตรคำนวณค่า NE-SI (non-exclusion probability (Sib Identity)) ของแต่ละเครื่องหมาย (locus) (Evet & Weir, 1998; Weir, 1996)

$$NE-SI = \sum_{i=1}^n (p_i^4 + 2p_i^3(1 - p_i) + 3p_i^2(1 - p_i)^2)$$

โดยที่

p_i คือ ความถี่ของแอลลีลที่ i

n คือ จำนวนแอลลีลที่พบในประชากร

(7) สูตรคำนวณค่า NE-SI_{combined} (Combined non-exclusion probability (Sib Identity)) รวมทุกเครื่องหมาย (locus) (Evet & Weir, 1998; Weir, 1996)

$$NE-SI_{combined} = \prod_{l=1}^L NE-SI_l$$

โดยที่

L คือ จำนวนเครื่องหมาย (locus) ที่ใช้ในการวิเคราะห์

$\prod$ คือ การคูณค่าทั้งหมดเข้าด้วยกัน

$NE-SI_l$ คือ ค่า non-exclusion probability (Sib Identity) ของแต่ละเครื่องหมาย (locus)

$NE-SI_{combined}$ มีค่าสูง (เข้าใกล้ 1) มีโอกาสสูงที่พี่น้องจะมีจีโนไทป์ที่เหมือนกันทุกเครื่องหมาย (locus) ไม่สามารถแยกแยะความแตกต่างระหว่างพี่น้องได้

$NE-SI_{combined}$ มีค่าต่ำ (เข้าใกล้ 0) มีโอกาสต่ำที่พี่น้องจะมีจีโนไทป์ที่เหมือนกันทุกเครื่องหมาย (locus) จึงสามารถแยกแยะความแตกต่างระหว่างพี่น้องได้ง่าย

(8) สูตรคำนวณค่า NE -1P (non-exclusion probability (first parent))
แต่ละเครื่องหมาย (locus) (Jamieson & CS Taylor, 1997; Kalinowski et al., 2007)

$$NE -1P = \sum_{i=1}^n (p_i^4 + 2p_i^2(1 - p_i)^2)$$

โดยที่

p_i คือ ความถี่ของแอลลีลที่ i

n คือ จำนวนแอลลีลที่พบในประชากร

(9) สูตรคำนวณค่า NE -1P_{combined} (Combined non-exclusion probability (first parent)) รวมทุกเครื่องหมาย (locus) (Jamieson & CS Taylor, 1997; Kalinowski et al., 2007)

$$NE -1P_{combined} = \prod_{l=1}^L NE -1P_l$$

โดยที่

NE -1P คือ ค่า non-exclusion probability (first parent)
ของแต่ละเครื่องหมาย (locus)

L คือ จำนวนเครื่องหมาย (locus) ที่ใช้ในการวิเคราะห์

$\prod$ คือ การคูณค่าทั้งหมดเข้าด้วยกัน

NE -1P_{combined} มีค่าสูง มีโอกาสสูงที่เสือดาวที่ไม่ใช่พ่อหรือแม่ที่แท้จริง
มีจีโนไทป์สอดคล้องกับลูกทุกเครื่องหมาย (locus)

NE -1P_{combined} มีค่าต่ำ มีโอกาสต่ำที่เสือดาวที่ไม่ใช่พ่อหรือแม่ที่แท้จริง
มีจีโนไทป์สอดคล้องกับลูกทุกเครื่องหมาย (locus)

(10) สูตรคำนวณค่า NE -2P (non-exclusion probability (second parent))
ของแต่ละเครื่องหมาย (locus) (Jamieson & CS Taylor, 1997; Kalinowski et al., 2007)

$$NE -2P = \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n p_i^2 p_j^2 \left[1 - \frac{1}{2} \delta_{ij} \right]$$

โดยที่

p_i, p_j คือ ความถี่ของแอลลีลที่ i และ j

n คือ จำนวนแอลลีลที่พบในประชากร

δ_{ij} : delta function = 1 ถ้า $i = j$, = 0 ถ้า $i \neq j$

(11) สูตรคำนวณค่า NE -2P_{combined} (Combined non-exclusion probability (second parent)) รวมทุกเครื่องหมาย (locus) (Jamieson & CS Taylor, 1997; Kalinowski et al., 2007)

$$NE -2P_{combined} = \prod_{l=1}^L NE -2P_l$$

โดยที่

NE -2P คือ ค่า non-exclusion probability (first parent)

ของแต่ละเครื่องหมาย (locus)

L คือ จำนวนเครื่องหมาย (locus) ที่ใช้ในการวิเคราะห์

$\prod$ คือ การคูณค่าทั้งหมดเข้าด้วยกัน

NE -2P_{combined} มีค่าสูง มีโอกาสสูงที่เลือดาวที่ไม่ใช่พ่อหรือแม่ที่แท้จริง
มีจีโนไทป์สอดคล้องกับลูกทุกเครื่องหมาย (locus)

NE -2P_{combined} มีค่าต่ำ มีโอกาสต่ำที่เลือดาวที่ไม่ใช่พ่อหรือแม่ที่แท้จริง
มีจีโนไทป์สอดคล้องกับลูกทุกเครื่องหมาย (locus)

(12) สูตรคำนวณค่า NE -PP (non-exclusion probability (parent pair))

ของแต่ละเครื่องหมาย (locus) (Jamieson & CS Taylor, 1997; Kalinowski et al., 2007)

$$NE -PP = \sum_{i=1}^n p_i^2 \left(\sum_{j=1}^n p_j^2 \right) - \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n \left(\frac{1}{2} \cdot p_i^2 \cdot p_j^2 \cdot (1 + \delta_{ij}) \right)$$

โดยที่

p_i คือ ความถี่ของแอลลีลที่ i

n คือ จำนวนแอลลีลที่พบในประชากร

δ_{ij} : delta function = 1 ถ้า $i = j$, = 0 ถ้า $i \neq j$

(13) สูตรคำนวณค่า NE -PP_{combined} (Combined non-exclusion probability (parent pair)) รวมทุกเครื่องหมาย (locus) (Jamieson & CS Taylor, 1997; Kalinowski et al., 2007)

$$NE -PP_{combined} = \prod_{l=1}^L NE -PP_l$$

โดยที่

NE -PP คือ ค่า non-exclusion probability (parent pair)

ของแต่ละเครื่องหมาย (locus)

L คือ จำนวนเครื่องหมาย (locus) ที่ใช้ในการวิเคราะห์

$\prod$ คือ การคูณค่าทั้งหมดเข้าด้วยกัน

NE -PP_{combined} มีค่าสูง มีโอกาสสูงที่เลือดาวที่ไม่ใช่พ่อและแม่ที่แท้จริง มีจีโนไทป์สอดคล้องกับลูกทุกเครื่องหมาย (locus)

NE -PP_{combined} มีค่าต่ำ มีโอกาสต่ำที่เลือดาวที่ไม่ใช่พ่อและแม่ที่แท้จริง มีจีโนไทป์สอดคล้องกับลูกทุกเครื่องหมาย (locus)

(14) สูตรคำนวณค่า H_O (Observed Heterozygosity) (Hartl et al., 1997)

$$H_O = \frac{N_H}{N}$$

โดยที่

H_O คือ ค่าเฮเทอโรไซโกซิตีที่สังเกตได้

N_H คือ จำนวนเลือดดาวที่มีจีโนไทป์แบบ heterozygous
ในแต่ละเครื่องหมาย (loci)

N คือ จำนวนเลือดดาวทั้งหมดที่ใช้ในการวิเคราะห์

(15) สูตรคำนวณค่า H_E (Expected Heterozygosity) (Hartl et al., 1997)

$$H_E = 1 - \sum p_i^2$$

โดยที่

H_E คือ ค่าเฮเทอโรไซโกซิตีที่คาดหวัง

p_i คือ ความถี่ของแอลลีลที่ i

(16) สูตรคำนวณค่า PIC (Polymorphic Information Content) (Botstein et al., 1980)

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2$$

โดยที่

p_i คือ ความถี่ของแอลลีลที่ i

n คือ จำนวนแอลลีลที่พบในเครื่องหมาย (locus) นั้น

PIC มีค่าสูง เครื่องหมาย (locus) นั้น มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง

PIC มีค่าต่ำ เครื่องหมาย (locus) นั้น มีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำ

(17) สูตรคำนวณค่า F_{IS} (Expected Heterozygosity) (Weir & Cockerham, 1984)

$$\hat{f} = \frac{MSI - MSG}{MSI + (\bar{n} - 1)MSG}$$

โดยที่

$\hat{f}$ คือ ค่าประมาณของ F_{IS}

MSI คือ ค่า mean squares ภายในแต่ละประชากรย่อยระหว่าง
homozygotes และ heterozygotes คำนวณจากสูตร

$$MSI = \frac{1}{n - 1} \sum_{i=1}^k n_i (p_i - \bar{p})^2$$

โดยที่ p_i คือ ความถี่ของแอลลีลในประชากรย่อยที่ i

k คือ จำนวนประชากรย่อยทั้งหมด

n_i คือ จำนวนประชากรย่อยที่ i

$\bar{p}$ คือ ค่าความถี่แอลลีลเฉลี่ยในประชากรทั้งหมด

MSG คือ ค่า mean squares ภายในประชากร (ความแปรปรวนของจีโนไทป์)
คำนวณจากสูตร

$$MSG = \frac{1}{n - k} \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{n_i} (x_{ij} - p_i)^2$$

โดยที่ p_i คือ ความถี่ของแอลลีลในประชากรย่อยที่ i

x_{ij} คือ ค่าแอลลีลของของเสือดาวที่ j ในประชากรย่อยที่ i

F_{IS} มากกว่า 0 มีการผสมแบบเลือดชิด (inbreeding) ในประชากร

F_{IS} เท่ากับ 0 ประชากรอยู่ในสมดุลของฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก

F_{IS} น้อยกว่า 0 ประชากรมีจีโนไทป์แบบ heterozygous มากกว่าที่คาดหวัง
จากสมดุลของฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก

3.2.6 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของตัวอย่างเลือดดาว

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเลือดดาวเพื่อจับคู่เลือดดาวที่น่าจะมีความสัมพันธ์เป็นพ่อ-ลูก หรือ แม่-ลูก โดยใช้ซอฟต์แวร์ Familias Version 3.3.1 ทดสอบค่า LR (Likelihood Ratio) กับเลือดดาวทีละคู่ หากค่า LR ของแต่ละเครื่องหมายน้อยกว่า 1 สนับสนุน H_1 แสดงว่า ปฏิเสธการเป็นพ่อ-ลูก หรือ แม่-ลูก และหากค่า LR ของแต่ละเครื่องหมายมากกว่า 1 แสดงว่า สนับสนุนสมมติฐาน H_0 เลือดดาวคู่นั้นมีความน่าจะเป็นพ่อ-ลูก หรือ แม่-ลูก ทั้งนี้ ค่า LR รวมทุกเครื่องหมายจะต้องมากกว่าจำนวนประชากรเลือดดาวที่ตรวจพิสูจน์ด้วย โดยเลือดดาวในประเทศไทย มีจำนวนประชากรประมาณ 1,000 ตัว และจำนวนประชากรเลือดดาวทั้งหมดทั่วโลกมีจำนวนประชากรประมาณ >700,000 ตัว จากนั้นนำมาสร้างแผนภาพแสดงความสัมพันธ์เลือดดาวที่เป็นคู่ พ่อ-ลูก หรือ แม่-ลูก ร่วมกับข้อมูลสถานที่ครอบครอง (A-M) เพื่อเชื่อมโยงถึงพฤติกรรมที่อาจมีการแลกเปลี่ยนซื้อขาย เลือดดาวระหว่างกรงเลี้ยง ตลอดจนใช้เชื่อมโยงเลือดดาวของกลางกับเลือดดาวในกรงเลี้ยง หรือ เลือดดาวในธรรมชาติของประเทศไทย

สูตรที่ใช้ในการคำนวณค่า Likelihood Ratio (LR) (Marshall et al., 1998; Slate et al., 2000)

$$LR = \frac{P(D|H_0)}{P(D|H_1)}$$

โดยที่

$P(D | H_0)$ คือ ความน่าจะเป็นของข้อมูล (D) ภายใต้สมมติฐาน H_0 (สมมติฐานที่ต้องการทดสอบ ตัวอย่างเช่น เลือดดาวตัวที่ 1 เป็นพ่อของเลือดดาวตัวที่ 2)

$P(D | H_1)$ คือ ความน่าจะเป็นของข้อมูล (D) ภายใต้สมมติฐาน H_1 (สมมติฐานทางเลือก ตัวอย่างเช่น เลือดดาวตัวที่ 1 ไม่ใช่พ่อของเลือดดาวตัวที่ 2)

ตัวอย่างการคำนวณ

ลูกเลือดดาวมีแอลลีล A_1, A_2

เลือดดาวที่คาดว่าน่าจะเป็นพ่อมีแอลลีล A_1, A_3

แม่เลือดดาวมีแอลลีล A_2, A_4

ความถี่แอลลีลในประชากรเลือดดาว คือ

$$f(A1) = 0.3$$

$$f(A2) = 0.2$$

$$f(A3) = 0.4$$

$$f(A4) = 0.1$$

หลักการคำนวณ $P(D | H0)$

ลูกเสือดาวสามารถรับแอลลีล A1 จากพ่อและ A2 จากแม่

ดังนั้น ความน่าจะเป็นที่พ่อจะให้ A1 กับลูก = 50% = 0.5

ความน่าจะเป็นที่แม่จะให้ A2 กับลูก = 50% = 0.5

$$\therefore P(D | H0) = 0.5 \times 0.5 = 0.25$$

หลักการคำนวณ $P(D | H1)$

ลูกเสือดาวต้องได้รับแอลลีล A1 จากบุคคลอื่นที่ไม่ใช่พ่อ (สืมจากประชากร)

ดังนั้น ความน่าจะเป็นที่เสือดาวตัวอื่นให้แอลลีล A1 กับลูก = 30% = 0.3

ความน่าจะเป็นที่แม่เสือดาวให้แอลลีล A2 กับลูก = 50% = 0.5

$$\therefore P(D | H1) = 0.3 \times 0.5 = 0.15$$

คำนวณค่า LR ได้ดังนี้

$$LR = \frac{P(D|H0)}{P(D|H1)}$$

$$LR = \frac{0.25}{0.15} = 1.67$$

3.2.7 การวิเคราะห์ความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของตัวอย่างเสือดาว

วิเคราะห์ความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของตัวอย่างเสือดาวทั้งหมดด้วยซอฟต์แวร์ Populations-1.2.32 ด้วยวิธี Distance Method และสร้างต้นไม้สายวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) แบบ Neighbor Joining (NJ) เพื่อวิเคราะห์ความใกล้ชิดทางพันธุกรรมสำหรับใช้ประกอบการอธิบายความเชื่อมโยงระหว่างประชากรเสือดาวในธรรมชาติ กับประชากรเสือดาวในกรงเลี้ยง รวมถึงความเชื่อมโยงพันธุกรรมระหว่างกรงเลี้ยง และเสือดาวของกลาง

บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

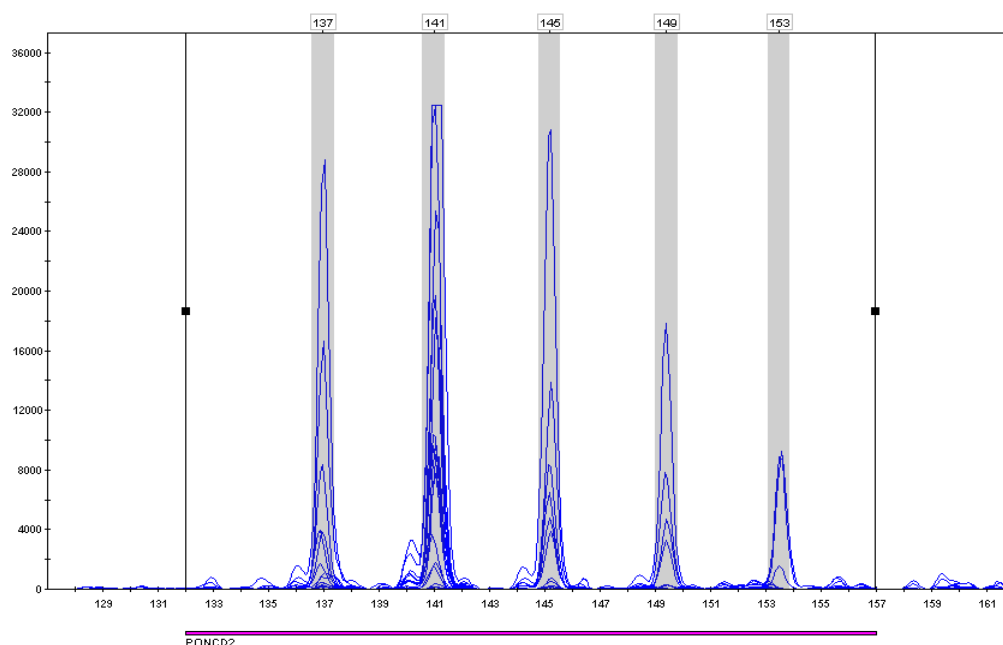
ในส่วนของการวิจัยและการอภิปรายผล แบ่งเป็น 3 ส่วน ตามวัตถุประสงค์ของการศึกษาวิจัย ดังนี้

4.1 การคัดกรองเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ในห้องปฏิบัติการและการทดสอบประสิทธิภาพของเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์

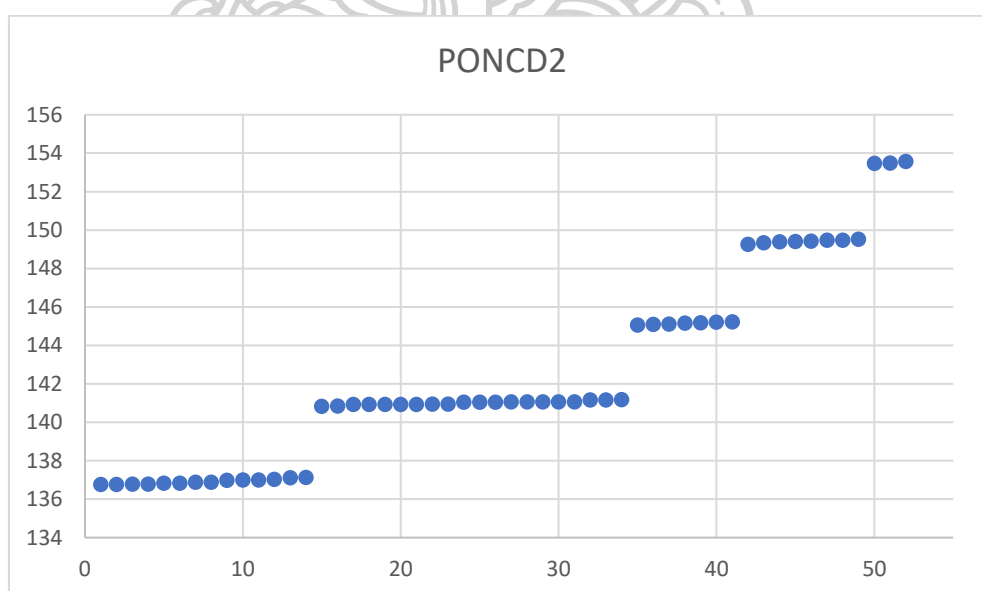
จากการทดสอบเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์จำนวน 25 เครื่องหมายกับตัวอย่างเลือดวาร์ฮัสตัวอย่าง 001-031 ยกเว้นตัวอย่างรหัสที่ 007, 009, และ 017 ซึ่งผู้วิจัยได้คัดออกเนื่องจากเป็นตัวอย่างที่ไม่ทราบแหล่งที่มา รวมตัวอย่างที่ใช้ทดสอบทั้งหมดจำนวน 28 ตัวอย่าง สามารถวิเคราะห์เครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ได้ 22-26 ตัวอย่าง โดยตัวอย่างที่ไม่สามารถวิเคราะห์ผลได้ทุกเครื่องหมาย คือ รหัสตัวอย่าง 002 และ 003 ซึ่งเป็นตัวอย่างมูลที่ไม่ได้เก็บรักษาด้วยน้ำยารักษาสภาพ

4.1.1 การคัดเลือกเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์โดยพิจารณาจากการกำหนดแอลลีล

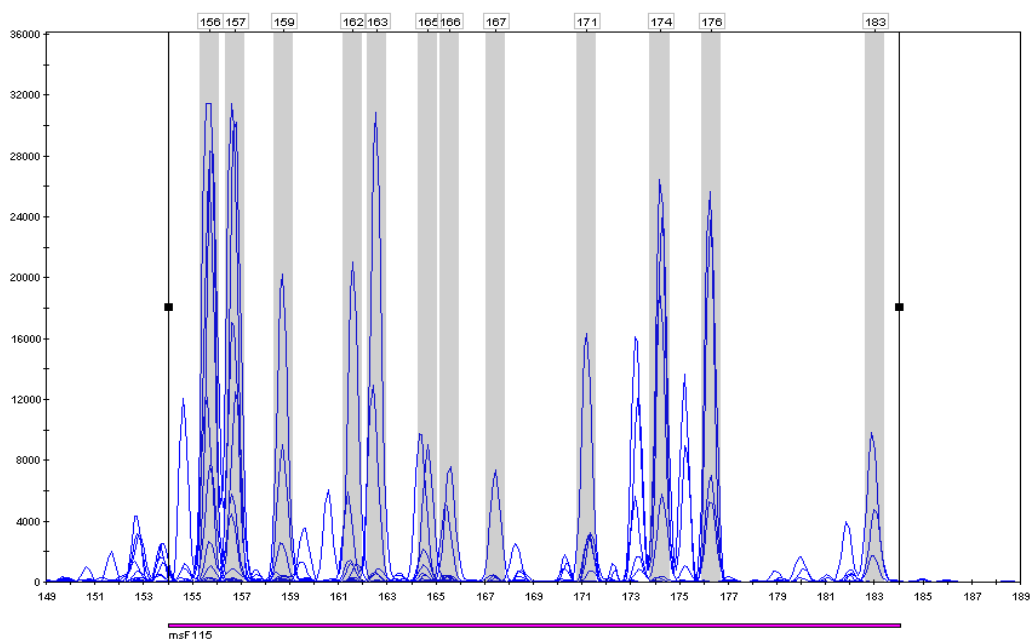
แอลลีลที่ตรวจพบในแต่ละเครื่องหมายมีจำนวน 1-14 แอลลีล โดยปรากฏพิก (peak) ที่มีช่วงระยะห่างระหว่างแอลลีลประมาณ 1-5 bp การกำหนดแอลลีลจะแบ่งตามขนาดของผลิตภัณฑ์ที่วิเคราะห์ได้จากเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ ดังนั้น ขนาดผลิตภัณฑ์ที่แตกต่างกันที่วิเคราะห์ได้จากเครื่องหมายเดียวกันจะถูกกำหนดให้เป็นแอลลีลที่ต่างกัน หรือเรียกว่า การกำหนด bin ซึ่งเป็นขั้นตอนที่สำคัญของการวิเคราะห์ผล โดยจะอ้างอิงจากขนาดผลิตภัณฑ์ที่วิเคราะห์ได้หลาย ๆ ตัวอย่าง การวิเคราะห์เครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์จะแสดงผลในรูปแบบพิก (peak) โดยแกน X แสดงขนาดของผลิตภัณฑ์ที่วิเคราะห์ได้มีหน่วยเป็นคู่เบส (bp) และแกน Y แสดงปริมาณของผลิตภัณฑ์ที่ตรวจวัดได้จากการตรวจจับสีฟลูออเรสเซนซ์มีหน่วยเป็น RFU (Relative Fluorescence Units) ซึ่งเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ที่ดีควรให้ขนาดของแอลลีลที่แม่นยำ (precision) มีระยะห่างระหว่างแอลลีลเป็นช่วงเท่า ๆ กัน และช่วงขนาดของแอลลีลไม่ซ้อนทับกัน (ภาพที่ 16) หรือเมื่อนำขนาดของแอลลีลที่วิเคราะห์ได้มาเรียงลำดับจากน้อยไปมากและพล็อตกราฟ โดยแกน X แสดงจำนวนแอลลีลของตัวอย่างทั้งหมด และแกน Y แสดงขนาดของแอลลีล จะได้กราฟที่เป็นช่วงอันตรภาคชั้นแยกกันอย่างชัดเจน (ภาพที่ 17) ในขณะที่บางเครื่องหมายให้ช่วงขนาดของผลิตภัณฑ์ที่ต่อเนื่องกันทำให้ไม่สามารถใช้ขนาดผลิตภัณฑ์แบ่งแยกแอลลีลที่แตกต่างกันได้ซึ่งจะถูกคัดออก (ภาพที่ 18-19) รูปแบบพิกและกราฟของแต่ละเครื่องหมายสำหรับใช้ในการพิจารณาคัดเลือกเครื่องหมายที่เหมาะสมแสดงในภาคผนวก ค ภาพผนวกที่ ค-1 – ค-48



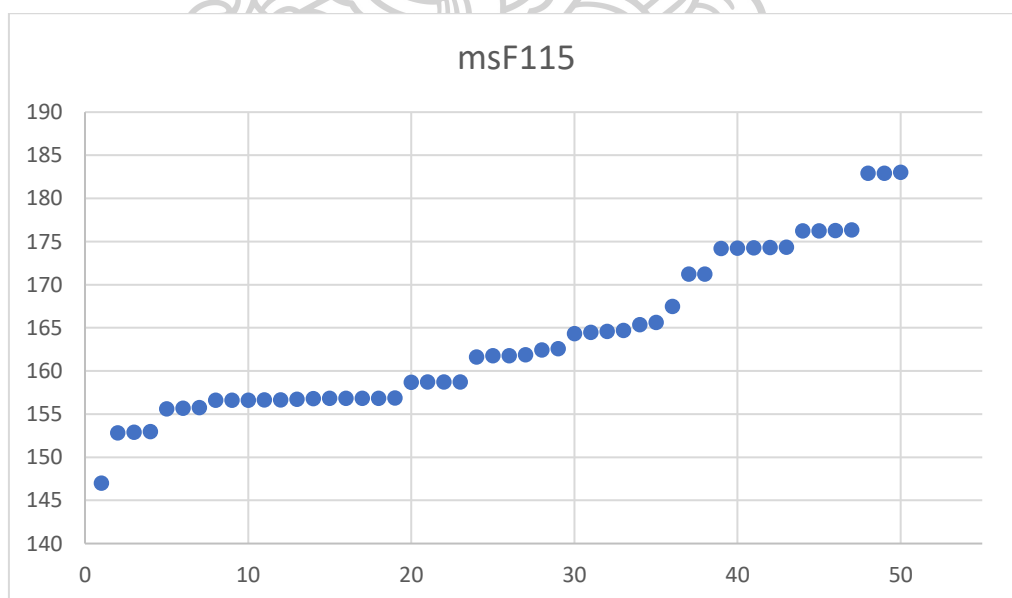
ภาพที่ 16 แสดงตัวอย่างลักษณะการซ้อนทับของพีคและระยะห่างระหว่างขนาดแอลลีลของ
เครื่องหมายไมโครแซตเทลโลด์ที่ดี (เครื่องหมาย PONCD2) ที่ได้จากการวิเคราะห์
ตัวอย่างเลือดดาวในห้องปฏิบัติการจำนวน 26 ตัวอย่าง



ภาพที่ 17 แสดงตัวอย่างลักษณะกราฟจำนวนแอลลีลของตัวอย่างทั้งหมดและขนาดของแอลลีล
ที่เป็นช่วงอันตรภาคขั้นแยกกันอย่างชัดเจนของเครื่องหมายไมโครแซตเทลโลด์ที่ดี
(เครื่องหมาย PONCD2) ที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างเลือดดาวในห้องปฏิบัติการจำนวน
26 ตัวอย่าง (52 แอลลีล)



ภาพที่ 18 แสดงตัวอย่างลักษณะการซ้อนทับของพีคและระยะห่างระหว่างขนาดแอลลีลของ
เครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ที่ถูกคัดออก (เครื่องหมาย msF115) ที่ได้จากการ
วิเคราะห์ตัวอย่างเลือดดาวในหึ่งปฏิบัติการจำนวน 25 ตัวอย่าง



ภาพที่ 19 แสดงตัวอย่างลักษณะกราฟจำนวนแอลลีลของตัวอย่างทั้งหมดและขนาดของแอลลีล
ที่ต่อเนื่องกันของเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ที่ถูกคัดออก (เครื่องหมาย msF115)
ที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างเลือดดาวในหึ่งปฏิบัติการจำนวน 25 ตัวอย่าง (50 แอลลีล)

4.1.2 การคัดเลือกเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์จากรูปแบบชุดซ้ำของนิวคลีโอไทด์

แม้ว่าเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ทั้ง 24 เครื่องหมาย จะผ่านการคัดกรองเบื้องต้นจากการตรวจเอกสาร ซึ่งผู้วิจัยได้คัดเลือกเฉพาะเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ที่มีชุดซ้ำนิวคลีโอไทด์แบบ pentanucleotide repeat และ tetranucleotide repeat ที่มีรายงานการใช้เครื่องหมายเหล่านี้กับเสือดาว หรือสัตว์ในตระกูลแมวขนาดใหญ่มาแล้ว แต่จากผลการทดสอบเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ทั้งหมดในห้องปฏิบัติการพบว่า ระยะห่างระหว่างแอลลีลบางเครื่องหมายสอดคล้องกับรูปแบบการซ้ำของนิวคลีโอไทด์แบบ dinucleotide repeat ได้แก่ F42, FCA272, PONCA1 และ PONCE1 ซึ่งมีระยะห่างระหว่างแอลลีลประมาณ 2 bp หรือบางเครื่องหมายมีขนาดแอลลีลที่ต่อเนื่องกัน ไม่สามารถกำหนดช่วงขนาดของแอลลีลที่แตกต่างกันได้ ได้แก่ msF115, msF41, Pan3A2 และ PONCB3 (ภาคผนวก ค) ผู้วิจัยจึงได้ตรวจสอบรูปแบบชุดซ้ำของนิวคลีโอไทด์อีกครั้งกับข้อมูลจีโนมของเสือดาว รหัสอ้างอิง GCF_024362965.1 โดยใช้กระบวนการทางชีวสารสนเทศ (bioinformatics) ด้วยเทคนิคบลาสต์ (Basic Local Alignment Search Tool; BLAST) และค้นหานิวคลีโอไทด์ที่ซ้ำกันด้วยซอฟต์แวร์ Microsatellite repeats finder โดยดาวน์โหลดข้อมูลจีโนมดังกล่าวจากฐานข้อมูลพันธุกรรมของศูนย์ข้อมูลเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (National Center for Biotechnology Information; NCBI) ผลจากการตรวจสอบชี้ให้เห็นว่า ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ทั้ง 24 เครื่องหมาย มีรูปแบบชุดซ้ำที่ไม่สมบูรณ์ (imperfect nucleotide repeat) ถึง 17 เครื่องหมาย และมีเพียง 7 เครื่องหมายที่มีชุดซ้ำแบบ tetranucleotide repeat ได้แก่ F85, msFCA453, Pan7A1, Pati20, PONCB4, PONCD1 และ PONCD2 ซึ่งมีช่วงแอลลีลที่แตกต่างกันอย่างชัดเจน อย่างไรก็ตาม เครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ที่มีชุดนิวคลีโอไทด์ซ้ำแบบไม่สมบูรณ์ ได้แก่ FCA272, msFCA391, msFCA441, Pan4A2, PONCC1, PONCD3, PONCD4, PONCE1 และ PttD5 ก็มีช่วงแอลลีลที่แตกต่างกันอย่างชัดเจนเช่นเดียวกัน ดังนั้น การตรวจสอบรูปแบบชุดซ้ำของนิวคลีโอไทด์จากข้อมูลจีโนมของเสือดาวเพียง 1 ตัวอย่าง จึงไม่เพียงพอต่อการพิจารณาคัดเลือกเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ที่เหมาะสม (ตารางที่ 3) รายละเอียดขนาดผลิตภัณฑ์และรูปแบบการซ้ำของนิวคลีโอไทด์แบบละเอียดที่ตรวจสอบด้วยกระบวนการทางชีวสารสนเทศแสดงไว้ในภาคผนวก ง

ผลจากการตรวจสอบในข้อ 4.1.1 และ 4.1.2 สามารถคัดเลือกเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ที่เหมาะสมได้ทั้งหมดจำนวน 17 เครื่องหมาย ได้แก่ F42, F85, FCA272, Fca742a, msFCA391, MsFCA441, MsFCA453, Pan4A2, Pan7A1, PONCB4, PONCC1, PONCD1, PONCD2, PONCD3, PONCD4, PONCE1 และ PttD5 โดยเครื่องหมายที่ไม่สามารถกำหนดแอลลีลได้ หรือให้แอลลีลเพียง 1 แอลลีล (monomorphic allele) ได้แก่ Pati20 และ PONCE3 จะถูกคัดออก

ตารางที่ 3 แสดงรูปแบบนิวคลีโอไทด์ที่เป็นชุดซ้ำของเครื่องหมายโมโนโครแซตเทลไลต์ที่ใช้ในการคัดกรองเครื่องหมายในท้องถิ่นกับการกับตัวอย่างเสือดำจำนวน 28 ตัวอย่าง

เครื่องหมาย (Locus)	ประเภทชุดซ้ำ (Nucleotide Repeat)	รูปแบบการซ้ำของชุดนิวคลีโอไทด์ที่ได้	ตำแหน่งผลิตภัณฑ์	รหัสอ้างอิงชิ้นส่วนของจีโนมเสือดำจากฐานข้อมูล NCBI (Accession Number)	ช่วงความยาวผลิตภัณฑ์ที่อ่านได้จากเครื่องวิเคราะห์ผล	จำนวนแฮพล์	จำนวนตัวอย่างที่วิเคราะห์ได้
F42	imperfect	(TTTC) ₃ TC(TTTC) ₅ ...(TTTC) ₁₃	50854231-50854030	NW_026526654.1	231.79- 264.92	7	24
F85	Tetra	(CTTT) ₁₁	21862583-21862722	NW_026526688.1	147.22- 168.21	6	26
FCA272	imperfect	(GTCT) ₄ ...(TTCC) ₁₃	14145871-14146122	NW_026526766.1	114.91- 122.64	5	26
Fca742a	imperfect	(CTTT) ₁₁ C(CTTT) ₃ T(CTT) ₁₆	33425607-33425784	NW_026526766.1	190.66- 220.69	8	24
msF115*	imperfect	(AAGA) ₁₂ ...(AAAG) ₃ ...(AAGA) ₃ G(AGAA) ₃	28131002-28131168	NW_026526677.1	146.98- 183	?	25
msF41*	imperfect	(TTCT) ₁₂ T(TCCT) ₃ (T) ₁₆	75972710-75972594	NW_026526788.1	113.76- 142.69	?	23
msFCA391	imperfect	(ATGG) ₈ G(ATAG) ₁₀	56323557-56323697	NW_026526810.1	140.84- 153.48	4	25
msFCA441	imperfect	(TATC) ₃ ...(CTAT) ₅ AT(CTAC) ₃	48966128-48966035	NW_026526710.1	94.81- 122.84	7	26
msFCA453	Tetra	(TCTA) ₅	44029158-44029096	NW_026526765.1	74.95- 87.69	4	25
Pan3A2*	imperfect	(T) ₈ ...(TTTA) ₃ ...(GA) ₁₀ ...(AGAC) ₄	29289275-29289486	NW_026527013.1	200.79- 204.21	?	25

ตารางที่ 3 แสดงรูปแบบนิวคลีโอไทด์ที่เป็นชุดซ้ำของเครื่องหมายโมโนโครแซตเทลไลต์ที่ใช้ในการคัดกรองเครื่องหมายในท้องถิ่นปฏิบัติการกับตัวอย่างเลือดจำนวน 28 ตัวอย่าง (ต่อ)

เครื่องหมาย (Locus)	ประเภทชุดซ้ำ (Nucleotide Repeat)	รูปแบบการซ้ำของชุดนิวคลีโอไทด์ที่ได้	ตำแหน่งผลิตภัณฑ์	รหัสอ้างอิงชิ้นส่วนของจีโนมเลือด	ช่วงความยาวผลิตภัณฑ์ที่อ่านได้จากเครื่องวิเคราะห์ผล	จำนวนแอสลิล	จำนวน
		จากการตรวจสอบด้วยกระบวนการทางชีวสารสนเทศ (Motif)	ที่ตรวจสอบด้วยกระบวนการทางชีวสารสนเทศ (Position)	จากฐานข้อมูล NCBI (Accession Number)			ตัวอย่างที่วิเคราะห์ได้
Pan4A2	imperfect	(AAC) ₃ ...(AAAC) ₆	39058415-39058560	NW_026527013.1	142.47- 150.3	3	24
Pan7A1	Tetra	(ATAG) ₇	27775794-27775626	NW_026526654.1	166.41- 182.99	5	26
Pati20*	Tetra	(GATA) ₅	5408784- 5409043	NW_026526688.1	255.46- 255.79	1	24
PONCA1*	imperfect	(TTTC) ₁₁ (TC) ₁₅ TT(TA) ₃ (TTTC) ₁₅	70525846- 70525590	NW_026526654.1	281.1- 324.38	14	25
PONCB3*	imperfect	(TCCTT) ₁₁ TCC(TCTT) ₅	57508740- 57508458	NW_026526810.1	279.68- 356.63	?	25
PONCB4	Tetra	(AAGA) ₁₇	85962719- 85962959	NW_026526991.1	221.88- 244.9	6	26
PONCC1	imperfect	(CTTT) ₁₀ ...(TCTT) ₁₃	55187387- 55187643	NW_026526666.1	262.77- 303.74	11	25
PONCD1	Tetra	(AAGG) ₁₁	106670698- 106671016	NW_026526677.1	290.74- 326.2	6	26
PONCD2	Tetra	(AGAA) ₁₁	36625895- 36625788	NW_026526788.1	136.77- 153.57	5	26
PONCD3	imperfect	(CTTTT) ₆ TT(CTTTT) ₂	8198229- 8198316	NW_026526710.1	91.2- 143.02	9	22

ตารางที่ 3 แสดงรูปแบบนิวคลีโอไทด์ที่เป็นชุดซ้ำของเครื่องหมายโมโนโครแซตเทลไลต์ที่ใช้ในการคัดกรองเครื่องหมายในท้องถิ่นกับการกับตัวอย่างเลือดจำนวน 28 ตัวอย่าง (ต่อ)

เครื่องหมาย (Locus)	ประเภทชุดซ้ำ (Nucleotide Repeat)	รูปแบบการซ้ำของชุดนิวคลีโอไทด์ที่ได้	ตำแหน่งผลิตภัณฑ์ ที่ตรวจสอบด้วย การวนการทางชีวสารสนเทศ (Motif)	ตำแหน่งผลิตภัณฑ์ ที่ตรวจสอบด้วย การวนการทางชีวสารสนเทศ (Position)	รหัสอ้างอิงชิ้นส่วนของจีโนมเลือด จากฐานข้อมูล NCBI (Accession Number)	ช่วงความยาวผลิตภัณฑ์ที่อ่านได้จากเครื่องวิเคราะห์ผล	จำนวนแฮพล์ไทป์	จำนวนตัวอย่างที่วิเคราะห์ได้
PONCD4	imperfect	(TTTC) ₄ T(TCCT) ₁₃		62754879- 62754523	NW_026526766.1	368.07- 406.37	10	25
PONCE1	imperfect	(GA) ₄ ...(GT) ₃		7361822- 7362156	NW_026526876.1	323.93- 357.32	10	25
PONCE3*	imperfect	(AAAT) ₄ A(GATA) ₅ GA(TAAA) ₄		13757702- 13757834	NW_026526969.1	117.01- 117.36	1	25
PttD5	imperfect	(GAAA) ₁₂ ...(AAGA) ₃		75642876- 75643119	NW_026527002.1	240.56- 260	5	26

หมายเหตุ ? หมายถึง ไม่สามารถกำหนดแฮพล์ไทป์ได้ * หมายถึง เครื่องหมายโมโนโครแซตเทลไลต์ที่ถูกคัดออก

4.1.3 การทดสอบตัวอย่างที่มีรหัสพันธุกรรมซ้ำกัน (direct-match)

เนื่องจากตัวอย่างเลือดดาวที่นำมาวิเคราะห์ในครั้งนี้มีทั้งตัวอย่างเลือดดาวที่มีชีวิต และไม่มีชีวิต ซึ่งมีการเก็บตัวอย่างมากกว่า 1 ครั้ง ในเลือดดาวตัวเดียวกัน จึงมีโอกาสที่ตัวอย่างจะซ้ำกันได้ ดังนั้น เพื่อเป็นการทดสอบยืนยันว่า ตัวอย่างเลือดดาวที่วิเคราะห์ทั้งหมดไม่มีตัวอย่างเลือดดาวตัวที่ซ้ำกัน โดยการวิเคราะห์เปรียบเทียบข้อมูลพันธุกรรมด้วยซอฟต์แวร์ Familias 3.3.1 ร่วมกับการพิจารณาข้อมูลประวัติเลือดดาวอื่น ๆ ที่ศูนย์นิติวิทยาศาสตร์สตรป้าได้จัดทำฐานข้อมูลไว้ ได้แก่ ชื่อเลือดดาว รหัสไมโครชิพ ชื่อสถานที่เลี้ยง ผลการทดสอบดังกล่าวพบว่า มีตัวอย่างเลือดดาวที่มีรหัสพันธุกรรมซ้ำกันจำนวน 11 คู่ ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ความน่าจะเป็นตัวเดียวกัน >99% โดยมีกรณีรหัสไมโครชิพเหมือนกัน 6 คู่ มาจากสถานที่เลี้ยงเดียวกัน 4 คู่ และ 1 คู่ มีรหัสไมโครชิพและสถานที่เลี้ยงต่างกัน นอกจากนี้ยังพบว่า เลือดดาวที่มาจากสถานที่เลี้ยงต่างกันแต่มีรหัสพันธุกรรมและรหัสไมโครชิพเดียวกัน 3 คู่ ได้แก่ รหัสตัวอย่าง 019-045, 030-043 และ 031-044 แสดงให้เห็นว่า มีการโอนย้ายเลือดดาวระหว่างสถานที่เลี้ยง (ตารางที่ 4) อย่างไรก็ตาม ข้อมูลประวัติที่บันทึกในฐานข้อมูลค่อนข้างสับสน และเลือดดาวตัวเดียวกันสามารถมีไมโครชิพได้มากกว่า 1 รหัส ผู้วิจัยจึงได้คัดตัวอย่างที่มีรหัสพันธุกรรมซ้ำกันทั้ง 11 คู่ จำนวน 11 ตัวอย่าง ได้แก่ ตัวอย่างรหัส 032, 101, 019, 100, 041, 018, 022, 040, 030, 031 และ 102 จากการวิเคราะห์ข้อมูลในขั้นต่อไป

ตารางที่ 4 แสดงคู่ของรหัสตัวอย่างเลือดดาวที่มีพันธุกรรมเหมือนกันทุกเครื่องหมาย

รหัส เลือดดาว ตัวที่ 1	รหัส เลือดดาว ตัวที่ 2	เพศ ตรงกัน	รหัสสถานที่เลี้ยง (ประเภทตัวอย่าง)	LR	เปอร์เซ็นต์ ความน่าจะเป็น ตัวเดียวกัน	จำนวน เครื่องหมาย ที่สอดคล้อง	จำนวน แอลลีล ที่ตรงกัน
032	096	✓	F (เลือด)/K (ชิ้นเนื้อ)	5.79E+12	99.999999982729	17	100%
101	115	✓	L (เลือด)/L (เลือด)**	2.95E+12	99.999999966102	17	100%
019	045	✓	D (เลือด)/G (เลือด)*	8.84E+11	99.9999999886878	17	100%
100	116	✓	L (เลือด)/L (เลือด)**	7.93E+11	99.9999999873897	17	100%
041	071	✓	D (เลือด)/D (เลือด)*	3.33E+11	99.99999996997	17	100%
018	067	✓	D (เลือด)/D (เลือด)*	1.58E+11	99.9999999367089	17	100%
022	028	✓	E (เลือด)/E (ขน)**	1.07E+11	99.9999999065421	17	100%
040	070	✓	D (เลือด)/D (เลือด)*	7.09E+10	99.9999998589563	17	100%
030	043	✓	F (เลือด)/G (เลือด)*	6.14E+10	99.9999998371335	17	100%
031	044	✓	F (เลือด)/G (เลือด)*	3.84E+09	99.9999973958333	16	100%
102	114	✓	L (เลือด)/L (เลือด)**	1.27E+09	99.9999921259842	16	100%

* หมายถึง มีรหัสไมโครชิพเดียวกัน

** หมายถึง มาจากกรงเลี้ยงเดียวกัน

LR หมายถึง Likelihood Ratio

4.1.4 การทดสอบความเหมาะสมของข้อมูลตัวอย่างที่ได้จากการศึกษา

เมื่อได้เครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ที่เหมาะสมแล้ว การทดสอบประสิทธิภาพของเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์เป็นขั้นตอนที่มีความจำเป็นอย่างยิ่ง โดยตัวอย่างที่นำมาทดสอบดังกล่าวควรเป็นตัวอย่างที่มาจากหลากหลายประชากร และเป็นประชากรที่อยู่ในสมดุลของฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก ซึ่งมีเงื่อนไข คือ ไม่มีการกลายพันธุ์ ไม่มีการคัดเลือกโดยธรรมชาติ ไม่มีการอพยพของประชากร มีการจับคู่ผสมพันธุ์แบบสุ่ม และมีจำนวนตัวอย่างที่มากพอ อย่างไรก็ตาม ตัวอย่างเลือดาวที่นำมาศึกษาในครั้งนี้ส่วนใหญ่เป็นตัวอย่างจากประชากรในกรงเลี้ยงของประเทศไทย ซึ่งอาจไม่อยู่ในเงื่อนไขดังกล่าว ผู้วิจัยจึงได้ทดสอบสมมติฐานโดยใช้ตัวอย่างเลือดาวทั้งหมดจำนวน 96 ตัวอย่าง 17 เครื่องหมาย (ยกเว้นเครื่องหมายระบุเพศ) ที่วิเคราะห์ได้จากห้องปฏิบัติการ มาคำนวณค่าสถิติเฉพาะโดยใช้ซอฟต์แวร์ Genepop 4.7.X สามารถคำนวณค่า P -value ของสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก รวมทุกเครื่องหมายได้น้อยกว่า $1.06E-36$ จึงปฏิเสธสมมติฐานที่ว่า ตัวอย่างเลือดาวอยู่ในสมดุลของฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก ส่วนผลการทดสอบค่าสัมประสิทธิ์การผสมพันธุ์ในเครือญาติ (Inbreeding Coefficient; F_{IS}) มีค่าเฉลี่ยมากกว่า 0 (0.1189) นั้นแสดงว่ามีการผสมพันธุ์ในเครือญาติ (inbreeding) ค่าสถิติทั้งหมดสอดคล้องกัน สามารถยืนยันได้ว่า ตัวอย่างเลือดาวที่ใช้ในการศึกษานี้ไม่อยู่ในเงื่อนไขของสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก ดังนั้น ตัวอย่างที่ใช้การศึกษานี้ไม่ใช่ตัวแทนตัวอย่างที่ดีสำหรับใช้ในการประเมินประสิทธิภาพของเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ในภาพรวม ผู้วิจัยจึงได้จำลองชุดข้อมูล (simulation) จากแอลลีลที่วิเคราะห์ได้ด้วยซอฟต์แวร์ MS office Excel ด้วยการสร้างชุดข้อมูลแอลลีลใหม่ทั้งหมดจำนวน 4,000 แอลลีล หรือ 2,000 ตัวอย่าง คิดเป็น 2 เท่าของจำนวนประชากรเลือดาวทั้งหมดในประเทศไทยที่อ้างอิงจากการตรวจเอกสาร โดยใช้วิธีการสุ่มแอลลีลจากตัวอย่างที่วิเคราะห์ได้ (sampling) จากนั้นนำชุดข้อมูลที่ได้มาทดสอบสมดุลของฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก อีกครั้ง พบว่า ข้อมูลที่ได้จากการจำลองสามารถคำนวณค่า P -value ของสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก รวมทุกเครื่องหมายเท่ากับ 0.7758 แสดงว่า ข้อมูลตัวอย่างที่จำลองขึ้นมานั้นเป็นไปตามเงื่อนไขสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก ค่าเฉลี่ยสัมประสิทธิ์การผสมพันธุ์ในเครือญาติเฉลี่ย (F_{IS}) เท่ากับ -0.0044 แสดงถึงประชากรมีการผสมพันธุ์นอกเครือญาติ (Outbreeding) หรืออนุมานได้ว่าประชากรที่จำลองขึ้นมามีการจับคู่ผสมแบบสุ่ม ข้อมูลชุดนี้จึงเหมาะสมเป็นตัวแทนในการทดสอบประสิทธิภาพของเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ในภาพรวมต่อไป (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 แสดงค่าสถิติที่ใช้ในการทดสอบความเหมาะสมของข้อมูลตัวอย่างที่ได้จากการศึกษาและชุดข้อมูลที่ได้จากการจำลอง

Locus	ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาวิจัย (96 ตัวอย่าง)		ชุดข้อมูลที่ได้จากการจำลอง (2,000 ตัวอย่าง)	
	HWE ($p\text{-value}=0.05$)	F_S (W&C)	HWE ($p\text{-value}=0.05$)	F_S (W&C)
MsFCA453	0.0323*	0.1119	0.9155 NS	-0.0017
PONCC1	0*	0.1424	0.1876 NS	-0.0094
msFCA391	0.0041*	0.0726	0.4501 NS	-0.018
PONCD3	0*	0.0779	0.1614 NS	0.0013
FCA742a	0*	0.2376	0.4243 NS	0.0074
F85	0.0034*	0.1064	0.3821 NS	-0.0176
msFCA441	0.0002*	-0.0423	0.5997 NS	-0.0213
PONCB4	0.0052*	0.1513	0.8454 NS	0.0062
PONCD1	0*	0.1016	0.1302 NS	0.0192
F42	0*	0.1967	0.454 NS	-0.0218
FCA272	0.0098*	0.1156	0.5111 NS	0.0022
PONCD4	0*	0.2392	0.3821 NS	-0.0031

ตารางที่ 5 แสดงค่าสถิติที่ใช้ในการทดสอบความเหมาะสมของข้อมูลตัวอย่างที่ได้จากการศึกษาและชุดข้อมูลที่เลือกที่ได้จากการจำลอง (ต่อ)

Locus	ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาวิจัย (96 ตัวอย่าง)		ชุดข้อมูลที่เลือกจากการจำลอง (2,000 ตัวอย่าง)	
	HWE ($p\text{-value}=0.05$)	F_s (W&C)	HWE ($p\text{-value}=0.05$)	F_s (W&C)
PONCD2	0.3877 ^{NS}	0.084	0.4006 ^{NS}	0.0034
PttD5	0.0025*	0.0845	0.7125 ^{NS}	-0.0097
PONCE1	0*	0.0939	0.5832 ^{NS}	0.0004
Pan7A1	0.0001*	0.2661	0.7926 ^{NS}	0.0093
Pan4A2	1 ^{NS}	-0.0188	0.672 ^{NS}	-0.0223
รวม/เฉลี่ย	< 1.06E-36 *	0.1189	0.7758 ^{NS}	-0.0044

หมายเหตุ	NS	หมายถึง	Non-Significance ยอมรับ H_0 ประชากรอยู่ในสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก
*		หมายถึง	Significant ปฏิเสธ H_0 ประชากรไม่อยู่ในสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก
F_s (W&C)		หมายถึง	ค่าเฉลี่ยสัมประสิทธิ์การผสมพันธุ์ในเครือญาติของ Weir และ Cockerham

4.1.5 การทดสอบความความไม่สมดุลของลิงเกจ (Linkage Disequilibrium; LD)

การทดสอบความไม่สมดุลของลิงเกจ เป็นการทดสอบความเชื่อมโยงกันของเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ที่คัดเลือกได้ทั้งหมด 17 เครื่องหมาย ดังนั้นเพื่อไม่ให้เกิดปัจจัยจากตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบ ผู้วิจัยจึงใช้ข้อมูลที่ได้จากการจำลองชุดข้อมูลซึ่งมีจำนวนทั้งสิ้น 2,000 ตัวอย่าง โดยเป็นข้อมูลที่ได้จากการทดสอบว่าอยู่ในสมดุลของฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก นำมาทดสอบความเชื่อมโยงของเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ทีละคู่ ด้วยซอฟต์แวร์ Genepop 4.7.X ผลการทดสอบดังกล่าวพบว่า มีเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ที่เชื่อมโยงกันทั้งหมด 3 คู่ ได้แก่ PONCD3 กับ PONCD1, PONCD3 กับ Pan7A1 และ PONCE1 กับ PONCD4 ซึ่งมีค่า Bonferroni significance value เท่ากับ $2.5E-230$, $1.9E-232$ และ $1.4E-234$ ตามลำดับ (ตารางผนวกที่ จ-1) ดังนั้น จึงคัดเลือกเครื่องหมาย PONCD3 และ PONCD4 ออกจากการตรวจพิสูจน์

4.1.6 การทดสอบประสิทธิภาพของเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ที่คัดเลือกได้ในแต่ละกรณี

ในการทดสอบนี้ผู้วิจัยใช้ข้อมูลเลือดดาวที่ได้จากการวิเคราะห์ผลในห้องปฏิบัติการทั้งหมด 96 ตัวอย่าง 15 เครื่องหมาย สำหรับทดสอบประสิทธิภาพและจำนวนเครื่องหมายที่เหมาะสมในการตรวจพิสูจน์กรณีต่าง ๆ เนื่องจากเป็นกลุ่มตัวอย่างเป้าหมายในการตรวจพิสูจน์เพื่อระบุตัวและหาความสัมพันธ์ระหว่างแม่-ลูก และ พ่อ-ลูก ซึ่งส่วนใหญ่เป็นตัวอย่างเลือดดาวในกรงเลี้ยงที่มีประชากรจำกัด และมีโอกาสผสมพันธุ์ในเครือญาติสูง จึงมีผลต่อความใกล้ชิดทางพันธุกรรม ความถี่ของแอลลีล และค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมต่าง ๆ ได้แก่ ค่าเฮเทอโรไซโกซิตีที่คาดหวัง (H_e) ค่าเฮเทอโรไซโกซิตีที่สังเกตได้ (H_o) พอลิมอร์ฟิซึมอินฟอร์เมชันคอนเทนต์ (PIC) ซึ่งมีผลต่อประสิทธิภาพของเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ที่ใช้ในการตรวจพิสูจน์ทางนิติวิทยาศาสตร์

ผลจากการคำนวณค่าความถี่แอลลีลและเฮเทอโรไซโกซิตี ด้วยซอฟต์แวร์ GenALEX 6.5 พบว่า เครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ทั้ง 15 เครื่องหมาย มีจำนวนแอลลีลตั้งแต่ 3-13 แอลลีล และมีค่าเฉลี่ยแอลลีลเท่ากับ 7.5333 ค่าเฉลี่ยเฮเทอโรไซโกซิตีที่สังเกตได้ (H_o) เท่ากับ 0.6715 น้อยกว่าค่าเฉลี่ยเฮเทอโรไซโกซิตีที่คาดหวัง (H_e) เท่ากับ 0.7561 แสดงว่า กลุ่มตัวอย่างเลือดดาวที่ใช้ในการศึกษานี้ มีแนวโน้มผสมพันธุ์แบบเลือดชิด ค่าเฉลี่ยพอลิมอร์ฟิซึมอินฟอร์เมชันคอนเทนต์ (PIC) เท่ากับ 0.7197 ใกล้เคียงกับค่าเฉลี่ยเฮเทอโรไซโกซิตีที่สังเกตได้ (H_o) ประชากรมีความหลากหลายปานกลาง ค่าเฉลี่ยอัลลีล (Null allele) เท่ากับ 0.0585 แสดงว่าชุดเครื่องหมายชุดนี้มีโอกาสต่ำที่จะไม่สามารถวิเคราะห์ผลได้เนื่องจากการกลายพันธุ์ (ตารางที่ 6) ค่าทั้งหมดนี้สอดคล้องกับผลการทดสอบความสมดุลของฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก และค่าเฉลี่ยสัมประสิทธิ์การผสมพันธุ์ในเครือญาติ (Inbreeding Coefficient; F_{IS}) ในข้อ 4.1.4 สำหรับค่าความถี่ของแอลลีลในแต่ละเครื่องหมายแสดงไว้ในภาคผนวก ฉ ตารางผนวกที่ ฉ-1 ถึง ตารางผนวกที่ ฉ-15 เพื่อใช้วิเคราะห์ความเป็นพ่อ-ลูก หรือ แม่-ลูก ในซอฟต์แวร์ Familias 3.3.1 ต่อไป

ตารางที่ 6 แสดงจำนวนแอลลีลและค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรเสือดาว

Locus	N	Na	H _o	H _e	PIC	Null allele
MsFCA453	95	5	0.621	0.695	0.643	0.0613
PONCC1	96	12	0.75	0.869	0.856	0.0754
msFCA391	93	8	0.667	0.715	0.676	0.0347
FCA742a	96	9	0.656	0.855	0.838	0.1328
F85	96	7	0.729	0.811	0.785	0.0466
msFCA441	94	7	0.83	0.792	0.763	-0.0303
PONCB4	95	9	0.684	0.801	0.773	0.0784
PONCD1	96	7	0.698	0.772	0.739	0.0449
F42	96	9	0.656	0.812	0.787	0.1033
FCA272	96	5	0.656	0.738	0.695	0.0614
PONCD2	96	6	0.635	0.69	0.651	0.0442
PttD5	96	6	0.667	0.724	0.68	0.0372
PONCE1	96	13	0.813	0.892	0.882	0.0443
Pan7A1	96	7	0.5	0.677	0.618	0.1539
Pan4A2	94	3	0.511	0.499	0.41	-0.011
เฉลี่ย	95.4	7.5333	0.6715	0.7561	0.7197	0.0585

หมายเหตุ เครื่องหมาย PONCD3 และ PONCD4 ถูกคัดออกเนื่องจากมีความเชื่อมโยงกับ
 เครื่องหมาย PONCD1, Pan7A1 และ PONCE1
 N หมายถึง จำนวนตัวอย่างที่วิเคราะห์ได้
 Na หมายถึง จำนวนแอลลีล

จำนวนเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ที่เหมาะสมในการตรวจพิสูจน์ระบุตัว และการหาความสัมพันธ์ระหว่างพ่อ-ลูก และ แม่-ลูก โดยวิเคราะห์จากโอกาสการไม่คัดออกที่ไม่ใช่ตัวเดียวกัน กรณีที่เลือดดาวไม่มีความสัมพันธ์แบบพี่น้อง (NE-I) โอกาสการไม่คัดออกที่ไม่ใช่ตัวเดียวกันกรณีเลือดดาวที่มีความสัมพันธ์แบบพี่น้อง (NE-SI) โอกาสการไม่คัดออกเลือดดาวที่ไม่ใช่พ่อแม่ กรณีที่ไม่ทราบข้อมูลของพ่อหรือแม่ที่แท้จริง (Non-Exclusion Probability in case First Parent; NE-1P) โอกาสการไม่คัดออกเลือดดาวที่ไม่ใช่พ่อแม่ กรณีที่ทราบพ่อหรือแม่ตัวใดตัวหนึ่งแล้ว (non-exclusion probability in case Second Parent; NE-2P) และโอกาสการไม่คัดออกเลือดดาวที่ไม่ใช่พ่อแม่ กรณีที่ทราบทั้งพ่อและแม่ (non-exclusion probability in case Parent Pair; NE-PP) ผลการวิเคราะห์โอกาสการไม่คัดออกในกรณีต่าง ๆ เรียงลำดับการวิเคราะห์โอกาสการไม่คัดออกสะสมจากเครื่องหมายที่มีจำนวนแอลลีล (N_a) มากสุดไปน้อยสุด (ตารางที่ 7-8) อธิบายได้ดังนี้

ประสิทธิภาพของเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ในการตรวจพิสูจน์เพื่อระบุตัว

(1) กรณีที่เลือดดาวไม่มีความสัมพันธ์กันแบบพี่น้อง โอกาสการไม่คัดออกที่ไม่ใช่ตัวเดียวกันรวม (Combined NE-I) ที่วิเคราะห์ได้เท่ากับ 7.24097×10^{-17} แสดงว่า โอกาสที่เลือดดาวสองตัวจะมีรหัสพันธุกรรมที่วิเคราะห์ได้จากเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์จำนวน 15 เครื่องหมาย ตรงกันโดยบังเอิญคิดเป็น 1 ใน 13,810,300,000,000,000 ตัว (ประมาณหนึ่งใน 13.8 ล้านล้านตัว)

(2) กรณีที่เลือดดาวมีความสัมพันธ์แบบพี่น้อง โอกาสการไม่คัดออกที่ไม่ใช่ตัวเดียวกันรวม (Combined NE-SI) ที่วิเคราะห์ได้เท่ากับ 8.3136×10^{-7} แสดงว่า โอกาสที่เลือดดาวสองตัวที่เป็นพี่น้องจะมีรหัสพันธุกรรมที่วิเคราะห์ได้จากเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์จำนวน 15 เครื่องหมาย ตรงกันโดยบังเอิญคิดเป็น 1 ใน 1,202,849 ตัว (ประมาณหนึ่งใน 1.2 ล้านตัว)

ประสิทธิภาพของเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ในการตรวจพิสูจน์ความสัมพันธ์ระหว่างพ่อ-ลูก และ แม่-ลูก

(1) กรณีที่ไม่ทราบข้อมูลของพ่อหรือแม่ที่แท้จริง โอกาสการไม่คัดออกรวม (Combined NE-1P) ที่วิเคราะห์ได้เท่ากับ 0.000449556 แสดงว่า โอกาสที่เลือดดาวสองตัวจะมีรหัสพันธุกรรมที่วิเคราะห์ได้จากเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์จำนวน 15 เครื่องหมาย สอดคล้องเป็น พ่อ-ลูก หรือ แม่-ลูก โดยบังเอิญคิดเป็น 1 ใน 2,224.417685 ตัว (ประมาณหนึ่งในสองพันสองร้อยยี่สิบห้าตัว)

(2) กรณีที่ทราบพ่อหรือแม่ตัวใดตัวหนึ่งแล้ว โอกาสการไม่คัดออกรวม (Combined NE-2P) ที่วิเคราะห์ได้เท่ากับ 2.76196×10^{-6} แสดงว่า โอกาสที่เลือดดาวสองตัวจะมีรหัสพันธุกรรมที่วิเคราะห์ได้จากเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์จำนวน 15 เครื่องหมาย สอดคล้องเป็น พ่อ-ลูก หรือ แม่-ลูก โดยบังเอิญคิดเป็น 1 ใน 362,000 ตัว (หนึ่งในสามแสนหกหมื่นสองพันตัว)

(3) กรณีที่ทราบทั้งพ่อและแม่ โอกาสการไม่คัดออกรวม (Combined NE-PP) ที่วิเคราะห์ได้เท่ากับ 4.65519×10^{-10} แสดงว่า โอกาสที่เลือดดาวสองตัวจะมีรหัสพันธุกรรมที่วิเคราะห์ได้จากเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์จำนวน 15 เครื่องหมาย สอดคล้องเป็น พ่อ-ลูก หรือ แม่-ลูก โดยบังเอิญคิดเป็น 1 ใน 2,150,000,000 ตัว (หนึ่งใน 2.15 พันล้านตัว)

เมื่อพิจารณาข้อมูลประชากรเลือดดาวในธรรมชาติทั่วโลกมีจำนวนประมาณ >700,000 ตัว ดังนั้น จำนวนเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ขั้นต่ำสำหรับการตรวจพิสูจน์เพื่อระบุตัว และการตรวจพิสูจน์ความสัมพันธ์ทางสายเลือดระหว่างพ่อ-ลูก และแม่-ลูก ในกรณีต่าง ๆ กับเลือดดาวทั่วโลก ควรมีโอกาสที่รหัสพันธุกรรมตรงกัน หรือ สอดคล้องเป็น พ่อ-ลูก หรือ แม่-ลูก โดยบังเอิญทั้ง 15 เครื่องหมาย คิดเป็น 1 ใน >700,000 ตัว จึงสรุปได้ว่า

การตรวจพิสูจน์เพื่อระบุตัวกรณีที่เลือดดาวไม่มีความสัมพันธ์แบบพี่น้อง ต้องใช้เครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ขั้นต่ำจำนวน 5 เครื่องหมาย ได้แก่ PONCE1, PONCC1, FCA742a, PONCB4 และ F42

การพิสูจน์เพื่อระบุตัวกรณีที่เลือดดาวมีความสัมพันธ์แบบพี่น้อง และการตรวจพิสูจน์ความสัมพันธ์ทางสายเลือดระหว่างพ่อ-ลูก และแม่-ลูก กรณีที่ทราบพ่อหรือแม่ตัวใดตัวหนึ่งแล้ว ต้องใช้เครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ขั้นต่ำจำนวน 15 เครื่องหมาย ได้แก่ PONCE1, PONCC1, FCA742a, PONCB4, F42, msFCA391, F85, msFCA441, PONCD1, Pan7A1, PONCD2, PttD5, MsFCA453, FCA272 และ Pan4A2

การตรวจพิสูจน์ความสัมพันธ์ทางสายเลือดระหว่างพ่อ-ลูก และแม่-ลูก กรณีที่ไม่ทราบข้อมูลของพ่อหรือแม่ที่แท้จริง หรือกรณีที่ทราบพ่อหรือแม่ตัวใดตัวหนึ่ง ต้องใช้เครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์จำนวนมากกว่า 15 เครื่องหมายข้างต้น และหากเป็นกรณีที่ทราบทั้งพ่อและแม่ ต้องใช้เครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ขั้นต่ำจำนวน 8 เครื่องหมาย ได้แก่ PONCE1, PONCC1, FCA742a, PONCB4, F42, msFCA391, F85 และ msFCA441

อย่างไรก็ตาม จำนวนเลือดดาวในธรรมชาติของประเทศไทยมีจำนวน 416–832 ตัว (Rostro-Garcia et al., 2016) และประชากรเลือดดาวในกรงเลี้ยงของไทยมีจำนวนทั้งหมด 144 ตัว อ้างอิงข้อมูลจากส่วนคุ้มครองสัตว์ป่า สำนักอนุรักษ์สัตว์ป่า ในปี 2567 ซึ่งจำนวนประชากรเลือดดาวของประเทศไทยรวมทั้งหมดประมาณ 1,000 ตัว ดังนั้น เครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ทั้ง 15 เครื่องหมายจึงเพียงพอกับการตรวจพิสูจน์ระบุตัว และการตรวจพิสูจน์ความสัมพันธ์ทางสายเลือดระหว่างพ่อ-ลูก และแม่-ลูก ของประชากรเลือดดาวในประเทศไทยทุกกรณี

ตารางที่ 7 แสดงผลการวิเคราะห์โอกาสการไม่คัดออกในการใช้เครื่องหมายโมโครเซตเพลไลต์จำนวน 15 เครื่องหมาย ตรวจพิสูจน์ระบุตัวเสื้อดาว

เครื่องหมาย	Na	NE-I	ค่ารวม NE-I สะสม	$\frac{1}{\text{ค่ารวม NE-I สะสม}}$	NE-SI	ค่ารวม NE-SI สะสม	$\frac{1}{\text{ค่ารวม NE-SI สะสม}}$
PONCE1	13	0.022	0.022	45.45454545	0.31	0.31	3.225806
PONCC1	12	0.031	0.000682	1,466.27566	0.323	0.10013	9.987017
FCA742a	9	0.038	0.000025916	38,586.20157	0.332	0.03324316	30.08138
PONCB4	9	0.068	1.76229×10^{-6}	567,444.1408	0.366	0.012166997	82.18955
F42	9	0.061	1.075×10^{-7}	9,302,362.964*	0.359	0.004367952	228.9403
msFCA391	8	0.121	1.30074×10^{-8}	76,879,032.76	0.423	0.001847644	541.2299
F85	7	0.062	8.06462×10^{-10}	1,239,984,399	0.36	0.000665152	1,503.416
msFCA441	7	0.072	5.80652×10^{-11}	17,222,005.547	0.372	0.000247436	4,041.442
PONCD1	7	0.085	4.93555×10^{-12}	202,612,000,000	0.385	9.5263×10^{-5}	10,497.25
Pan7A1	7	0.163	8.04494×10^{-13}	1,243,020,000,000	0.452	4.30589×10^{-5}	23,224.01
PONCD2	6	0.135	1.08607×10^{-13}	9,207,540,000,000	0.439	1.89029×10^{-5}	52,902.07
PttD5	6	0.121	1.31414×10^{-14}	76,095,300,000,000	0.418	7.90139×10^{-6}	126,560
MsFCA453	5	0.146	1.91865×10^{-15}	521,201,000,000,000	0.439	3.46871×10^{-6}	288,291.5
FCA272	5	0.111	2.1297×10^{-16}	4,695,500,000,000,000	0.409	1.4187×10^{-6}	704,869.2
Pan4A2	3	0.340	7.24097×10^{-17}	13,810,300,000,000,000	0.586	8.3136×10^{-7}	1,202,849**

หมายเหตุ * หมายถึง จำนวนเครื่องหมายขั้นต่ำ 5 เครื่องหมาย สำหรับใช้ในการตรวจพิสูจน์ระบบที่เสื้อดาวมีความสัมพันธ์แบบพี่น้อง ของประชากรเสื้อดาวทั่วโลก

** หมายถึง จำนวนเครื่องหมายขั้นต่ำ 15 เครื่องหมาย สำหรับใช้ในการตรวจพิสูจน์ระบบที่เสื้อดาวมีความสัมพันธ์แบบพี่น้อง ของประชากรเสื้อดาวทั่วโลก

ตารางที่ 8 แสดงผลการวิเคราะห์โอกาสการไม่คัดออกในการใช้เครื่องหมายไม่โครเซตเพลสไต์จำนวน 15 เครื่องหมาย ตรวจสอบพิสูจน์ความสัมพันธ์ทางสายเลือดระหว่างพ่อ-ลูก และแม่-ลูก เสือดาว

เครื่องหมาย	Na	NE-1P	ค่ารวม NE-1P		NE-1P สะสม	1/ค่ารวม NE-1P สะสม		NE-2P	ค่ารวม NE-2P สะสม		1/ค่ารวม NE-2P สะสม	NE-PP	ค่ารวม NE-PP สะสม		1/ค่ารวม NE-PP สะสม
			ค่ารวม	NE-1P		NE-1P สะสม	NE-1P สะสม		NE-2P	ค่ารวม NE-2P สะสม			NE-PP	ค่ารวม NE-PP สะสม	
PONCE1	13	0.362	0.362		0.362	2.762430939	0.22	0.22	0.22	0.22	4.55	0.076	0.076	0.076	13.2
PONCC1	12	0.417	0.150954		0.150954	6.624534626	0.262	0.262	0.05764	0.05764	17.3	0.103	0.007828	0.007828	128
FCA742a	9	0.457	0.068985978		0.068985978	14.4956994	0.293	0.01688852	0.293	0.01688852	59.2	0.127	0.000994156	0.000994156	1,010
PONCB4	9	0.569	0.039253021		0.039253021	25.47574587	0.391	0.006603411	0.391	0.006603411	151	0.21	0.000208773	0.000208773	4,790
F42	9	0.544	0.021353644		0.021353644	46.83041521	0.369	0.002436659	0.369	0.002436659	410	0.188	3.92493×10 ⁻⁵	3.92493×10 ⁻⁵	25,500
msFCA391	8	0.691	0.014755368		0.014755368	67.77194675	0.511	0.001245133	0.511	0.001245133	803	0.321	1.2599×10 ⁻⁵	1.2599×10 ⁻⁵	79,400
F85	7	0.552	0.008144963		0.008144963	122.7752659	0.375	0.000466925	0.375	0.000466925	2,140	0.196	2.46941×10 ⁻⁶	2.46941×10 ⁻⁶	405,000
msFCA441	7	0.581	0.004732224		0.004732224	211.3171529	0.403	0.000188171	0.403	0.000188171	5,310	0.218	5.38331×10 ⁻⁷	5.38331×10 ⁻⁷	1,860,000**
PONCD1	7	0.612	0.002896121		0.002896121	345.2894656	0.433	8.14779×10 ⁻⁵	0.433	8.14779×10 ⁻⁵	12,300	0.246	1.32429×10 ⁻⁷	1.32429×10 ⁻⁷	7,550,000
Pan7A1	7	0.745	0.00215761		0.00215761	463.4757927	0.584	4.75831×10 ⁻⁵	0.584	4.75831×10 ⁻⁵	21,000	0.411	5.44285×10 ⁻⁸	5.44285×10 ⁻⁸	18,400,000
PONCD2	6	0.716	0.001544849		0.001544849	647.3125597	0.537	2.55521×10 ⁻⁵	0.537	2.55521×10 ⁻⁵	39,100	0.345	1.87778×10 ⁻⁸	1.87778×10 ⁻⁸	53,300,000
PttD5	6	0.682	0.001053587		0.001053587	949.1386506	0.507	1.29549×10 ⁻⁵	0.507	1.29549×10 ⁻⁵	77,200	0.321	6.02768×10 ⁻⁹	6.02768×10 ⁻⁹	166,000,000

ตารางที่ 8 แสดงผลการวิเคราะห์โอกาสการไม่คัดออกในการใช้เครื่องมือภายใต้โครงการหมายเลข 15 เครื่องหมาย ตรวจพิสูจน์ความสัมพันธ์ทางสายเลือดระหว่างพ่อ-ลูก และแม่-ลูก เสือดาว (ต่อ)

เครื่องหมาย Na	NE-1P	ค่ารวม NE-1P สะสม	1/ค่ารวม		NE-2P	ค่ารวม NE-2P สะสม	NE-PP	ค่ารวม NE-PP สะสม	1/ค่ารวม NE-PP สะสม
			NE-1P สะสม	NE-2P สะสม					
MsFCA453	5	0.727	0.000765958	1,305.555228	0.558	7.22885×10^{-6}	0.381	2.29655×10^{-9}	435,000,000
FCA272	5	0.67	0.000513192	1,948.589892	0.493	3.56382×10^{-6}	0.309	7.09633×10^{-10}	1,410,000,000
Pan4A2	3	0.876	0.000449556	2,224.417685*	0.775	2.76196×10^{-6}	0.656	4.65519×10^{-10}	2,150,000,000

หมายเหตุ * หมายถึง จำนวนเครื่องหมายขั้นต่ำมากกว่า 15 เครื่องหมาย สำหรับการตรวจพิสูจน์ความสัมพันธ์ทางสายเลือดระหว่างพ่อ-ลูก และแม่-ลูก กรณีที่ไม่ทราบทั้งพ่อและแม่ หรือกรณีที่ทราบพ่อหรือแม่ได้ตัวหนึ่งแล้ว ของประชากรเสือดาวทั้งโลก

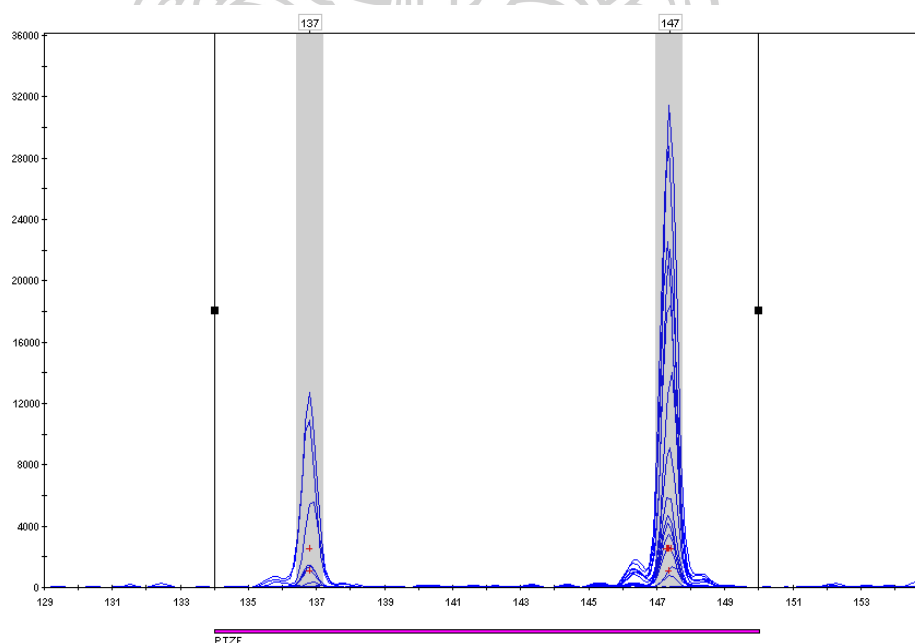
** หมายถึง จำนวนเครื่องหมายขั้นต่ำ 8 เครื่องหมาย สำหรับการตรวจพิสูจน์ความสัมพันธ์ทางสายเลือดระหว่างพ่อ-ลูก และแม่-ลูก กรณีที่ทราบทั้งพ่อและแม่ ของประชากรเสือดาวทั้งโลก

ปัจจุบันมีการศึกษาเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ของสัตว์ตระกูลแมวขนาดใหญ่หลายชนิด ตัวอย่างเช่น เสือโคร่ง เสือดาว สิงโต พบว่า เครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์จำนวน 12 เครื่องหมายเพียงพอต่อการตรวจพิสูจน์เพื่อระบุตัว (Pandey et al., 2021) และจำนวนเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ที่เพียงพอในการตรวจพิสูจน์ความสัมพันธ์ทางสายเลือดระหว่าง พ่อ-ลูก และ แม่-ลูก ของเสือโคร่งจำนวน 15 เครื่องหมาย (Zhao et al., 2020) สำหรับการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ในงานนิติวิทยาศาสตร์สัตว์กลุ่มอื่น ๆ ตัวอย่างเช่น สัตว์ในตระกูลกวาง การตรวจพิสูจน์เพื่อระบุตัวในกวางโร (Roe Deer) กวางล่อ (Mule Deer) และกวางหางขาว (White-tailed deer) จำนวนเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ที่เพียงพอ 12-14 เครื่องหมาย (Hamlin et al., 2021; Morf et al., 2021) จากรายงานการศึกษาการตรวจพิสูจน์เพื่อระบุตัวแบ่งเป็น 2 กรณี คือ กรณีที่ไม่มีความสัมพันธ์แบบพี่น้อง และกรณีที่มีความสัมพันธ์แบบพี่น้อง เมื่อพิจารณาโอกาสการไม่คัดออกที่ไม่ใช่ตัวเดียวกันในแต่ละกรณีพบว่า การตรวจพิสูจน์ดังกล่าวในกรณีที่มีความสัมพันธ์แบบพี่น้องมีแนวโน้มต้องใช้จำนวนเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์มากกว่า สอดคล้องกับผลการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ ขณะที่การตรวจพิสูจน์ความสัมพันธ์ทางสายเลือดระหว่างพ่อ-ลูก หรือ แม่-ลูก ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมด้วยเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ส่วนใหญ่ยังไม่มีการศึกษาประสิทธิภาพของเครื่องหมาย หรือ หากมีการศึกษาประสิทธิภาพของเครื่องหมาย จะเป็นการศึกษาในภาพรวมโดยไม่แยกเป็นกรณีต่าง ๆ อย่างไรก็ตาม พบว่า มีการศึกษาประสิทธิภาพของเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ในสัตว์กลุ่มนกแก้ว 7 ชนิด จำนวน 14-17 เครื่องหมาย สำหรับใช้ในการตรวจพิสูจน์ทางนิติวิทยาศาสตร์ มีรายงานโอกาสการไม่คัดออกในการตรวจพิสูจน์ความสัมพันธ์ทางสายเลือดระหว่าง พ่อ-ลูก หรือแม่-ลูก ในกรณีต่าง ๆ ได้แก่ กรณีที่ไม่ทราบพ่อหรือแม่ที่แท้จริง กรณีทราบพ่อหรือแม่ตัวใดตัวหนึ่ง และกรณีที่ทราบทั้งพ่อและแม่ ซึ่งโอกาสการไม่คัดออกตัวที่ไม่ใช่พ่อแม่ที่แท้จริงมีแนวโน้มว่า การตรวจพิสูจน์ในกรณีที่ไมทราบทั้งพ่อและแม่ต้องใช้จำนวนเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์มากที่สุด รองลงมา คือ การตรวจพิสูจน์ในกรณีทราบพ่อหรือแม่ตัวใดตัวหนึ่ง และการตรวจพิสูจน์ในกรณีที่ทราบทั้งพ่อและแม่ที่แท้จริง ใช้เครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์จำนวนน้อยที่สุด (Jan & Fumagalli, 2016) ซึ่งแนวโน้มดังกล่าวสอดคล้องกับผลการศึกษาประสิทธิภาพของเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ของเสือดาวในครั้งนี้

4.1.6 การทดสอบการจำแนกเพศเสือดาวด้วยเครื่องหมายพันธุกรรม

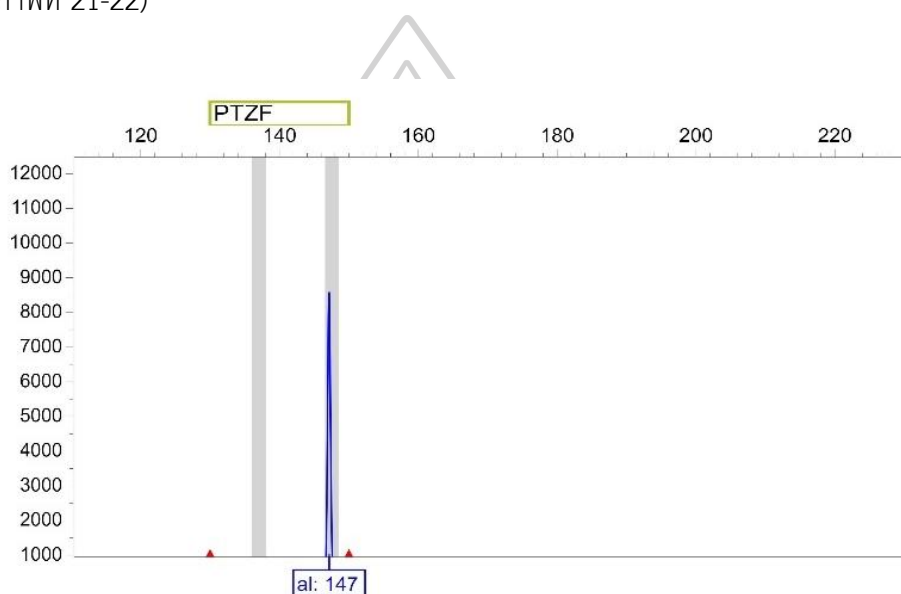
ผู้วิจัยนำเครื่องหมายพันธุกรรม PTZF มาทดสอบกับตัวอย่างเสือดาวที่ทราบเพศจำนวนทั้งหมด 92 ตัวอย่าง ซึ่งเครื่องหมายพันธุกรรมดังกล่าวใช้ในการจำแนกเพศเสือโคร่งในงานนิติวิทยาศาสตร์สัตว์ป่า ของศูนย์นิติวิทยาศาสตร์สัตว์ป่า โดยอ้างอิงมาจากงานวิจัยการจำแนกเพศเสือโคร่ง ซึ่งเป็นเครื่องหมายพันธุกรรมในส่วนของ zinc finger (ZF) protein intron บนโครโมโซม X และ Y ที่สามารถให้ผลิตภัณฑ์ร่วมกัน (Co-amplify homologous fragments) แต่มีขนาดแตกต่างกัน โดยผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากโครโมโซม X และ Y เมื่อใช้เครื่องหมายพันธุกรรม PTZF ทดสอบกับตัวอย่างเสือโคร่งจะให้ความยาว 150 bp และ 138 bp ตามลำดับ (McEwing et al., 2012)

เมื่อนำเครื่องหมายพันธุกรรมดังกล่าวมาทดสอบกับตัวอย่างเสือดาวจำนวน 28 ตัวอย่าง (เพศผู้ 13 ตัวอย่าง เพศเมีย 11 ตัวอย่าง และไม่ทราบเพศ 4 ตัวอย่าง) สามารถวิเคราะห์ผลได้ทั้งหมด 23 ตัวอย่าง โดยตัวอย่างที่วิเคราะห์ผลได้สามารถระบุเพศเสือดาวได้ตรงกับฐานข้อมูลที่บันทึกไว้ทุกตัวอย่าง อย่างไรก็ตาม การใช้เครื่องหมายพันธุกรรม PTZF กับเสือดาวจะได้ผลิตภัณฑ์จากโครโมโซม X และ Y ที่เครื่องวิเคราะห์ผลได้มีความยาวระหว่าง 147.1-147.45 bp และ 136.53-136.91 bp ตามลำดับ ซึ่งจากการซ้อนทับของพีคที่วิเคราะห์ได้จากตัวอย่างทั้งหมด พบว่า ขนาดความยาวของผลิตภัณฑ์ที่ได้ทั้ง 2 แอลลีลนั้นมีความแม่นยำ (Accuracy) และความเที่ยงตรง (Precision) สูง

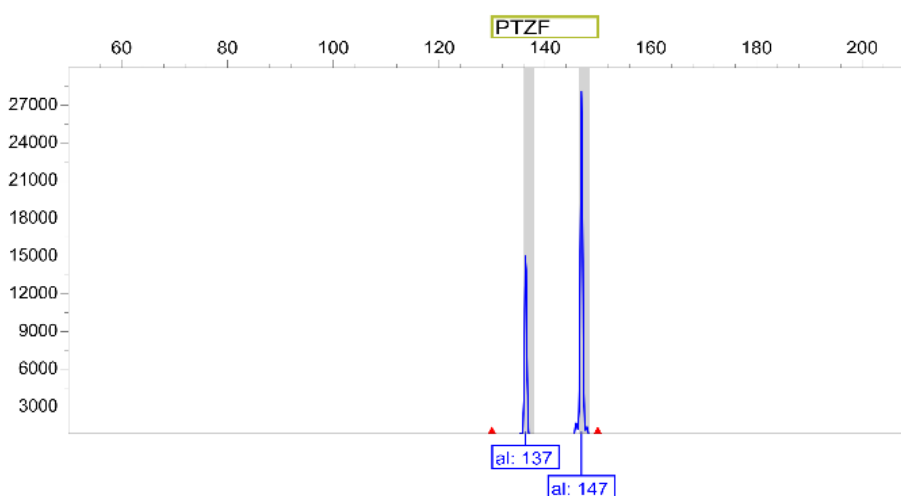


ภาพที่ 20 แสดงตัวอย่างลักษณะการซ้อนทับของพีคและระยะห่างระหว่างขนาดแอลลีลของเครื่องหมายพันธุกรรม PTZF ที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างเสือดาวในห้องปฏิบัติการจำนวน 23 ตัวอย่าง

จากผลการใช้เครื่องหมายพันธุกรรมดังกล่าวทดสอบการจำแนกเพศตัวอย่างเลือดดาวทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้พบว่า การทดสอบเครื่องหมายพันธุกรรม PTZF กับเลือดดาวที่ทราบเพศทั้งหมด 92 ตัวอย่าง ไม่สามารถวิเคราะห์เครื่องหมายพันธุกรรมได้จำนวน 13 ตัวอย่าง โดยตัวอย่างที่วิเคราะห์พันธุกรรมได้นั้นสามารถระบุเพศได้ตรงกับฐานข้อมูลที่บันทึกไว้จำนวน 77 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 97.45 และมีจำนวน 2 ตัวอย่างที่ระบุเพศไม่ตรงกับฐานข้อมูล คิดเป็นร้อยละ 2.53 ของตัวอย่างที่สามารถวิเคราะห์ผลได้ (ภาคผนวก ก ตารางผนวก ก-1) โดยตัวอย่างเลือดดาวเพศเมียมีเพียงแอลลีลเดียว คือ 147 (1 พีค) ส่วนตัวอย่างเลือดดาวเพศผู้จะมี 2 แอลลีล คือ แอลลีล 137 และ 147 (2 พีค) (ภาพที่ 21-22)



ภาพที่ 21 แสดงผลการวิเคราะห์เครื่องหมาย PTZF กับเลือดดาวเพศเมีย



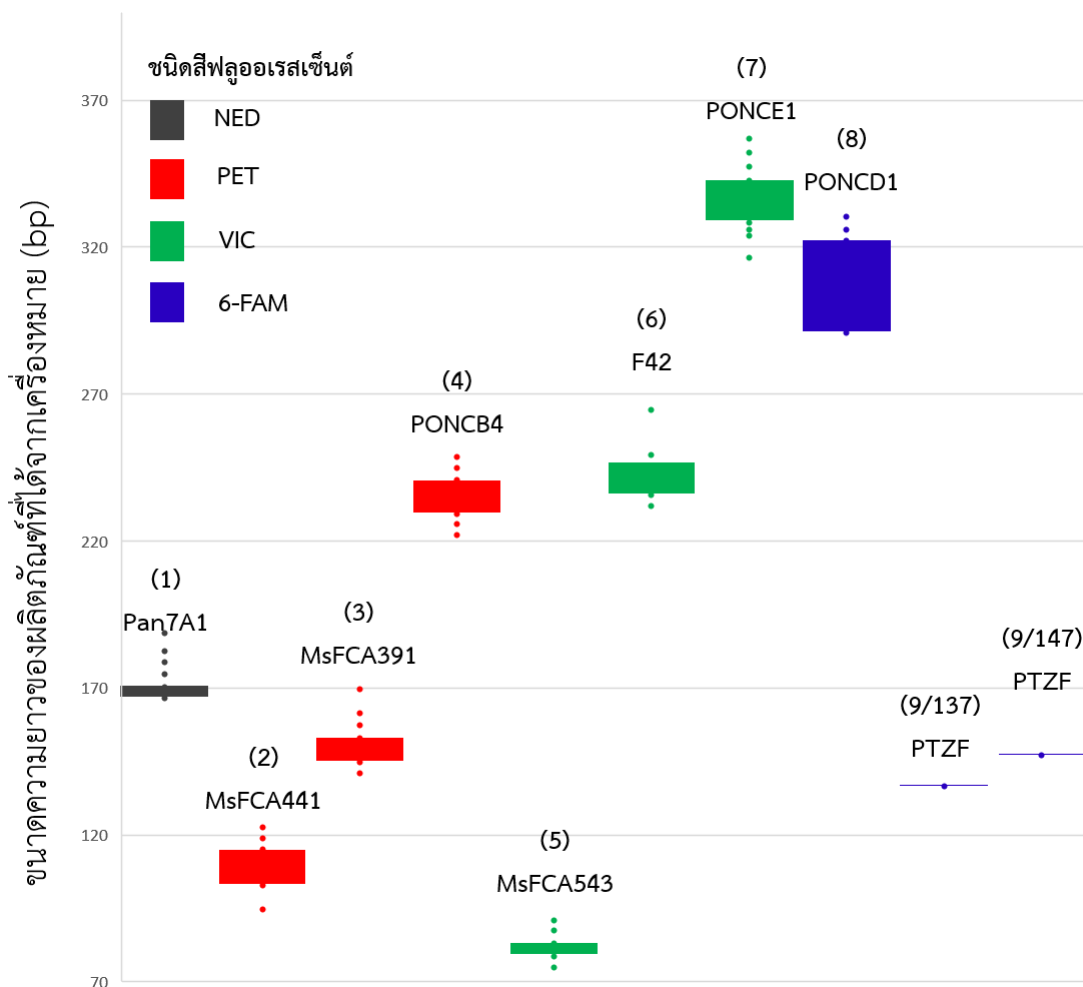
ภาพที่ 22 แสดงผลการวิเคราะห์เครื่องหมาย PTZF กับเลือดดาวเพศผู้

4.2 การวิเคราะห์ผลด้วยวิธีมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ (Multiplex PCR)

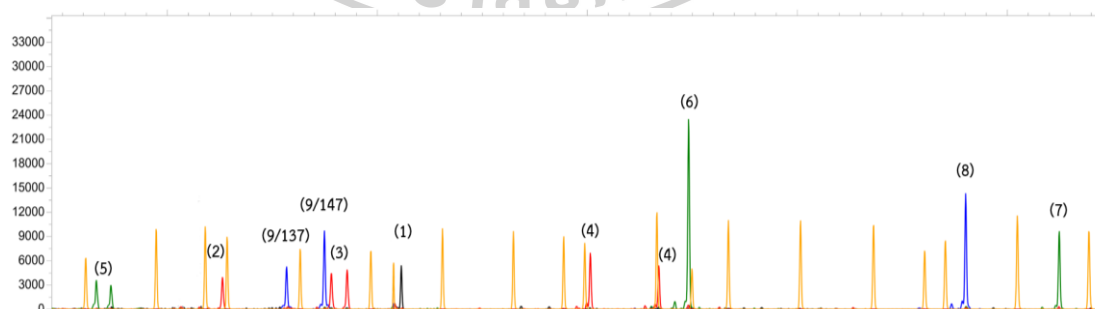
การวิเคราะห์ผลด้วยวิธีมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์มีวัตถุประสงค์เพื่อให้สามารถวิเคราะห์เครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ได้จำนวนหลายเครื่องหมายพร้อม ๆ กัน เป็นการประหยัดเวลา และค่าใช้จ่ายในการตรวจพิสูจน์ การจัดกลุ่มเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ที่เหมาะสมจึงมีความจำเป็นในการวิเคราะห์ผลด้วยวิธีมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์

เนื่องจากเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ที่คัดเลือกได้ในแต่ละเครื่องหมายติดสีฟลูออเรสเซนต์ที่ซ้ำกัน นอกจากนี้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์บางเครื่องหมายมีช่วงความยาวของผลิตภัณฑ์ซ้อนทับกัน ตลอดจนมีอุณหภูมิในขั้นตอน annealing และความไวในการทำปฏิกิริยา (sensitivity) ของแต่ละเครื่องหมายแตกต่างกันด้วย ดังนั้น เมื่อนำเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์มาผสมรวมกันหลายเครื่องหมายในชุดน้ำยาสำหรับเตรียมปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR) ในปริมาณและความเข้มข้นเท่ากัน ผลิตภัณฑ์ที่วิเคราะห์ได้อาจมีช่วงซ้อนทับกันในแต่ละเครื่องหมาย หรืออาจมีความสูงของพีค (peak) ที่ปรากฏต่างกันอย่างชัดเจน ทำให้การแปลผลที่ได้จากเครื่องวิเคราะห์ผลเกิดความผิดพลาดได้ ผู้วิจัยจึงได้นำเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ที่คัดเลือกได้ทั้ง 15 เครื่องหมาย และเครื่องหมาย PTZF สำหรับใช้จำแนกเพศ รวมทั้งหมด 16 เครื่องหมาย มาจัดเรียงตามขนาดความยาวของผลิตภัณฑ์และชนิดสีฟลูออเรสเซนต์ที่ติด เพื่อใช้ในการแบ่งกลุ่มสำหรับการวิเคราะห์ผลด้วยวิธีมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ และนำมาวิเคราะห์ด้วยเครื่องวิเคราะห์สารพันธุกรรม (Applied Biosystems™ 3500XL Genetic Analyzer) โดยทดลองปรับเพิ่ม-ลดปริมาณและความเข้มข้นของเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ ตามขนาดความสูงของพีคที่วิเคราะห์ได้ เครื่องหมายที่มีความสูงพีคมากเกินไปจะถูกปรับลดปริมาณความเข้มข้นของเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์เครื่องหมายนั้น ๆ ในทางตรงข้ามหากเครื่องหมายใดมีความสูงของพีคที่ต่ำมากจะถูกปรับเพิ่มปริมาณและความเข้มข้นของเครื่องหมายที่ใช้ในการวิเคราะห์ผล

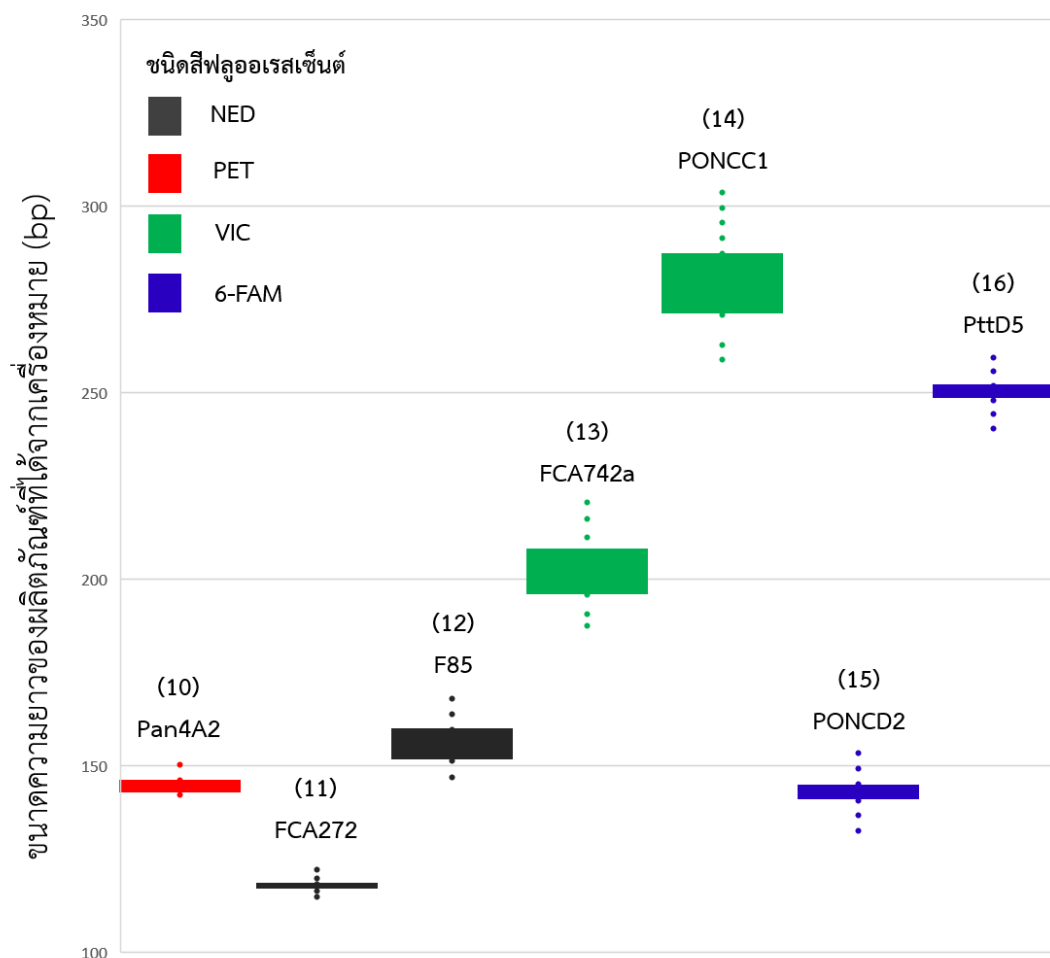
การวิเคราะห์ผลด้วยวิธีมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์สำหรับการศึกษานี้สามารถแบ่งการวิเคราะห์ได้ 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 (Plex I) ประกอบด้วย 9 เครื่องหมาย ได้แก่ PTZF, PONCD1, Pan7A1, MsFCA441, msFCA391, PONCB4, MsFCA453, F42 และ PONCE1 (ภาพที่ 23-24) และกลุ่มที่ 2 (Plex II) ประกอบด้วย 7 เครื่องหมาย ได้แก่ FCA272, F85, Pan4A2, PONCD2, PttD5, FCA742a และ PONCC1 (ภาพที่ 25-26) รายละเอียดขนาดผลิตภัณฑ์ ชนิดสีฟลูออเรสเซนต์ ปริมาณและความเข้มข้นของเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ผลด้วยวิธีมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์แสดงในตารางที่ 9 สำหรับการกำหนดค่าระยะห่างระหว่างช่วงแอลลีลที่เหมาะสม (bin) ได้จากการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยของความยาวผลิตภัณฑ์ในแต่ละแอลลีล $\pm 0.5-1$ bp โดยแต่ละช่วงแอลลีลจะไม่ซ้อนทับกัน ตามที่แสดงในภาคผนวก ข ตารางผนวก ข-1 ถึง ข-16



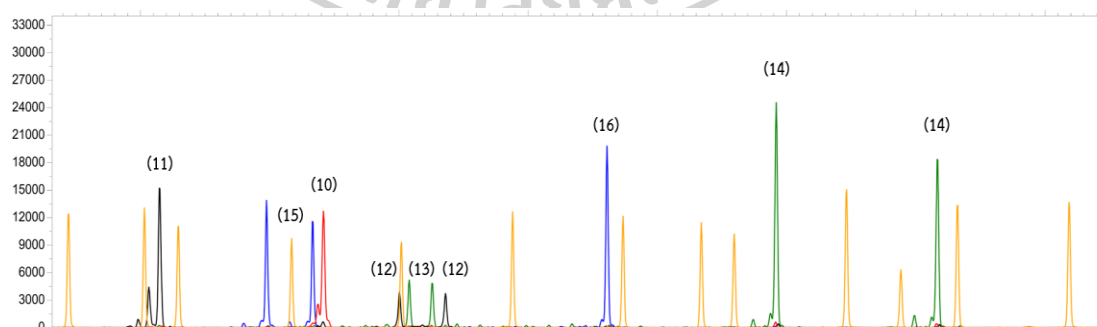
ภาพที่ 23 แสดงชุดเครื่องหมายกลุ่มที่ 1 (Plex I) ที่ไม่มีขนาดผลิตภัณฑ์ซ้อนทับกันในเครื่องหมายที่ติดสีฟลูออเรสเซนต์ชนิดเดียวกัน



ภาพที่ 24 แสดงความสูงและขนาดพิกของชุดเครื่องหมายกลุ่มที่ 1 (Plex I) ที่ได้จากการวิเคราะห์ผลด้วยวิธีมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ด้วยเครื่องวิเคราะห์สารพันธุกรรม กับ GeneScan™ 600 LIZ



ภาพที่ 25 แสดงชุดเครื่องหมายกลุ่มที่ 2 (Plex II) ที่ไม่มีขนาดผลิตภัณฑ์ซ้อนทับกันในเครื่องหมายที่ติดสีฟลูออเรสเซนต์ชนิดเดียวกัน



ภาพที่ 26 แสดงความสูงและขนาดพีคของชุดเครื่องหมายกลุ่มที่ 2 (Plex II) ที่ได้จากการวิเคราะห์ผลด้วยวิธีมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ด้วยเครื่องวิเคราะห์สารพันธุกรรม กับ GeneScan™ 600 LIZ

ตารางที่ 9 แสดงชนิดสีฟลูออเรสเซนต์ และความเข้มข้นที่เหมาะสมของแต่ละเครื่องหมายที่ใช้
ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยวิธีมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์

เครื่องหมาย (Locus)	สีฟลูออเรสเซนต์ (Fluorescent label)	ช่วงความยาว (bp)	ความเข้มข้น (μ M)
ชุดเครื่องหมายกลุ่มที่ 1 (Plex I)			
F42	VIC	231 - 266	0.15
msFCA391	PET	140-170	0.40
MsFCA441	PET	94-124	0.30
MsFCA453	VIC	74-92	0.10
PONCD1	6-FAM	290-332	0.15
PONCB4	PET	221-254	0.40
PONCE1	VIC	315-358	0.25
Pan7A1	NED	161-191	0.10
PTZF	6-FAM	137 / 147	0.30
ชุดเครื่องหมายกลุ่มที่ 2 (Plex II)			
F85	NED	142-169	0.15
FCA272	NED	112-123	0.20
FCA742a	VIC	186-222	0.20
Pan4A2	PET	141-151	0.30
PONCC1	VIC	258-305	0.30
PONCD2	6-FAM	132-155	0.20
PttD5	6-FAM	239-261	0.20

การเตรียมปฏิกิริยาและคอนดิชันที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ด้วยวิธีมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์สำหรับการวิเคราะห์เครื่องหมายพันธุกรรมจำนวน 16 เครื่องหมาย

การเตรียมส่วนผสมปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ด้วยชุดเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรส Qiagen Type-it® Microsatellite PCR Kit ปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร (μ l) โดยความเข้มข้นที่เหมาะสมของแต่ละเครื่องหมายอ้างอิงตามตารางที่ 9

ชุดเครื่องหมายกลุ่มที่ 1 (Plex I)

2x Type-it Multiplex PCR Master Mix	ปริมาตร	12.5	μ l
9x primer mix (X μ M ในแต่ละเครื่องหมาย) *	ปริมาตร	2.5	μ l
RNase-free water	ปริมาตร	3	μ l
5x Q-Solution	ปริมาตร	5	μ l
สารพันธุกรรม (> 10 ng)	ปริมาตร	2	μ l

* ผสม 9 เครื่องหมายรวมกันในปฏิกิริยาเดียวกัน ให้ได้ปริมาตรรวม 2.5 μ l ซึ่งประกอบด้วยเครื่องหมาย F42, msFCA391, MsFCA441, MsFCA453, PONCD1, PONCB4, PONCE1, Pan7A1 และ PTZF

ชุดเครื่องหมายกลุ่มที่ 2 (Plex II)

2x Type-it Multiplex PCR Master Mix	ปริมาตร	12.5	μ l
7x primer mix (X μ M ในแต่ละเครื่องหมาย) **	ปริมาตร	2.5	μ l
RNase-free water	ปริมาตร	3	μ l
5x Q-Solution	ปริมาตร	5	μ l
สารพันธุกรรม (> 10 ng)	ปริมาตร	2	μ l

** ผสม 7 เครื่องหมายรวมกันในปฏิกิริยาเดียวกัน ให้ได้ปริมาตรรวม 2.5 μ l ซึ่งประกอบด้วยเครื่องหมาย F85, FCA272, FCA742a, Pan4A2, PONCC1, PONCD2 และ PttD5

การตั้งโปรแกรมในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR condition) รุ่น Applied Biosystems™ VeritiPro Thermal Cycler ด้วยคอนดิชันเดียวกันทั้ง 2 ชุดเครื่องหมาย

ขั้นที่ 1	Initial heat activation	5	นาที	95	°C
ขั้นที่ 2 *	Denaturation	30	วินาที	95	°C
ขั้นที่ 3 *	Annealing	90	วินาที	57	°C
ขั้นที่ 4 *	Extension	30	วินาที	72	°C
ขั้นที่ 5	Final extension	30	นาที	60	°C

* ขั้นที่ 2-4 ทำซ้ำทั้งหมด 28 รอบ

4.3 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางสายเลือดและการวิเคราะห์ความใกล้เคียงทางพันธุกรรม

4.3.1 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางสายเลือด

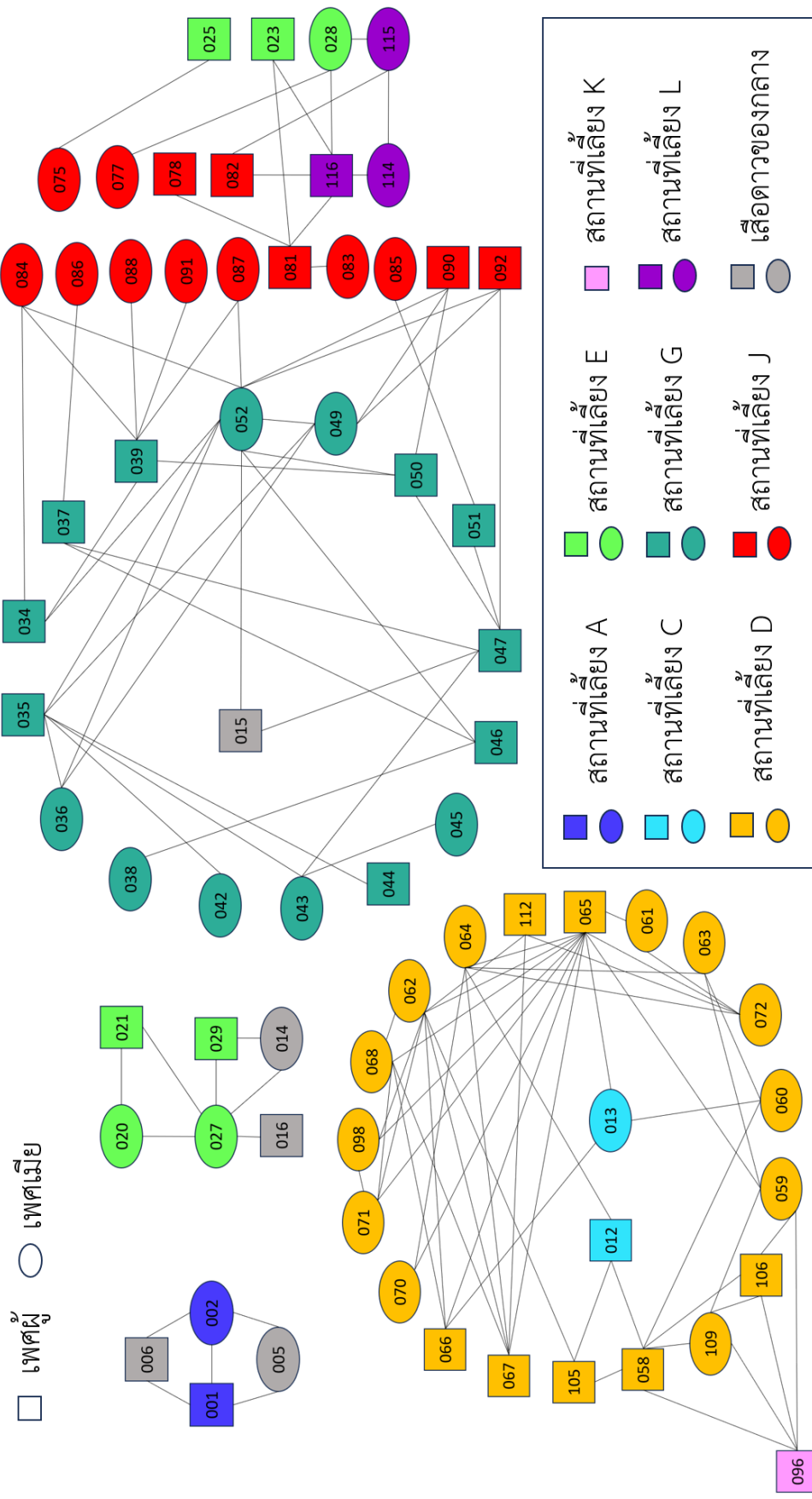
ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางสายเลือดกรณีที่ไม่ทราบข้อมูลของพ่อหรือแม่ที่แท้จริง ด้วยวิธีการทดสอบแบบปกปิดข้อมูล (blind test) เพื่อจับคู่พ่อ-ลูก หรือ แม่-ลูก จากข้อมูลพันธุกรรม ที่วิเคราะห์ได้กับตัวอย่างเลือดดาวทั้งหมด 96 ตัว ด้วยเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์จำนวน 15 เครื่องหมาย พบว่า มีตัวอย่างเลือดดาวจำนวน 124 คู่ มีการแชร์แอลลีลร่วมกันมากกว่า 50% จึงมี โอกาสมีความสัมพันธ์ทางสายเลือดแบบพ่อ-ลูก หรือ แม่-ลูก โดยผลรวมค่า Likelihood Ratio (LR) ในแต่ละคู่มีค่าระหว่าง 49.3569 - 3,470,320,000 ตัวอย่างเช่น เลือดดาวรหัส 025 กับเลือดดาวรหัส 075 มีการแชร์แอลลีลที่ขีดเส้นใต้มากกว่าครึ่ง (76.76%) โดยมีผลรวมค่า LR ที่ได้จากผลคูณรวมของ ค่า LR ในแต่ละเครื่องหมายสูงสุด (ตารางที่ 11)

ตารางที่ 10 แสดงตัวอย่างคู่ของเลือดดาวที่มีโอกาสมีความสัมพันธ์ทางสายเลือดแบบแม่-ลูก หรือ พ่อ-ลูก

เครื่องหมาย (Locus)	Likelihood Ratio (LR)	แอลลีลเลือดดาวเพศผู้ รหัสตัวอย่าง 025	แอลลีลเลือดดาวเพศเมีย รหัสตัวอย่าง 075
F42	3.307947019	<u>250</u> , <u>250</u>	236, <u>250</u>
F85	3.105590062	151, <u>155</u>	<u>155</u> , <u>155</u>
FCA272	2.782729805	<u>117</u> , <u>117</u>	<u>117</u> , <u>117</u>
FCA742a	2.811797753	192, <u>212</u>	204, <u>212</u>
msFCA391	2.423783549	149, <u>153</u>	149, <u>153</u>
msFCA441	10.41666667	<u>119</u> , <u>119</u>	<u>119</u> , 123
MsFCA453	1.187648456	<u>83</u> , 87	<u>83</u> , <u>83</u>
Pan4A2	2.985074627	<u>143</u> , <u>143</u>	<u>143</u> , <u>143</u>
Pan7A1	2.395683453	<u>166</u> , <u>166</u>	<u>166</u> , <u>166</u>
PONCB4	1.700680272	222, <u>242</u>	238, <u>242</u>
PONCC1	9.705113848	<u>291</u> , <u>295</u>	<u>291</u> , <u>295</u>
PONCD1	21.29787234	<u>327</u> , <u>327</u>	<u>327</u> , <u>327</u>
PONCD2	2.906976744	<u>137</u> , <u>137</u>	<u>137</u> , 149
PttD5	11.23595506	<u>241</u> , <u>241</u>	<u>241</u> , <u>241</u>
PONCE1	17.535	<u>352</u> , <u>352</u>	<u>352</u> , <u>352</u>
ผลรวมค่า Likelihood Ratio (LR)		3,470,322,025	
เปอร์เซ็นต์ความน่าจะเป็นพ่อ-ลูก หรือ แม่-ลูก		99.99999997	

อย่างไรก็ตาม จำนวนประชากรเสือดาวในประเทศไทยทั้งหมดมีประมาณ 1,000 ตัว ซึ่งผลรวมค่า LR ที่ยอมรับได้จะต้องมีค่าไม่ต่ำกว่าจำนวนประชากรเสือดาวที่ตรวจพิสูจน์ทั้งหมด ดังนั้น จึงมีตัวอย่างเสือดาวทั้งหมด 112 คู่ ที่มีความสัมพันธ์ทางสายเลือดสอดคล้องเป็นแม่-ลูก หรือ พ่อ-ลูก ทั้ง 12-15 เครื่องหมาย ที่ยอมรับได้ โดยมีค่า LR ระหว่าง 1,087.56-3,470,320,000 และมีเปอร์เซ็นต์ความน่าจะเป็นแม่-ลูก หรือ พ่อ-ลูก ระหว่าง 99.91-100% (ภาคผนวก ข ตารางผนวก ข-1) และเมื่อนำผลที่วิเคราะห์ได้มาเชื่อมโยงกับสถานที่เลี้ยงเป็นแผนภาพ มีสถานที่เลี้ยงที่มีเสือดาวที่มีความสัมพันธ์ทางสายเลือดแบบพ่อ-ลูก หรือ แม่-ลูก จำนวน 8 แห่ง ได้แก่ สถานที่เลี้ยง A, C, D, E, G, J, K และ L นอกจากนี้ยังพบความเชื่อมโยงระหว่างเสือดาวของกลาง (S) จำนวน 5 ตัวอย่าง ได้แก่ 005, 006, 014, 015 และ 016 กับสถานที่เลี้ยง 3 แห่ง ได้แก่ สถานที่เลี้ยง A, E และ G โดยสถานที่เลี้ยง G และ J มีความเชื่อมโยงกันมากที่สุด รวมถึงมีความเชื่อมโยงกับสถานที่เลี้ยง E และ L ด้วย ซึ่งชี้ให้เห็นว่า มีการแลกเปลี่ยนเสือดาวระหว่างสถานที่เลี้ยง อย่างไรก็ตามสถานที่เลี้ยง D ไม่มีความเกี่ยวข้องกับสถานที่เลี้ยงดังกล่าว ส่วนตัวอย่างของกลางที่มีการเชื่อมโยงกับสถานที่เลี้ยงนั้น ผู้วิจัยได้ตรวจสอบประวัติการตรวจยึดของกลางพบว่า เสือดาวของกลางทั้ง 5 ตัวอย่างตรวจยึดได้จากสถานที่เลี้ยงที่เชื่อมโยงกันจริง สำหรับกรณีลูกเสือดาวของกลางรหัส 108, 110 และ 111 ซึ่งตรวจยึดได้ในปี 2564 ไม่พบความเชื่อมโยงกับสถานที่เลี้ยงใด ๆ ทั้งนี้ อาจเนื่องมาจากตัวอย่างที่ศึกษาในครั้งนี้ไม่ครอบคลุมเสือดาวทุกตัว และทุกสถานที่เลี้ยงของประเทศไทย ประกอบกับตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาที่เก็บในปี 2564 มีเพียง 2 แห่ง คือ สถานที่เลี้ยง D และ L รวม 4 ตัวเท่านั้น (ภาพที่ 27)





ภาพที่ 27 แสดงแผนภาพความสัมพันธ์ทางสายเลือดแบบแม่-ลูก หรือ พ่อ-ลูก ระหว่างสถานที่เลี้ยงและเสือดาวของกลางที่ได้จากการตรวจดีดี

4.3.2 การวิเคราะห์ความใกล้ชิดทางพันธุกรรม

ความใกล้ชิดทางพันธุกรรมวิเคราะห์ได้จากซอฟต์แวร์ Population 1.2.32 ด้วยวิธี Distance methods ของ Nei et al's, Da (1983) และสร้างแผนภูมิต้นไม้สายวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) แบบ Neighbor Joining (NJ) โดยกำหนดค่า bootstraps เท่ากับ 1,000 ครั้ง ผลที่ได้จากการวิเคราะห์ดังกล่าวสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางสายเลือดแบบพ่อ-ลูก หรือ แม่-ลูก คือ เสือดาวของสถานที่เลี้ยง G และ J มีพันธุกรรมใกล้ชิดกัน นอกจากนี้เสือดาวของสถานที่เลี้ยง J ยังมีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับเสือดาวของสถานที่เลี้ยงอีกหลายแห่ง ได้แก่ สถานที่เลี้ยง D, E, G, I และ L จึงมีความเป็นไปได้ว่ามีการแลกเปลี่ยนเสือดาวระหว่างสถานที่เลี้ยง ขณะที่เสือดาวของกลางเกือบทั้งหมดมีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับเสือดาวในกรงเลี้ยงของประเทศไทย ยกเว้น เสือดาวของกลางรหัส 073 มีพันธุกรรมใกล้ชิดกับเสือดาวในธรรมชาติ เมื่อตรวจสอบประวัติการตรวจยึดพบว่า เสือดาวของกลางรหัสดังกล่าวตรวจยึดได้จากคดีการล่าสัตว์ในพื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าทุ่งใหญ่นเรศวร ซึ่งจากแผนภูมิต้นไม้สายวิวัฒนาการชี้ให้เห็นว่า เสือดาวในธรรมชาติมีพันธุกรรมแยกออกมาจากเสือดาวในกรงเลี้ยงของประเทศไทยอย่างชัดเจน ประชากรเสือดาวในธรรมชาติมีพันธุกรรมที่เป็นเอกลักษณ์เฉพาะ และไม่มีความเชื่อมโยงทางพันธุกรรมของเสือดาวในกรงเลี้ยงของประเทศไทย (ภาพที่ 28)



บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย

5.1 เครื่องหมายพันธุกรรมที่เหมาะสมในการตรวจพิสูจน์เลือดดาวในงานนิติวิทยาศาสตร์

เครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์สำหรับการใช้ในการตรวจพิสูจน์พันธุกรรมเลือดดาวที่ผ่านการคัดเลือกจากการศึกษาครั้งนี้มีจำนวนทั้งหมด 15 เครื่องหมาย ได้แก่ F42, F85, FCA272, FCA742a, msFCA391, msFCA441, MsFCA453, Pan4A2, Pan7A1, PONCB4, PONCC1, PONCD1, PONCD2, PttD5 และ PONCE1 มีจำนวนแอลลีลระหว่าง 3-13 แอลลีล แม้ว่าเครื่องหมายดังกล่าวจะมีประสิทธิภาพเพียงพอสำหรับการตรวจพิสูจน์เพื่อระบุตัวและการตรวจพิสูจน์ความสัมพันธ์ทางสายเลือดระหว่างพ่อ-ลูก หรือ แม่-ลูก ของประชากรเลือดดาวในประเทศไทยที่มีจำนวนประชากรประมาณ 1,000 ตัว ขณะที่ประชากรเลือดดาวทั้งหมดทั่วโลกมีมากกว่า 700,000 ตัว อย่างไรก็ตามเลือดดาวของกลางที่ประเทศไทยตรวจยึดได้อาจมีที่มาจากภูมิภาคอื่น ๆ ซึ่งการตรวจพิสูจน์เพื่อระบุตัวเลือดดาวที่ครอบคลุมประชากรเลือดดาวทั่วโลก กรณีที่ไม่มีความสัมพันธ์แบบพี่น้องใช้เครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์จำนวน 5 เครื่องหมาย (PONCE1, PONCC1, FCA742a, PONCB4 และ F42) ให้ประสิทธิภาพสูงกว่าการระบุตัวระหว่างพี่น้อง ซึ่งต้องใช้เครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ขั้นต่ำจำนวน 15 เครื่องหมาย (PONCE1, PONCC1, FCA742a, PONCB4, F42, msFCA391, F85, msFCA441, PONCD1, Pan7A1, PONCD2, PttD5, MsFCA453, FCA272 และ Pan4A2) ส่วนการตรวจพิสูจน์ความสัมพันธ์ทางสายเลือดระหว่างแม่-ลูก หรือ พ่อ-ลูก กรณีที่ไม่ทราบทั้งพ่อและแม่ (First Parent) และกรณีที่ทราบเฉพาะพ่อหรือแม่ (Second Parent) ต้องใช้เครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์มากกว่า 15 เครื่องหมาย ขณะที่การตรวจพิสูจน์ในกรณีทราบทั้งพ่อและแม่ (Pair Parent) ใช้เพียง 8 เครื่องหมาย (PONCE1, PONCC1, FCA742a, PONCB4, F42, msFCA391, F85 และ msFCA441) ซึ่งการตรวจพิสูจน์ความสัมพันธ์ทางสายเลือดระหว่างแม่-ลูก หรือ พ่อ-ลูก ด้วยเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์จำนวน 15 เครื่องหมายข้างต้น ในกรณีที่ทราบทั้งพ่อและแม่ (Pair Parent) จะมีประสิทธิภาพการตรวจพิสูจน์สูงกว่ากรณีที่ทราบเฉพาะพ่อหรือแม่ (Second Parent) และกรณีที่ไม่ทราบทั้งพ่อและแม่ (First Parent) นั้น ให้ประสิทธิภาพในการตรวจพิสูจน์ต่ำที่สุดสำหรับการตรวจพิสูจน์เพื่อระบุเพศเลือดดาวสามารถใช้เครื่องหมายพันธุกรรม PTZF ซึ่งเป็นเครื่องหมายเดียวกันกับที่ศูนย์นิติวิทยาศาสตร์สัตว์ป่า กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืชใช้ในการตรวจพิสูจน์เพื่อระบุเพศของเสือโคร่ง

5.2 การตรวจพิสูจน์พันธุกรรมเลือดด้วยวิธีมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ (Multiplex PCR)

การวิเคราะห์เครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ด้วยวิธีมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ช่วยประหยัดเวลาและค่าใช้จ่าย การศึกษาในครั้งนี้วิเคราะห์ผลกับเครื่องวิเคราะห์สารพันธุกรรม (Applied Biosystems™ 3500XL Genetic Analyzer) ซึ่งสามารถตรวจจับสีฟลูออเรสเซนซ์ที่แตกต่างกันได้มากที่สุด 5 ชนิด (Dye Set G5) ได้แก่ 6-FAM, VIC, NED, PET และ LIZ โดยใช้ขนาดดีเอ็นเอมาตรฐานชนิด GeneScan™ 600 LIZ™ dye Size Standard v2.0 ผลจากการศึกษาวิจัยสามารถแบ่งเครื่องหมายพันธุกรรมที่ใช้สำหรับตรวจพิสูจน์พันธุกรรมเลือดได้ 2 กลุ่ม ซึ่งมีความเข้มข้นในปฏิกิริยาถูกใช้พอลิเมอเรสที่เหมาะสมแตกต่างกันตั้งแต่ 0.1-0.4 μM โดยชุดเครื่องหมายกลุ่มแรก (Plex I) จำนวน 9 เครื่องหมาย ประกอบด้วยเครื่องหมาย F42 (0.15 μM), msFCA391 (0.4 μM), MsFCA441 (0.3 μM), MsFCA453 (0.1 μM), PONCD1 (0.15 μM), PONCB4 (0.4 μM), PONCE1 (0.25 μM), Pan7A1 (0.1 μM) และ PTZF (0.3 μM) ชุดเครื่องหมายกลุ่มที่ 2 (Plex II) จำนวน 7 เครื่องหมาย ประกอบด้วยเครื่องหมาย F85 (0.15 μM), FCA272 (0.2 μM), FCA742a (0.2 μM), Pan4A2 (0.3 μM), PONCC1 (0.3 μM), PONCD2 (0.2 μM) และ PttD5 (0.2 μM) และความเข้มข้นของสารพันธุกรรมที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาไม่น้อยกว่า 10 ng ภายใต้เงื่อนไขปฏิกิริยาอ้างอิงตามชุดเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส Qiagen Type-it® Microsatellite PCR Kit โดยตั้งอุณหภูมิในขั้นตอน annealing ที่ 57 °C ผลที่ได้จากปฏิกิริยาดังกล่าวพบว่า แต่ละเครื่องหมายมีขนาดความสูงของพีค (Peaks) > 3,000 RFU และไม่มีการซ้อนทับกันของขนาดผลิตภัณฑ์ที่ติดสีฟลูออเรสเซนซ์ชนิดเดียวกัน

5.3 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางสายเลือดและการวิเคราะห์ความใกล้ชิดทางพันธุกรรม

ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางสายเลือดแบบพ่อ-ลูก และแม่-ลูก ด้วยวิธีการวิเคราะห์แบบปกปิดข้อมูล (blind test) กับตัวอย่างเลือดดาวของประเทศไทยทั้งหมด 96 ตัวอย่าง โดยการวิเคราะห์ทีละคู่ เลือดดาวที่มีความสัมพันธ์แบบพ่อ-ลูก หรือ แม่-ลูก จะมีการแชร์แอลลีลระหว่างกันมากกว่าครึ่ง จากข้อมูลทีวิเคราะห์ผลได้พบว่า มีเลือดดาวจำนวน 124 คู่ ที่มีพันธุกรรมสอดคล้องเป็นแม่-ลูก หรือ พ่อ-ลูก ทั้ง 12-15 เครื่องหมาย และมีเปอร์เซ็นต์การแชร์แอลลีลระหว่าง 53.33-76.67% จึงมีโอกาสความน่าจะเป็นเป็นพ่อ-ลูก หรือ แม่-ลูก อย่างไรก็ตาม มีเพียง 112 คู่เท่านั้นที่มีความน่าจะเป็นพ่อ-ลูก หรือ แม่-ลูก โดยมีค่า LR มากกว่า 1,000 คู่พ่อ-ลูก หรือ แม่-ลูก หลายคู่มาจากสถานที่เลี้ยงต่างกัน รวมถึงมีเลือดดาวของกลางที่มีความสัมพันธ์พ่อ-ลูก หรือ แม่-ลูก กับเลือดดาวในกรงเลี้ยงด้วย สอดคล้อง

กับผลการวิเคราะห์ความใกล้ชิดทางพันธุกรรมที่แสดงให้เห็นว่า เสือดาวจากสถานที่เลี้ยงต่างกันบางตัว มีพันธุกรรมใกล้ชิดกัน จากข้อมูลการวิเคราะห์ดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า มีการแลกเปลี่ยนเสือดาว ระหว่างสถานที่เลี้ยง สำหรับประชากรเสือดาวในธรรมชาติพบว่า มีพันธุกรรมที่แยกกันอย่างชัดเจน จากประชากรเสือดาวในกรงเลี้ยงของประเทศไทย ดังนั้น การวิเคราะห์เครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ ของเสือดาวอาจใช้ในการตรวจพิสูจน์เพื่อจำแนกระหว่างประชากรเสือดาวในกรงเลี้ยงกับประชากร เสือดาวในธรรมชาติได้หากมีฐานข้อมูลพันธุกรรมที่มากพอ

5.4 ข้อเสนอแนะ

5.4.1 แนวทางการพัฒนาเครื่องหมายพันธุกรรมของเสือดาวในงานนิติวิทยาศาสตร์

จากผลการศึกษาในครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่า เครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์จำนวน 15 เครื่องหมายนั้น ไม่เพียงพอต่อการตรวจพิสูจน์ความสัมพันธ์ทางสายเลือดระหว่างพ่อ-ลูก หรือ แม่-ลูก ในกรณีที่ไม่ทราบทั้งพ่อและแม่ของประชากรเสือดาวทั่วโลก แม้ว่าเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ จะนิยมใช้ในงานนิติวิทยาศาสตร์กันอย่างแพร่หลาย ถึงกระนั้นเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ก็มี จุดอ่อนในเรื่องของอัตราการกลายพันธุ์ที่สูง (high mutation rate) ซึ่งทำให้เกิดรูปแบบการซ้ำของ นิวคลีโอไทด์ที่ไม่สมบูรณ์ (Imperfect) มีผลต่อการอ่านแอลลีล หรืออาจไม่สามารถใช้เครื่องหมายนั้น ๆ วิเคราะห์ผลกับตัวอย่างที่เกิดการกลายพันธุ์ได้ (null allele) ปัจจุบันซอฟต์แวร์ที่ใช้วิเคราะห์ผลหลาย ซอฟต์แวร์สามารถบ่อนค่าอัตราการกลายพันธุ์ในแต่ละเครื่องหมายเพื่อการวิเคราะห์ที่แม่นยำได้ ดังนั้น การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ของเสือดาวจึงควรมีการศึกษาอัตราการกลายพันธุ์ ในแต่ละเครื่องหมายด้วย นอกจากนี้ตัวอย่างที่ใช้ในการพัฒนาเครื่องหมายพันธุกรรมควรมีจำนวน ที่มากพอและครอบคลุมกับประชากรเสือดาวทั่วทั้งโลกให้มากที่สุด รวมถึงต้องมีการพัฒนา allelic ladder เพื่อลดปัญหาการคลาดเคลื่อนจากเครื่องมือที่ใช้วิเคราะห์ผลในห้องปฏิบัติการ ทำให้การอ่าน แอลลีลมีความแม่นยำมากยิ่งขึ้น การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ในงานนิติวิทยาศาสตร์ ยังต้องคำนึงถึงความไว (sensitivity) ในการวิเคราะห์ผลด้วย โดยเฉพาะการวิเคราะห์ผลในตัวอย่าง ที่มีคุณภาพต่ำ หรือสารพันธุกรรมเสื่อมสภาพ ซึ่งอาจให้ผลการวิเคราะห์ที่ผิดพลาดได้ (allelic dropout) จึงควรมีการทดสอบความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่น้อยที่สุดที่เครื่องหมายนั้น ๆ สามารถตรวจ พิสูจน์ได้และยังคงให้ผลที่แม่นยำ อย่างไรก็ตาม เครื่องหมายสนิปส์เป็นอีกทางเลือกหนึ่งสำหรับใช้ในงานนิติวิทยาศาสตร์ที่เข้ามาช่วยลดจุดอ่อนของเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ แต่เนื่องจาก เครื่องหมายสนิปส์มีความหลากหลายในแต่ละเครื่องหมายต่ำ จึงจำเป็นต้องใช้เครื่องหมายสนิปส์

จำนวนมากในการวิเคราะห์ผล ทำให้ต้องใช้เทคโนโลยีค่อนข้างสูงในการวิเคราะห์ผล ปัจจุบันเครื่องหมายสปีชีส์ยังคงเป็นเพียงเครื่องมือเสริมในการตรวจพิสูจน์ในงานนิติวิทยาศาสตร์เท่านั้น

การรายงานผลการตรวจพิสูจน์เพื่อระบุตัวและการตรวจพิสูจน์ความสัมพันธ์ทางสายเลือดระหว่างพ่อ-ลูก หรือ แม่-ลูก จำเป็นต้องรายงานค่า Likelihood Ratio (LR) ด้วย แม้ว่าผลการวิเคราะห์เครื่องหมายพันธุกรรมทุกเครื่องหมายจะไม่ปฏิเสธความสัมพันธ์แบบพ่อ-ลูก หรือ แม่-ลูก แต่ค่า LR จะชี้ให้เห็นถึงความน่าเชื่อถือของผลการตรวจพิสูจน์ในกรณีนั้น ๆ ได้เป็นอย่างดี โดยเฉพาะการตรวจพิสูจน์กับประชากรสัตว์ในกรงเลี้ยง ซึ่งมีโอกาสเกิดการผสมพันธุ์แบบเลือดชิดสูง พันธุกรรมในแต่ละตัวจึงใกล้เคียงกันมาก ทำให้ประสิทธิภาพของเครื่องหมายที่ใช้ในการตรวจพิสูจน์ลดลงด้วย

เสือดาวของกลางที่ได้จากการตรวจยึดอาจะมีที่มาจากทั่วโลก เนื่องจากประเทศไทยมีทั้งกรณีการลักลอบนำเข้าและส่งออกเสือดาว ซึ่งประชากรเสือดาวในธรรมชาติสามารถจำแนกเป็น 9 ชนิดพันธุ์ย่อย (subspecies) โดยแต่ละชนิดพันธุ์ย่อยมีพื้นที่กระจายพันธุ์ที่จำเพาะกับภูมิภาค และการทราบชนิดพันธุ์ย่อยสามารถเชื่อมโยงถึงแหล่งที่มาเสือดาวของกลางได้ จึงควรมีการพัฒนาเครื่องหมายพันธุกรรมสำหรับการจำแนกชนิดพันธุ์ย่อยของเสือดาว รวมถึงการตรวจพิสูจน์เพื่อระบุตัวและการหาความสัมพันธ์ทางสายเลือดระหว่างพ่อ-ลูก หรือ แม่-ลูก ในงานนิติวิทยาศาสตร์ ควรครอบคลุมกับตัวอย่างเสือดาวที่มีที่มาจากนอกประเทศไทย หรือเสือดาวสายพันธุ์ย่อยอื่น ๆ ด้วย

5.4.2 แนวทางการใช้ประโยชน์ข้อมูลพันธุกรรมเสือดาวในการบังคับใช้กฎหมายของประเทศไทย

เนื่องจากประเทศไทยถูกจับตามองว่าเป็นแหล่งเพาะพันธุ์และลักลอบส่งออกเสือดาวที่มีชีวิต มีการตั้งข้อสังเกตว่า ลูกเสือดาวที่ลักลอบส่งออกจากประเทศไทยนั้น อาจมีแหล่งที่มาจากการลักลอบเพาะพันธุ์เสือดาวในสถานที่เลี้ยงที่ได้รับอนุญาตถูกต้องตามกฎหมาย แม้ว่าปัจจุบันการเลี้ยงเสือดาวจะสามารถดำเนินการได้ภายใต้สถานประกอบการกิจการสวนสัตว์หากได้รับอนุญาตอย่างถูกต้องถึงกระนั้น เสือดาว จัดเป็นสัตว์ป่าคุ้มครองตามพระราชบัญญัติสงวนและคุ้มครองสัตว์ป่า พ.ศ. 2562 อย่างไรก็ตาม เสือดาวไม่จัดอยู่ในประเภทสัตว์ป่าคุ้มครองที่อนุญาตให้เพาะพันธุ์ได้ตามประกาศกระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม เรื่อง กำหนดชนิดของสัตว์ป่าคุ้มครองให้เป็นสัตว์ป่าที่เพาะพันธุ์ได้ พ.ศ. 2567 นอกจากนี้ เสือดาวยังจัดอยู่ในบัญชีแนบท้ายของอนุสัญญาไซเตสหมายเลข 1 ห้ามส่งออกด้วยวัตถุประสงค์ทางการค้าโดยเด็ดขาด

การควบคุมการลักลอบเพาะพันธุ์และการค้าเสือดาวในปัจจุบันอยู่ในความดูแลของกรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช โดยมีการฝังรหัสไมโครชิพเพื่อใช้ในการระบุตัวเสือดาวร่วมกับการจัดทำทะเบียนประวัติข้อมูลเสือดาว ได้แก่ ชื่อผู้ครอบครอง ชื่อเสือดาว ชื่อพ่อ-แม่ ของเสือดาว

รหัสไมโครชิพ ร่วมกับการลงพื้นที่ตรวจสอบของเจ้าหน้าที่ แม้ว่าการฝังรหัสไมโครชิพจะสามารถใช้ในการระบุตัวเสือดาวได้ แต่ในทางปฏิบัติมักประสบปัญหาสแกนรหัสไมโครชิพไม่เจอ จึงต้องฝังไมโครชิพรหัสใหม่ ทำให้เสือดาวบางตัวมีรหัสไมโครชิพมากกว่าหนึ่งรหัส สร้างความสับสนให้กับเจ้าหน้าที่ผู้ตรวจสอบ นอกจากนี้รหัสไมโครชิพยังสามารถสับเปลี่ยนตัวเสือดาวได้ ประกอบกับข้อมูลรหัสไมโครชิพไม่สามารถตรวจสอบได้ว่า เสือดาวเหล่านั้นมีที่มาตามที่กล่าวอ้างจริงหรือไม่ จึงเป็นช่องให้มีการสวมทะเบียนเสือดาวได้ง่าย อาจก่อให้เกิดการฟอกเสือดาวที่มีที่มาแบบผิดกฎหมายให้ถูกต้องตามกฎหมาย ดังนั้น หากมีการจัดทำฐานข้อมูลพันธุ์กรรมเสือดาวควบคู่ไปกับการจัดทำทะเบียนประวัติของเสือดาวในกรงเลี้ยงด้วย จะสามารถตรวจสอบแหล่งที่มาของเสือดาวที่ต้องสงสัยได้ นอกจากนี้ฐานข้อมูลพันธุ์กรรมยังใช้ประโยชน์ในการเปรียบเทียบ เชื่อมโยงกับเสือดาวของกลางได้อีกด้วย โดยใช้วิธีการตรวจพิสูจน์เพื่อระบุตัว หรือการตรวจพิสูจน์ความสัมพันธ์ทางสายเลือดระหว่างพ่อ-ลูก หรือ แม่-ลูก เพื่อหาแหล่งที่มาเสือดาวของกลาง ขยายผลไปยังผู้ประกอบการรายใหญ่ ทำให้การบังคับใช้กฎหมายเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

ข้อมูลการศึกษาครั้งนี้ยังชี้ให้เห็นว่า เสือดาวในธรรมชาติมีพันธุ์กรรมต่างจากประชากรเสือดาวในกรงเลี้ยงอย่างชัดเจน ซึ่งอาจใช้ประโยชน์ในการจำแนกระหว่างประชากรเสือดาวในกรงเลี้ยงกับเสือดาวในธรรมชาติได้ ทั้งนี้ เพื่อประโยชน์ในการวางแผนป้องกันและติดตามหากมีกรณีลักลอบนำเสือดาวในธรรมชาติมาสวมทะเบียนเป็นเสือดาวในกรงเลี้ยง

5.4.3 แนวทางการใช้ประโยชน์ข้อมูลพันธุ์กรรมเสือดาวในการอนุรักษ์เสือดาว

ข้อมูลพันธุ์กรรมมีประโยชน์ในการวางแผนการจัดการประชากรเสือดาวในกรงเลี้ยงและประชากรเสือดาวในธรรมชาติ โดยใช้ในการวางแผนจับคู่ผสมพันธุ์ให้เกิดความหลากหลายทางพันธุ์กรรม ลดโอกาสการผสมแบบเลือดชิด นอกจากนี้ยังสามารถใช้ในการประเมินและทำนายจำนวนประชากรเสือดาวในธรรมชาติได้อีกด้วย

รายการอ้างอิง

Uncategorized References

Allan, C. (n.d.). *Combating Illegal Wildlife Trade Online: Support from NGOs and the Tech Sector*.

extension://bfdogplmndidlpijhoijckpakkdjkkil/pdf/viewer.html?file=http
s%3A%2F%2Fcites.org%2Fsites%2Fdefault%2Ffiles%2Feng%2Fprog%2F
enforcement%2FWEN%2520Meeting%2520Online%2520Coalition%252
0Aug%252022%25202019.pdf

Baruch, E., & Weller, J. (2008). Estimation of the number of SNP genetic markers required for parentage verification. *Animal Genetics*, 39(5), 474-479.

Borries, C., & Koenig, A. (2014). Opportunistic sampling of felid sightings can yield estimates of relative abundance. *Cat News*, 61, 34-37.

Botstein, D., White, R. L., Skolnick, M., & Davis, R. W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American journal of human genetics*, 32(3), 314.

Budowle, B., Garofano, P., Hellman, A., Ketchum, M., Kanthaswamy, S., Parson, W., Van Haeringen, W., Fain, S., & Broad, T. (2005). Recommendations for animal DNA forensic and identity testing. *International Journal of Legal Medicine*, 119, 295-302.

C4ADS. (2024). Wildlife Seizure Dashboard. <https://wildlifedashboard.c4ads.org/>

Canturk, K. M., Emre, R., Kinoglu, K., Başpınar, B., Sahin, F., & Ozen, M. (2014). Current status of the use of single-nucleotide polymorphisms in forensic practices. *Genetic testing and molecular biomarkers*, 18(7), 455-460.

Castelló, J. R. (2020). *Felids and Hyenas of the world: wildcats, panthers,*

lynx, pumas, ocelots, caracals, and relatives. Princeton University Press.

Choi, N.-R., Hoque, M. R., Seo, D.-W., Sultana, H., Park, H.-B., Lim, H.-T., Heo, K.-N., Kang, B.-S., Jo, C., & Lee, J.-H. (2012). ISAG-recommended microsatellite marker analysis among five Korean native chicken lines. *Journal of Animal Science and Technology*, 54(6), 401-409.

Cooper, T., Wiggans, G., & VanRaden, P. (2013). Relationship of call rate and accuracy of single nucleotide polymorphism genotypes in dairy cattle. *Journal of dairy science*, 96(5), 3336-3339.

Corner, S., Yuzbasiyan-Gurkan, V., Agnew, D., & Venta, P. J. (2019). Development of a 12-plex of new microsatellite markers using a novel universal primer method to evaluate the genetic diversity of jaguars (*Panthera onca*) from North American zoological institutions. *Conservation Genetics Resources*, 11, 487-497.

Davis, B. W., Li, G., & Murphy, W. J. (2010). Supermatrix and species tree methods resolve phylogenetic relationships within the big cats, *Panthera* (Carnivora: Felidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 56(1), 64-76.

DNP news. (2565). กรมอุทยานฯ สนธิกำลังยึดซากเสือ 6 ผืน กลางรีสอร์ตสงขลาบุรี นำส่งพิสูจน์ DNA เทียบฐานข้อมูล. Retrieved 21 Feb 2024 from <http://news.dnp.go.th/news/13463>

Dutta, T., Sharma, S., Maldonado, J. E., Wood, T. C., & Seidensticker, J. (2012). A reliable method for individual identification and gender determination of wild leopards (*Panthera pardus fusca*) using non-invasive samples. *Conservation Genetics Resources*, 4, 665-667.

Emigh, T. H. (1980). A comparison of tests for Hardy-Weinberg equilibrium. *Biometrics*, 627-642.

Environmental Investigation Agency UK. (2018a). *Down to the bone: China's alarming trade in leopard bones*. Retrieved 21 Feb 2024 from

Environmental Investigation Agency UK. (2018b). *Leopard Seizures, 1999-2018*. Retrieved 21 Feb 2024 from

<https://tomaszjohnson.carto.com/builder/ba7f2e43-27d5-47e5-8308-33373fe33098/embed?state=%7B%22map%22%3A%7B%22ne%22%3A%5B-12.056509922029075%2C47.86523759365082%5D%2C%22sw%22%3A%5B40.29963941539412%2C103.93945634365082%5D%2C%22center%22%3A%5B15.775339778051016%2C75.90234696865083%5D%2C%22zoom%22%3A4%7D%7D>

Evett, I., & Weir, B. S. (1998). Interpreting DNA evidence: statistical genetics for forensic scientists. (No Title).

Flanagan, S. P., & Jones, A. G. (2019). The future of parentage analysis: From microsatellites to SNPs and beyond. *Molecular ecology*, 28(3), 544-567.

Garcia, A. A., Benchimol, L. L., Barbosa, A. M., Geraldi, I. O., Souza Jr, C. L., & Souza, A. P. d. (2004). Comparison of RAPD, RFLP, AFLP and SSR markers for diversity studies in tropical maize inbred lines. *Genetics and Molecular Biology*, 27, 579-588.

Hamlin, B. C., Meredith, E. P., Rodzen, J., & Strand, J. M. (2021). OdoPlex: An STR multiplex panel optimized and validated for forensic identification and sex determination of North American mule deer (*Odocoileus hemionus*) and white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *Forensic Science International: Animals and Environments*, 1, 100026.

Hardy, G. H. (1908). Mendelian proportions in a mixed population. *Science*, 28(706), 49-50.

Hartl, D. L., Clark, A. G., & Clark, A. G. (1997). *Principles of population genetics*

- (Vol. 116). Sinauer associates Sunderland, MA.
- Hyun, J. Y., Pandey, P., Kim, K. S., Chon, A., Jeong, D., Bhak, J., Yu, M., Song, H. K., Singh, R., & Min, M.-S. (2021). Whole genome survey of big cats (Genus: *Panthera*) identifies novel microsatellites of utility in conservation genetic study. *Scientific reports*, 11(1), 14164.
- ICAR. (2015). *ICAR Rules and Guidelines for Microsatellite Parentage Testing in Cattle*. ICAR DNA Working Group. Retrieved 24 January from
- ICAR. (2017). *ICAR Guidelines for Parentage Verification and Parentage Discovery Based on SNP Genotypes*. ICAR DNA Working Group. Retrieved 21 January from extension://gfdkcfdhglbbcnllmbgkfkfbmnfkncio/pdf.js/web/viewer.html?file=<https://www.icar.org/Documents/GenoEx/ICAR%20Guidelines%20for%20Parentage%20Verification%20and%20Parentage%20Discovery%20based%20on%20SNP.pdf>
- ICAR. (2021). *Guidelines for laboratories seeking certification for SNP-based genotyping and STR microsatellite-based parentage testing in cattle*. <https://www.icar.org/index.php/certifications/dna-certifications/guidelines-for-str-and-snp-based-parentage-testing-in-cattle/>
- ISAG. (2007). *Rules for conducting ISAG Comparison Tests (CT) for animal DNA testing*. International Society for Animal Genetics. Retrieved 24 January from extension://bfdogplmndidlpjfhiojckpakkdjkkil/pdf/viewer.html?file=http s%3A%2F%2Fwww.isag.us/docs/2FRules_CT.pdf%3Fv2
- Jacewicz, R. (2018). Standardization of research in the field of forensic genetics—the current state in the world and introduction to the guidelines in Poland with reference to the work of the Expert Team for Standards and Assessment in Forensic Genetics of the Polish Speaking

- Working Group of the International Society for Forensic Genetics (ISFG-PL). *Archiwum Medycyny Sądowej i Kryminologii/Archives of Forensic Medicine and Criminology*, 68(4), 215-231.
- Jacobson, A. P., Gerngross, P., Lemeris Jr, J. R., Schoonover, R. F., Anco, C., Breitenmoser-Würsten, C., Durant, S. M., Farhadinia, M. S., Henschel, P., & Kamler, J. F. (2016). Leopard (*Panthera pardus*) status, distribution, and the research efforts across its range. *PeerJ*, 4, e1974.
- Jamieson, A., & CS Taylor, S. (1997). Comparisons of three probability formulae for parentage exclusion. *Animal Genetics*, 28(6), 397-400.
- Jan, C., & Fumagalli, L. (2016). Polymorphic DNA microsatellite markers for forensic individual identification and parentage analyses of seven threatened species of parrots (family Psittacidae). *PeerJ*, 4, e2416.
- Janečka, J. E., Jackson, R., Yuquang, Z., Diqiang, L., Munkhtsog, B., Buckley-Beason, V., & Murphy, W. (2008). Population monitoring of snow leopards using noninvasive collection of scat samples: a pilot study. *Animal Conservation*, 11(5), 401-411.
- Jeffreys, A. J., Wilson, V., & Thein, S. L. (1985). Individual-specific 'fingerprints' of human DNA. *Nature*, 316(6023), 76-79.
- Kalinowski, S. T., Taper, M. L., & Marshall, T. C. (2007). Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular ecology*, 16(5), 1099-1106.
- Kanthaswamy, S. (2015). domestic animal forensic genetics–biological evidence, genetic markers, analytical approaches and challenges. *Animal Genetics*, 46(5), 473-484.
- Kowalczyk, M., Zawadzka, E., Szewczuk, D., Gryzińska, M., & Jakubczak, A. (2018). Molecular markers used in forensic genetics. *Medicine, Science and the Law*, 58(4), 201-209.

- Laguardia, A., Kamler, J. F., Li, S., Zhang, C., Zhou, Z., & Shi, K. (2017). The current distribution and status of leopards *Panthera pardus* in China. *Oryx*, 51(1), 153-159.
- Linacre, A., Gusmão, L., Hecht, W., Hellmann, A., Mayr, W., Parson, W., Prinz, M., Schneider, P., & Morling, N. (2011). ISFG: recommendations regarding the use of non-human (animal) DNA in forensic genetic investigations. *Forensic Science International: Genetics*, 5(5), 501-505.
- Lovari, S., & Mori, E. (2017). Seasonal food habits of the endangered Indochinese leopard *Panthera pardus delacouri* in a protected area of North West Thailand. *Folia Zoologica*, 66(4), 242-247.
- Lynam, A., Round, P., & Brockelman, W. (2006). Status of Birds and Large Mammals of the Dong Phrayayen-Khao Yai Complex, Thailand. *Biodiversity Research and Training Program and Wildlife Conservation Society, Bangkok*.
- Marshall, T., Slate, J., Kruuk, L., & Pemberton, J. (1998). Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular ecology*, 7(5), 639-655.
- McEwing, R., Ouitavon, K., Rovie-Ryan, J., Wulansari, Sitam, F., & Ogden, R. (2012). Molecular sexing of tigers, *Panthera tigris*. *Conservation Genetics Resources*, 4, 299-301.
- Menotti-Raymond, M., David, V. A., Lyons, L. A., Schaffer, A. A., Tomlin, J. F., Hutton, M. K., & O'Brien, S. J. (1999). A genetic linkage map of microsatellites in the domestic cat (*Felis catus*). *Genomics*, 57(1), 9-23.
- Menotti-Raymond, M. A., David, V. A., Wachter, L. L., Butler, J. M., & O'Brien, S. J. (2005). An STR forensic typing system for genetic individualization of domestic cat (*Felis catus*) samples. *Journal of forensic sciences*, 50(5), JFS2004317-2004310.

- Mondol, S., Athreya, V., Sunagar, K., Selvaraj, V. M., & Ramakrishnan, U. (2009). A panel of microsatellites to individually identify leopards and its application to leopard monitoring in human dominated landscapes. *BMC genetics*, 10, 1-7.
- Mondol, S., Sridhar, V., Yadav, P., Gubbi, S., & Ramakrishnan, U. (2015). Tracing the geographic origin of traded leopard body parts in the Indian subcontinent with DNA-based assignment tests. *Conservation Biology*, 29(2), 556-564.
- Mondol, S., Thatte, P., Yadav, P., & Ramakrishnan, U. (2012). A set of miniSTRs for population genetic analyses of tigers (*Panthera tigris*) with cross-species amplification for seven other Felidae. *Conservation Genetics Resources*, 4, 63-66.
- Moore, M. K., Baker, B. W., Bauman, T. L., Burnham-Curtis, M. K., Espinoza, E. O., Ferrell, C. S., Frankham, G. J., Frazier, K., Giles, J. L., & Hawk, D. (2021). The society for wildlife forensic science standards and guidelines.
- Morf, N. V., Kopps, A. M., Nater, A., Lendvay, B., Vasiljevic, N., Webster, L. M., Fautley, R. G., Ogden, R., & Kratzer, A. (2021). STRoe deer: A validated forensic STR profiling system for the European roe deer (*Capreolus capreolus*). *Forensic Science International: Animals and Environments*, 1, 100023.
- Ngoprasert, D., Lynam, A. J., Sukmasuang, R., Tantipisanuh, N., Chutipong, W., Steinmetz, R., Jenks, K. E., Gale, G. A., Grassman Jr, L. I., & Kitamura, S. (2012). Occurrence of three felids across a network of protected areas in Thailand: prey, intraguild, and habitat associations. *Biotropica*, 44(6), 810-817.
- Nijman, V., Morcatty, T., Smith, J. H., Atoussi, S., Shepherd, C. R., Siriwat, P.,

- Nekaris, K. A.-I., & Bergin, D. (2019). Illegal wildlife trade—surveying open animal markets and online platforms to understand the poaching of wild cats. *Biodiversity*, 20(1), 58-61.
- Ning, Y., Roberts, N., Qi, J., Peng, Z., Long, Z., Zhou, S., Gu, J., Hou, Z., Yang, E., & Ren, Y. (2022). Inbreeding status and implications for Amur tigers. *Animal Conservation*, 25(4), 521-531.
- Oppili, P. (2019). *Leopard cub rescued at airport to be returned to Bangkok*. Retrieved 21 Feb 2024 from <https://timesofindia.indiatimes.com/city/chennai/leopard-cub-rescued-at-airport-to-be-retained-to-bangkok/articleshow/67858686.cms>
- Oswell, A. H. (2010). *The big cat trade in Myanmar and Thailand*. TRAFFIC Southeast Asia Petaling Jaya, Selangor, Malaysia.
- Pandey, P., Hyun, J. Y., Yu, M., & Lee, H. (2021). Microsatellite characterization and development of unified STR panel for big cats in captivity: a case study from a Seoul Grand Park Zoo, Republic of Korea. *Molecular Biology Reports*, 48(2), 1935-1942.
- Pearson, K. (1900). X. On the criterion that a given system of deviations from the probable in the case of a correlated system of variables is such that it can be reasonably supposed to have arisen from random sampling. *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science*, 50(302), 157-175.
- Raza, R. H., Chauhan, D. S., Pasha, M., & Sinha, S. (2012). Illuminating the blind spot: a study on illegal trade in leopard parts in India (2001–2010). *New Delhi: TRAFFIC India/WWF India*.
- Rostro-Garcia, S., Kamler, J., Ash, E., Clements, G., Gibson, L., Lynam, A., McEwing, R., Naing, H., & Paglia, S. (2016). Endangered leopards: range collapse of the Indochinese leopard (*Panthera pardus delacouri*) in

- Southeast Asia. *Biological Conservation*, 201, 293-300.
- Rostro-García, S., Kamler, J., Clements, G., Lynam, A., & Naing, H. (2019). *Panthera pardus ssp. delacouri*. *The IUCN Red List of Threatened Species*, 2019-2013.
- Schütz, E., & Brenig, B. (2015). Analytical and statistical consideration on the use of the ISAG-ICAR-SNP bovine panel for parentage control, using the Illumina BeadChip technology: example on the German Holstein population. *Genetics selection evolution*, 47, 1-7.
- Scott, J. (2013). *The Leopard's Tale: Featuring Half-Tail and Zawadi, Stars of Big Cat Diary*. Bradt Travel Guides.
- Scott, P. (1965). *The Launching of a New Ark: First Report of the World Wildlife Fund, an International Foundation for Saving the World's Wildlife and Wild Places: 1961-1964*. Collins.
- Sharma, R., Stuckas, H., Moll, K., Khan, I., Bhaskar, R., Goyal, S., & Tiedemann, R. (2008). Fourteen new di- and tetranucleotide microsatellite loci for the critically endangered Indian tiger (*Panthera tigris tigris*). *Molecular ecology resources*, 8(6), 1480-1482.
- Simcharoen, S., & Duangchantrasiri, S. (2008). Monitoring of the leopard population at Khao Nang Rum in Huai Kha Khaeng Wildlife Sanctuary. *วารสาร วิทยาศาสตร์ ไทย*, 27(1), 68-80.
- Singh, V. K., Singh, S. K., Joshi, B. D., Singh, A., Kumar, H., Chandra, K., Sharma, L. K., & Thakur, M. (2022). Population genetic attributes of common leopard (*Panthera pardus fusca*) from Uttarkashi, Western Himalayas. *Molecular Biology Reports*, 1-7.
- Slate, J., Marshall, T., & Pemberton, J. (2000). A retrospective assessment of the accuracy of the paternity inference program CERVUS. *Molecular ecology*, 9(6), 801-808.

- Slatkin, M. (2008). Linkage disequilibrium—understanding the evolutionary past and mapping the medical future. *Nature Reviews Genetics*, 9(6), 477-485.
- Sobrinho, B., & Carracedo, A. (2005). SNP typing in forensic genetics: a review. *Forensic DNA typing protocols*, 107-126.
- Stein, A. B., Athreya, V., Gerngross, P., Balme, G., Henschel, P., Karanth, U., Miquelle, D., Rostro-García, S., Kamler, J. F., Laguardia, A., Khorozyan, I., & Ghoddousi, A. (2023). *Panthera pardus*, Leopard. *The IUCN Red List of Threatened Species*. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2023-1.RLTS.T15954A215195554.en>.
- Stein, A. B., & Hayssen, V. (2013). *Panthera pardus* (Carnivora: Felidae). *Mammalian Species*, 45(900), 30-48.
- Suresh, S. (2016). *CITES Parties must keep the 'forgotten' big cats in mind*. Retrieved 18 Feb 2024 from <https://eia-international.org/blog/cites-parties-must-keep-the-forgotten-big-cats-in-mind/#:~:text=All%20Asian%20big%20cats%20%E2%80%93%20that%207s,in%20these%20species%20is%20prohibited>
- Thai PBS. (2564). เส้นทาง "ลูกเสือดาว" ลอบขายจากสวนสัตว์ไทยส่งอินเดีย. Thai PBS. Retrieved 17 February from <https://www.thaipbs.or.th/news/content/301348>
- Thaitrakulpanich, A. (2018). *Italian-Thai President Charged with Poaching Wild Animals*. Retrieved 21 Feb 2024 from <https://www.khaosodenglish.com/featured/2018/02/06/italian-thai-president-charged-poaching-wild-animals/>
- The Nation. (2021). *Sting operation nets alleged leopard kitten trader*. Retrieved 21 Feb 2024 from <https://www.nationthailand.com/in-focus/30402570>

- Uphyrkina, O., Johnson, W. E., Quigley, H., Miquelle, D., Marker, L., Bush, M., & O'Brien, S. J. (2001). Phylogenetics, genome diversity and origin of modern leopard, *Panthera pardus*. *Molecular ecology*, 10(11), 2617-2633.
- Vignal, A., Milan, D., SanCristobal, M., & Eggen, A. (2002). A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genetics selection evolution*, 34(3), 275-305.
- Waits, L. P., Luikart, G., & Taberlet, P. (2001). Estimating the probability of identity among genotypes in natural populations: cautions and guidelines. *Molecular ecology*, 10(1), 249-256.
- Weinberg, W. (1908). Über den nachweis der vererbung beim menschen. *Jh. Ver. vaterl. Naturk. Wurttemb.*, 64, 369-382.
- Weir, B. (1996). Population structure. *Genetic data analysis II*, 161-200.
- Weir, B. S., & Cockerham, C. C. (1984). Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *evolution*, 1358-1370.
- Wildlife Friend Foundation. (2019). *Thailand to India wildlife smuggling groups linked to zoological gardens?* Retrieved 21 Feb 2024 from <https://www.wfft.org/wildlife-trade/thailand-to-india-wildlife-smuggling-groups-linked/#:~:text=The%20animals%20were%20being%20smuggled,Baskar and%20Mr%20Johnson%20Micheal%20Raj.>
- Wright, S. (1931). Evolution in Mendelian populations. *Genetics*, 16(2), 97.
- Wu, J.-H., Lei, Y.-L., Fang, S.-G., & Wan, Q.-H. (2009). Twenty-one novel tri-and tetranucleotide microsatellite loci for the Amur tiger (*Panthera tigris altaica*). *Conservation Genetics*, 10, 567-570.
- Xu, Q., Cai, M., & Mackey, T. K. (2020). The illegal wildlife digital market: an analysis of Chinese wildlife marketing and sale on Facebook.

Environmental conservation, 47(3), 206-212.

Xu, Y. C., Li, B., Li, W. S., Bai, S. Y., Jin, Y., Li, X. P., Gu, M. B., Jing, S. Y., & Zhang, W. (2005). Individualization of tiger by using microsatellites.

Forensic science international, 151(1), 45-51.

Zhang, W., Zhang, Z., Wei, K., Shen, F., Hou, R., Zhang, L., & Yue, B. (2006).

Isolation and characterization of polymorphic tri- and tetra-nucleotide microsatellite loci for the south China tiger *Panthera tigris amoyensis*.

Journal of Natural History, 40(38-40), 2259-2263.

Zhao, X., Qiu, Q., Li, C., Fu, D., Hu, X., Gao, S., Zhu, Y., Mu, H., Wang, R., & Yang, H. (2020). Genome-based development of 15 microsatellite markers in fluorescent multiplexes for parentage testing in captive tigers. *PeerJ*, 8, e8939.

ZOU, Z. T., Uphyrkina, O. V., Fomenko, P., & LUO, S. J. (2015). The development and application of a multiplex short tandem repeat (STR) system for identifying subspecies, individuals and sex in tigers.

Integrative zoology, 10(4), 376-388.

กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม. (2566). อนุสัญญาว่าด้วยการค้าระหว่างประเทศซึ่งชนิดพันธุ์สัตว์ป่าและพืชป่าที่ใกล้จะสูญพันธุ์ (CITES). Retrieved 20 พฤษภาคม 2567 from <https://fad.mnre.go.th/th/mph/content/217>

ไทยพีบีเอส. (2563). ยึดเสือโคร่ง 5 ตัว-พักใบอนุญาติ 90 วัน สวนสัตว์ดั่ง จ.มุกดาหาร. Retrieved 22 พฤษภาคม 2567 from <https://www.thaipbs.or.th/news/content/298775>

ไทยพีบีเอส. (2564). แจ้งข้อหาเพิ่มสวนสัตว์ดั่ง "3 เสือโคร่ง" DNA ไม่ตรงปก. Retrieved 21 กุมภาพันธ์ 2564 from <https://www.thaipbs.or.th/news/content/302219>

ไทยพีบีเอส. (2565). ผล DNA ชี้ชัดเสือโคร่งของกลาง 3 ตัว ไม่ได้มาจากป่าไทย. Retrieved 22 พฤษภาคม 2567 from <https://www.thaipbs.or.th/news/content/316532>

สถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. (2567). สมบัติของสารพันธุกรรม.

Retrieved 18 มกราคม from

https://myipst.ipst.ac.th/medias/m4b2_04_3DNA_characters_003_ppt

สำนักงานนโยบายและแผนทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม. (2544). อนุสัญญาว่าด้วยความ

หลากหลายทางชีวภาพ. <https://chm-thai.onep.go.th/?p=7632>

สำนักงานนโยบายและแผนสิ่งแวดล้อม. (2545). ประเทศไทยกับการดำเนินงานตามพันธกรณีของ

อนุสัญญาว่าด้วยความหลากหลายทางชีวภาพ. กลุ่มงานทรัพยากรชีวภาพ กองประสานการจัดการทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม สำนักงานนโยบายและแผนสิ่งแวดล้อม.

สุปาณี บุญยวงศ์. (2539). ไชเตส (CITES) กับการอนุรักษ์สัตว์ป่าในประเทศไทย. ปาริชาติ, 9.

<https://doi.org/https://so05.tci->

[thaijo.org/index.php/parichartjournal/article/view/69831](https://doi.org/https://so05.tci-thaijo.org/index.php/parichartjournal/article/view/69831)

องค์การระหว่างประเทศเพื่อการอนุรักษ์ธรรมชาติ. (2023). *The IUCN red list of threatened*

species. Retrieved 21 Feb 2024 from <https://www.iucnredlist.org/>

องค์การสัตว์ป่าโลกสากลแห่งประเทศไทย. (2557). ประเทศไทยกำลังถูกจับตามองภายใต้แผนปฏิบัติ

การแห่งชาติเพื่อควบคุมการค้าช้าง. Retrieved 21 กุมภาพันธ์ 2567 from

<https://wwf.panda.org/es/?230472/07102014>

อนรุทธิ์ หมิดเส็น. (2560, 21 พฤษภาคม 2560). เครื่องหมายดีเอ็นเอ. สถาบันส่งเสริมการสอน

วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. Retrieved 18 มกราคม from

https://www.scimath.org/lesson-biology/item/7022-2017-05-21-07-28-11?utm_source=chatgpt.com





ตารางผนวกที่ ก-1 แสดงรายละเอียดตัวอย่างเสือดาวในกรงเลี้ยงและตัวอย่างเสือดาวของกลางที่ศูนย์วิทยุศาสตร์สัตว์ป่ารวบรวมไว้ตั้งแต่ปี 2555-2565 (ต่อ)

รหัสตัวอย่าง	แหล่งที่มา	รหัสกรงเลี้ยง	จังหวัดที่ตั้ง/ ตรวจยึด	ภาค	ประเภท ตัวอย่าง	เพศ	วันที่เก็บตัวอย่าง		หมายเหตุ
							1	2	
019	กรงเลี้ยง	D	มุกดาหาร	ตะวันออกเฉียงเหนือ	เลือด	เมีย	เมีย	16 กันยายน 2567	
020	กรงเลี้ยง	E	สุราษฎร์ธานี	ใต้	เลือด	เมีย	เมีย	5 สิงหาคม 2557	
021	กรงเลี้ยง	E	สุราษฎร์ธานี	ใต้	เลือด	ผู้	ผู้	5 สิงหาคม 2557	
022	กรงเลี้ยง	E	สุราษฎร์ธานี	ใต้	เลือด	เมีย	เมีย	5 สิงหาคม 2557	
023	กรงเลี้ยง	E	สุราษฎร์ธานี	ใต้	เลือด	ผู้	ผู้	5 สิงหาคม 2557	
024	กรงเลี้ยง	E	สุราษฎร์ธานี	ใต้	เลือด	ผู้	ผู้	5 สิงหาคม 2557	
025	กรงเลี้ยง	E	สุราษฎร์ธานี	ใต้	เลือด	ผู้	ผู้	5 สิงหาคม 2557	
026	กรงเลี้ยง	E	สุราษฎร์ธานี	ใต้	เลือด	เมีย	เมีย	5 สิงหาคม 2557	
027	กรงเลี้ยง	E	สุราษฎร์ธานี	ใต้	เลือด	เมีย	เมีย	5 สิงหาคม 2557	
028	กรงเลี้ยง	E	สุราษฎร์ธานี	ใต้	ขน	-	เมีย	5 สิงหาคม 2557	
029	กรงเลี้ยง	E	สุราษฎร์ธานี	ใต้	เลือด	ผู้	ผู้	28 พฤศจิกายน 2557	
030	กรงเลี้ยง	F	นครราชสีมา	ตะวันออกเฉียงเหนือ	เลือด	เมีย	เมีย	24 ธันวาคม 2558	
031	กรงเลี้ยง	F	นครราชสีมา	ตะวันออกเฉียงเหนือ	เลือด	ผู้	ผู้	24 ธันวาคม 2558	
032	กรงเลี้ยง	F	นครราชสีมา	ตะวันออกเฉียงเหนือ	เลือด	ผู้	ผู้	24 ธันวาคม 2558	
033*	-	-	-	-	เลือด	-	-	19 เมษายน 2559	ไม่ทราบแหล่งที่มา

ตารางผนวกที่ ก-1 แสดงรายละเอียดตัวอย่างเสือดาวในกรงเลี้ยงและตัวอย่างเสือดาวของกลางที่ศูนย์วิทยุสัตวศาสตร์สัตว์ป่ารวบรวมไว้ตั้งแต่ปี 2555-2565 (ต่อ)

รหัสตัวอย่าง	แหล่งที่มา	รหัสกรงเลี้ยง	จังหวัดที่ตั้ง/ ตรวจยึด	ภาค	ประเภท	เพศ		วันที่เก็บตัวอย่าง	หมายเหตุ
						ตัวอย่าง	1 2		
034	กรงเลี้ยง	G	อุบลราชธานี	ตะวันออกเฉียงเหนือ	เสือด	ผู้	-	26 กรกฎาคม 2559	
035	กรงเลี้ยง	G	อุบลราชธานี	ตะวันออกเฉียงเหนือ	เสือด	ผู้	ผู้	26 กรกฎาคม 2559	
036	กรงเลี้ยง	G	อุบลราชธานี	ตะวันออกเฉียงเหนือ	เสือด	เมีย	เมีย	26 กรกฎาคม 2559	
037	กรงเลี้ยง	G	อุบลราชธานี	ตะวันออกเฉียงเหนือ	เสือด	ผู้	-	26 กรกฎาคม 2559	
038	กรงเลี้ยง	G	อุบลราชธานี	ตะวันออกเฉียงเหนือ	เสือด	เมีย	-	26 กรกฎาคม 2559	
039	กรงเลี้ยง	G	อุบลราชธานี	ตะวันออกเฉียงเหนือ	เสือด	ผู้	ผู้	26 กรกฎาคม 2559	
040	กรงเลี้ยง	D	มุกดาหาร	ตะวันออกเฉียงเหนือ	เสือด	เมีย	เมีย	26 กรกฎาคม 2559	
041	กรงเลี้ยง	D	มุกดาหาร	ตะวันออกเฉียงเหนือ	เสือด	เมีย	เมีย	26 กรกฎาคม 2559	
042	กรงเลี้ยง	G	อุบลราชธานี	ตะวันออกเฉียงเหนือ	เสือด	เมีย	เมีย	6 กันยายน 2559	
043	กรงเลี้ยง	G	อุบลราชธานี	ตะวันออกเฉียงเหนือ	เสือด	เมีย	เมีย	6 กันยายน 2559	
044	กรงเลี้ยง	G	อุบลราชธานี	ตะวันออกเฉียงเหนือ	เสือด	ผู้	ผู้	6 กันยายน 2559	
045	กรงเลี้ยง	G	อุบลราชธานี	ตะวันออกเฉียงเหนือ	เสือด	เมีย	เมีย	6 กันยายน 2559	
046	กรงเลี้ยง	G	อุบลราชธานี	ตะวันออกเฉียงเหนือ	เสือด	ผู้	ผู้	6 กันยายน 2559	
047	กรงเลี้ยง	G	อุบลราชธานี	ตะวันออกเฉียงเหนือ	เสือด	ผู้	ผู้	6 กันยายน 2559	
048	กรงเลี้ยง	G	อุบลราชธานี	ตะวันออกเฉียงเหนือ	เสือด	เมีย	เมีย	6 กันยายน 2559	

ตารางผนวกที่ ก-1 แสดงรายละเอียดตัวอย่างเสื้อดาวในกรงเสียงและตัวอย่างเสื้อดาวของกลางที่ศูนย์นิติวิทยาศาสตร์ตำรวจนครบาลไว้ตั้งแต่ปี 2555-2565 (ต่อ)

รหัสตัวอย่าง	แหล่งที่มา	รหัสกรงเสียง	จังหวัดที่ตั้ง/ ตรวจยึด	ภาค	ประเภท ตัวอย่าง	เพศ	วันที่เก็บตัวอย่าง		หมายเหตุ
							1	2	
049	กรงเสียง	G	อุบลราชธานี	ตะวันออกเฉียงเหนือ	เสื้อ	เมีย	เมีย	6 กันยายน 2559	
050	กรงเสียง	G	อุบลราชธานี	ตะวันออกเฉียงเหนือ	เสื้อ	ผู้	ผู้	6 กันยายน 2559	
051	กรงเสียง	G	อุบลราชธานี	ตะวันออกเฉียงเหนือ	เสื้อ	ผู้	ผู้	6 กันยายน 2559	
052	กรงเสียง	G	อุบลราชธานี	ตะวันออกเฉียงเหนือ	เสื้อ	เมีย	เมีย	6 กันยายน 2559	
053	กรงเสียง	G	อุบลราชธานี	ตะวันออกเฉียงเหนือ	เสื้อ	ผู้	ผู้	6 กันยายน 2559	
054	กรงเสียง	H	ชลบุรี	ตะวันออก	เสื้อ	-	เมีย	3 ตุลาคม 2559	
055	กรงเสียง	H	ชลบุรี	ตะวันออก	เสื้อ	-	เมีย	3 ตุลาคม 2559	
056	กรงเสียง	I	ชลบุรี	ตะวันออก	เสื้อ	ผู้	ผู้	21 เมษายน 2560	
057	กรงเสียง	I	ชลบุรี	ตะวันออก	เสื้อ	เมีย	ผู้	21 เมษายน 2560	
058	กรงเสียง	D	มุกดาหาร	ตะวันออกเฉียงเหนือ	เสื้อ	ผู้	ผู้	20 กุมภาพันธ์ 2561	
059	กรงเสียง	D	มุกดาหาร	ตะวันออกเฉียงเหนือ	เสื้อ	เมีย	เมีย	20 กุมภาพันธ์ 2561	
060	กรงเสียง	D	มุกดาหาร	ตะวันออกเฉียงเหนือ	เสื้อ	เมีย	เมีย	20 กุมภาพันธ์ 2561	
061	กรงเสียง	D	มุกดาหาร	ตะวันออกเฉียงเหนือ	เสื้อ	เมีย	เมีย	20 กุมภาพันธ์ 2561	
062	กรงเสียง	D	มุกดาหาร	ตะวันออกเฉียงเหนือ	เสื้อ	เมีย	เมีย	20 กุมภาพันธ์ 2561	
063	กรงเสียง	D	มุกดาหาร	ตะวันออกเฉียงเหนือ	เสื้อ	เมีย	เมีย	20 กุมภาพันธ์ 2561	

ตารางผนวกที่ ก-1 แสดงรายละเอียดตัวอย่างเสือดาวในกรงเลี้ยงและตัวอย่างเสือดาวของกลางที่ศูนย์นิเวศวิทยาการอนุรักษ์สัตว์ป่ารวบรวมนับตั้งแต่ปี 2555-2565 (ต่อ)

รหัสตัวอย่าง	แหล่งที่มา	รหัสกรงเลี้ยง	จังหวัดที่ตั้ง	ภาค	ประเภท	เพศ	วันที่เก็บตัวอย่าง	หมายเหตุ
			ตรวจยึด		ตัวอย่าง	1	2	
064	กรงเลี้ยง	D	มุกดาหาร	ตะวันออกเฉียงเหนือ	เลือด	เมีย	20 กุมภาพันธ์ 2561	
065	กรงเลี้ยง	D	มุกดาหาร	ตะวันออกเฉียงเหนือ	เลือด	ผู้	20 กุมภาพันธ์ 2561	
066	กรงเลี้ยง	D	มุกดาหาร	ตะวันออกเฉียงเหนือ	เลือด	-	20 กุมภาพันธ์ 2561	
067	กรงเลี้ยง	D	มุกดาหาร	ตะวันออกเฉียงเหนือ	เลือด	-	20 กุมภาพันธ์ 2561	
068	กรงเลี้ยง	D	มุกดาหาร	ตะวันออกเฉียงเหนือ	เลือด	-	20 กุมภาพันธ์ 2561	
069	กรงเลี้ยง	D	มุกดาหาร	ตะวันออกเฉียงเหนือ	เลือด	-	20 กุมภาพันธ์ 2561	
070	กรงเลี้ยง	D	มุกดาหาร	ตะวันออกเฉียงเหนือ	เลือด	-	20 กุมภาพันธ์ 2561	
071	กรงเลี้ยง	D	มุกดาหาร	ตะวันออกเฉียงเหนือ	เลือด	-	20 กุมภาพันธ์ 2561	
072	กรงเลี้ยง	D	มุกดาหาร	ตะวันออกเฉียงเหนือ	เลือด	-	20 กุมภาพันธ์ 2561	
073	ของกลาง	-	ขสภ. ทุ่งใหญ่ นเรศวร	ตะวันตก	ชิ้นเนื้อ	-	16 กุมภาพันธ์ 2561	
074	กรงเลี้ยง	J	สมุทรปราการ	กลาง	เลือด	ผู้	8 มีนาคม 2561	
075	กรงเลี้ยง	J	สมุทรปราการ	กลาง	เลือด	ผู้	8 มีนาคม 2561	
076	กรงเลี้ยง	J	สมุทรปราการ	กลาง	เลือด	เมีย	8 มีนาคม 2561	
077	กรงเลี้ยง	J	สมุทรปราการ	กลาง	เลือด	เมีย	8 มีนาคม 2561	

ตารางผนวกที่ ก-1 แสดงรายละเอียดตัวอย่างเสื้อดาวในกรงเสียงและตัวอย่างเสื้อดาวของกลางที่ศูนย์นิติวิทยาศาสตร์ตำรวจบรมโพธิ์แดง 2555-2565 (ต่อ)

รหัสตัวอย่าง	แหล่งที่มา	รหัสกรงเสียง	จังหวัดที่ส่ง/ตรวจยึด	ภาค	ประเภทตัวอย่าง	เพศ	วันที่เก็บตัวอย่าง		หมายเหตุ
							1	2	
078	กรงเสียง	J	สมุทรปราการ	กลาง	เสื้อ	ผู้	ผู้	8 มีนาคม 2561	
079	กรงเสียง	J	สมุทรปราการ	กลาง	เสื้อ	เมีย	เมีย	8 มีนาคม 2561	
080	กรงเสียง	J	สมุทรปราการ	กลาง	เสื้อ	ผู้	ผู้	8 มีนาคม 2561	
081	กรงเสียง	J	สมุทรปราการ	กลาง	เสื้อ	ผู้	ผู้	8 มีนาคม 2561	
082	กรงเสียง	J	สมุทรปราการ	กลาง	เสื้อ	ผู้	ผู้	8 มีนาคม 2561	
083	กรงเสียง	J	สมุทรปราการ	กลาง	เสื้อ	เมีย	เมีย	8 มีนาคม 2561	
084	กรงเสียง	J	สมุทรปราการ	กลาง	เสื้อ	เมีย	เมีย	8 มีนาคม 2561	
085	กรงเสียง	J	สมุทรปราการ	กลาง	เสื้อ	เมีย	เมีย	8 มีนาคม 2561	
086	กรงเสียง	J	สมุทรปราการ	กลาง	เสื้อ	เมีย	เมีย	8 มีนาคม 2561	
087	กรงเสียง	J	สมุทรปราการ	กลาง	เสื้อ	เมีย	เมีย	8 มีนาคม 2561	
088	กรงเสียง	J	สมุทรปราการ	กลาง	เสื้อ	เมีย	เมีย	8 มีนาคม 2561	
089	กรงเสียง	J	สมุทรปราการ	กลาง	เสื้อ	ผู้	ผู้	8 มีนาคม 2561	
090	กรงเสียง	J	สมุทรปราการ	กลาง	เสื้อ	ผู้	ผู้	23 มีนาคม 2561	
091	กรงเสียง	J	สมุทรปราการ	กลาง	เสื้อ	เมีย	เมีย	23 มีนาคม 2561	
092	กรงเสียง	J	สมุทรปราการ	กลาง	เสื้อ	ผู้	ผู้	30 มีนาคม 2561	

ตารางผนวกที่ ก-1 แสดงรายละเอียดตัวอย่างเสือดาวในกรงเลี้ยงและตัวอย่างเสือดาวของกลางที่ศูนย์วิทยุสัตวศาสตร์สัตว์ป่ารวบรวมไว้ตั้งแต่ปี 2555-2565 (ต่อ)

รหัสตัวอย่าง	แหล่งที่มา	รหัสกรงเลี้ยง	จังหวัดที่ตั้ง/ตรวจยึด	ภาค	ประเภทตัวอย่าง	เพศ	เพศ	วันที่เก็บตัวอย่าง	หมายเหตุ
093	กรงเลี้ยง	J	สมุทรปราการ	กลาง	เลือด	ผู้	ผู้	30 มีนาคม 2561	
094	กรงเลี้ยง	M	กาญจนบุรี	ตะวันตก	ชิ้นเนื้อ	ผู้	ผู้	20 มิถุนายน 2561	
095*	-	-	-	-	ชิ้นเนื้อ	เมีย	-	25 มกราคม 2562	ไม่ทราบแหล่งที่มา
096	กรงเลี้ยง	K	ชลบุรี	ตะวันออก	ชิ้นเนื้อ	-	ผู้	25 มกราคม 2562	
097	ของกลาง	-	-	-	หนังแห้ง	-	-	21 พฤษภาคม 2562	
098	กรงเลี้ยง	D	มุกดาหาร	ตะวันออกเฉียงเหนือ	เลือด	เมีย	เมีย	2 กรกฎาคม 2562	
099	กรงเลี้ยง	G	อุบลราชธานี	ตะวันออกเฉียงเหนือ	ชิ้นเนื้อ	-	-	2 กรกฎาคม 2562	
100	กรงเลี้ยง	L	นครราชสีมา	ตะวันออกเฉียงเหนือ	เลือด	ผู้	ผู้	15 กรกฎาคม 2563	
101	กรงเลี้ยง	L	นครราชสีมา	ตะวันออกเฉียงเหนือ	เลือด	เมีย	เมีย	15 กรกฎาคม 2563	
102	กรงเลี้ยง	L	นครราชสีมา	ตะวันออกเฉียงเหนือ	เลือด	-	เมีย	13 พฤษภาคม 2563	
103	กรงเลี้ยง	M	กาญจนบุรี	ตะวันตก	ชิ้นเนื้อ	-	เมีย	24 พฤษภาคม 2563	
104	กรงเลี้ยง	D	มุกดาหาร	ตะวันออกเฉียงเหนือ	เลือด	-	-	15 กรกฎาคม 2563	
105	กรงเลี้ยง	D	มุกดาหาร	ตะวันออกเฉียงเหนือ	เลือด	ผู้	ผู้	ปี 2563	
106	กรงเลี้ยง	D	มุกดาหาร	ตะวันออกเฉียงเหนือ	เลือด	ผู้	ผู้	ปี 2564	
107	กรงเลี้ยง	L	นครราชสีมา	ตะวันออกเฉียงเหนือ	เลือด	ผู้	-	ปี 2564	

ตารางผนวกที่ ก-1 แสดงรายละเอียดตัวอย่างเลือดดาวในกรงเลี้ยงและตัวอย่างเลือดดาวของกลางที่ศูนย์นิติวิทยาศาสตร์ตำรวจปทุมธานีตั้งแต่ปี 2555-2565 (ต่อ)

รหัสตัวอย่าง	แหล่งที่มา	รหัสกรงเลี้ยง	จังหวัดที่ตั้ง/ตรวจยึด	ภาค	ประเภทตัวอย่าง	เพศ	วันที่เก็บตัวอย่าง	หมายเหตุ
108	ของกลาง	-	-	-	เลือด	ผู้	ปี 2564	ลูกเลือดดาว
109	กรงเลี้ยง	D	มุกดาหาร	ตะวันออกเฉียงเหนือ	เลือด	เมีย	ปี 2564	
110	ของกลาง	-	-	-	ขน	เมีย	ปี 2564	ลูกเลือดดาว
111	ของกลาง	-	-	-	ขน	ผู้	ปี 2564	ลูกเลือดดาว
112	กรงเลี้ยง	D	มุกดาหาร	ตะวันออกเฉียงเหนือ	เลือด	ผู้	ปี 2564	
113	กรงเลี้ยง	L	นครราชสีมา	ตะวันออกเฉียงเหนือ	จิ้งเหลน	-	ปี 2565	
114	กรงเลี้ยง	L	นครราชสีมา	ตะวันออกเฉียงเหนือ	เลือด	เมีย	ปี 2565	
115	กรงเลี้ยง	L	นครราชสีมา	ตะวันออกเฉียงเหนือ	เลือด	เมีย	ปี 2565	
116	กรงเลี้ยง	L	นครราชสีมา	ตะวันออกเฉียงเหนือ	เลือด	ผู้	ปี 2565	

* ตัวอย่างรหัส 007, 009, 017, 033 และ 095 คัดออกจากการศึกษาเนื่องจากไม่ทราบแหล่งที่มา

เพศ 1 หมายถึง การระบุเพศจากฐานข้อมูลของศูนย์นิติวิทยาศาสตร์ตำรวจปทุมธานี

เพศ 2 หมายถึง การระบุเพศจากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายพันธุกรรม PTZF

ตารางผนวกที่ ก-2 แสดงรายละเอียดตัวอย่างเลือดาวที่มีการกระจายพันธุ์ในธรรมชาติของประเทศไทย ที่กลุ่มงานวิจัยสัตว์ป่าเก็บตัวอย่างได้จาก
เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง ตั้งแต่ปี 2562-2563

รหัสตัวอย่าง	บริเวณที่เก็บตัวอย่าง	พิกัด UTM		ประเภทตัวอย่าง	วันที่เก็บตัวอย่าง
		X	Y		
LPD01	วงแหวนบน	530631	1711825	มูล	9 เมษายน 2562
LPD02	ยางแดง	518810	1718468	มูล	16 กันยายน 2562
LPD03	เขابันไต่	517223	1688668	มูล	23 ตุลาคม 2562
LPD04	เขابันไต่	518593	1687788	มูล	23 ตุลาคม 2562
LPD05	เขابันไต่	516302	1688949	มูล	24 ตุลาคม 2562
LPD06	ถนนเข้าห้วยมดแดง	517881	1687221	มูล	25 ตุลาคม 2562
LPD07	ถนนเข้าห้วยมดแดง	517474	1683679	มูล	25 ตุลาคม 2562
LPD08	K901	528835	1708129	มูล	23 ตุลาคม 2562
LPD09	สถานีวิจัยสัตว์ป่าเขานางรำ	531390	1711042	มูล	15 พฤศจิกายน 2562
LPD10	คลองชะเอม	531120	1733667	มูล	30 กันยายน 2562
LPD11	เขาเจ็พ	532518	1709588	มูล	26 พฤศจิกายน 2562

ตารางผนวกที่ ก-2 แสดงรายละเอียดตัวอย่างเลือดดาวที่มีการกระจายพันธุ์ในธรรมชาติของประเทศไทย ที่กลุ่มงานวิจัยสัตว์ป่าเก็บตัวอย่างได้จาก
เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง ตั้งแต่ปี 2562-2563 (ต่อ)

รหัสตัวอย่าง	บริเวณที่เก็บตัวอย่าง	พิกัด UTM		ประเภทตัวอย่าง	วันที่เก็บตัวอย่าง
		X	Y		
LPD12	หินกอง	-	-	มูล	12 พฤศจิกายน 2562
LPD13	K901	529072	1708756	มูล	12 ธันวาคม 2562
LPD14	แดงพวง	528490	1710318	มูล	14 ธันวาคม 2562
LPD15	แดงพวง	528479	1710318	มูล	14 ธันวาคม 2562
LPD16	ไล่น์ 8 วงแหวนล่าง	532714	1715988	มูล	20 มกราคม 2563
LPD17	ไล่น์ 8 วงแหวนล่าง	532723	1715987	มูล	20 มกราคม 2563
LPD18	ไล่น์ 8 วงแหวนล่าง	532721	1715988	มูล	20 มกราคม 2563
LPD19	ไล่น์ 8 วงแหวนล่าง	532716	1715987	มูล	20 มกราคม 2563
LPD20	ห้วยช้างตาย, วงแหวนบน	529406	1709810	มูล	30 มกราคม 2563
HKK1	-	-	-	ขน	-

ตารางผนวกที่ ก-2 แสดงรายละเอียดตัวอย่างเสือดาวที่มีการกระจายพันธุ์ในธรรมชาติของประเทศไทย ที่กลุ่มงานวิจัยสัตว์ป่าเก็บตัวอย่างได้จาก
เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง ตั้งแต่ปี 2562-2563 (ต่อ)

รหัสตัวอย่าง	บริเวณที่เก็บตัวอย่าง	พิกัด UTM		ประเภทตัวอย่าง	วันที่เก็บตัวอย่าง
		X	Y		
HKK2	สะพานมะเขือพวง	531152	1716073	ขน	12 ตุลาคม 2562
HKK3	เขารวก	535008	1719596	ขน	19 ตุลาคม 2562
HKK4	-	-	-	ขน	-



ภาคผนวก ข
เครื่องหมายไมโครเซตเทรลไลต์ที่ใช้ในการคัดกรอง

ตารางผนวกที่ ข-1 แสดงรายละเอียดเครื่องมือไบโครแมตเทคโนโลยีที่ได้จากการคัดกรองเบ้องต้นด้วยวิธีการตรวจเอกสาร โดยในแต่ละเครื่องหมายถึงจำนวนแอลลิล
ขั้นต่ำจำนวนไม่น้อยกว่า 4 แอลลิล และมีรูปแบบชุดซ้ำของนิวคลีโอไทด์ตั้งแต่ 4-5 ซ้ำต่อชุด (Tetra/Penta-nucleotide repeat)

เครื่องหมาย	Primer Sequence (3'-->5')	รูปแบบซ้ำ (motif)	ประเภทซ้ำ (nucleotide repeat)	ความ ยาว (bp)	จำนวน แอลลิล	ชนิดสัตว์	งานวิจัยอ้างอิง
DA1S1290	F: CTGAGTCTTCAAGCTGGGTATCACA R: ATACACAGCTTCTCAAATGCCATCC	AAAG	Tetra	212 – 272	6	เสือโคร่ง	(Zhao et al., 2020)
DA1S1470	F: CACACACCACAGACACTAGGCA R: ATCTGGTCTGGGCTTTTAACTCCT	AAAG	Tetra	314 – 362	7	เสือโคร่ง	(Zhao et al., 2020)
DA2S1059	F: CCTTGTAACGAAAACAGGCGAGTAAGCCA R: AGGCAAGACATTCACTTCTTAGGCA	AGAT	Tetra	332 – 380	11	เสือโคร่ง	(Zhao et al., 2020)
DA2S1575	F: TATGCTTAGGTCTGCTCATCAAGGG R: GATGATCATAAGCGGAATGCACGAG	AAAAG	Penta	368 – 428	8	เสือโคร่ง	(Zhao et al., 2020)
DA3S1123	F: ATGTATGTCTCTGCACATGCTTCCAC R: CTGTCATGGATAATGTGCTTGAGTCCCT	AAAC	Penta	206 – 276	5	เสือโคร่ง	(Zhao et al., 2020)
DA3S1145	F: TGGGGTAGTCGTTATACAACCGAA R: CTTAACATCAGTGAGCCCCAATGTGGA	AAAG	Tetra	215 – 263	5	เสือโคร่ง	(Zhao et al., 2020)

ตารางผนวกที่ ข-1 แสดงรายละเอียดเครื่องมือทางพันธุกรรมที่ได้จากการคัดกรองเบื้องต้นด้วยวิธีการตรวจเอกสาร โดยในแต่ละเครื่องหมายถึงจำนวนแอลลีล
ขั้นต่ำจำนวนไม่น้อยกว่า 4 แอลลีล และมีรูปแบบชุดซ้ำของนิวคลีโอไทด์ตั้งแต่ 4-5 ซ้ำต่อชุด (Tetra/Penta-nucleotide repeat) (ต่อ)

เครื่องหมาย	Primer Sequence (3'-->5')	รูปแบบซ้ำ (motif)	ประเภทซ้ำ (nucleotide repeat)	ความยาว (bp)	จำนวน แอลลีล	ชนิดสัตว์	งานวิจัยอ้างอิง
DE1S613	F: GCCCACCACCTTCAAAATAGCCAT R: CCTCTTGACAGCCCTCCTTATACCTC	AAAG	Tetra	222 – 270	11	เสือโคร่ง	(Zhao et al., 2020)
DF1S579	F: CCCTTGCTTTTAAATGAGGCATAACCTT R: GCTTCCCCTCCCTATGTATGGC	AAAG	Tetra	307 – 355	9	เสือโคร่ง	(Zhao et al., 2020)
DF2S497	F: CACTGGTATGTTTAAAGGGAATGTCA R: CACATAGCACATCATCTTAAACACA	AAAG	Tetra	132 – 178	5	เสือโคร่ง	(Zhao et al., 2020)
F85	F: TAAATCTGGTCTCACGTTTTC R: GCCTGAAAATGTATCCATCACTTCAGAT	–	Tetra	150 – 170	5	เสือดำ	(Pandey et al., 2021)
F41	F: GTCTGCATCTTCAAAATAGGA R: GTACCTGAGTTGGCTGTTGA	(A) ₁₃ (AAGG) ₁₁ (AAAG) ₁₆	–	123 – 139	5	เสือดำ	(Mondol et al., 2009)

ตารางผนวกที่ ข-1 แสดงรายละเอียดเครื่องมือโครมาโตกราฟีที่ได้จากการคัดกรองเบื้องต้นด้วยวิธีการตรวจเอกสาร โดยในแต่ละเครื่องหมายถึงจำนวนแอลลีล
ขึ้นจำนวนไม่น้อยกว่า 4 แอลลีล และมีรูปแบบชุดซ้ำของนิวคลีโอไทด์ตั้งแต่ 4-5 ซ้ำต่อชุด (Tetra/Penta-nucleotide repeat) (ต่อ)

เครื่องหมาย	Primer Sequence (3'-->5')	รูปแบบซ้ำ	ประเภทซ้ำ	ความยาว	จำนวน	ชนิดสัตว์	งานวิจัยอ้างอิง
		(motif)	(nucleotide repeat)	(bp)	แอลลีล		
F42	F: CCCACGTGGACTAATCAAAT R: CACTGCACAAATTAAGAGGC	(A) ₁₁	-	134 -	7	เสือโคร่ง	(Zhang et al., 2006)
		(AAGG) ₂		176			
		(AAAG) ₁₇					
		(AAGG) ₃	Tetra	14		เสือโคร่ง	(Xu et al., 2005)
FCA043	F: GTTGTGGTCGTGGTGATTCCA R: GAGAAGCACACTCTCTCGCTCT	(AAAA) ₁₃	Tetra	226 - 250	7	เสือดาว	(Mondol et al., 2009)
		(GACA) ₁₅	Tetra	110 - 165	8	เสือดาว	(Singh et al., 2022)
FCA272	F: GAATGACCCCAATATCCAAAT R: GCTTGGCCTCTTGACTGAATAT	(CAAT) ₁₅	Tetra	100 - 130	11	เสือดาว	(Singh et al., 2022)
Fca742a	F: AAATTTCAAATGTCTTGACAACGCATAAG R: GCCAGGAACACCATGTTGGGCTA	-	Tetra	191 - 207	5	เสือดาว	(Pandey et al., 2021)

ตารางผนวกที่ ข-1 แสดงรายละเอียดเครื่องมือโครมาโตกราฟีที่ได้จากการคัดกรองเบื้องต้นด้วยวิธีการตรวจเอกสาร โดยในแต่ละเครื่องหมายถึงจำนวนแอลลีล
ขั้นต่ำจำนวนไม่น้อยกว่า 4 แอลลีล และมีรูปแบบชุดซ้ำของนิวคลีโอไทด์ตั้งแต่ 4-5 ซ้ำต่อชุด (Tetra/Penta-nucleotide repeat) (ต่อ)

เครื่องหมาย	Primer Sequence (3'→5')	รูปแบบซ้ำ	ประเภทซ้ำ	ความยาว	จำนวน	ชนิดสัตว์	งานวิจัยอ้างอิง
(motif) (nucleotide repeat) (bp) แอลลีล							
FCA391	F: GCCTTCTAACTTCCTTCGAGA	(ATGG) ₇	Tetra	200 – 224	7	เสือโคร่ง	(Zhang et al., 2006)
	R: TTTAGGTAGCCCATTTTCATCA	ATT					
		(GATG) ₂ G					
		(GATA) ₁₂					
FCA441	F: ATCGGTAGGTAGGTAGATATAG	(ATAG) _n	Tetra	138 – 166	8	เสือโคร่ง	(Zou et al., 2015)
	R: GCTTGCTTCAAAATTTTCAC						
		(ATAG) ₉	–	–	6	เสือโคร่ง	(Xu et al., 2005)
		(GTAG) ₁					
		(ATAG) ₂					
		AG					
		(ATAG) ₁					

ตารางผนวกที่ ข-1 แสดงรายละเอียดเครื่องมือไบโครเซตเทคโนโลยีที่ได้จากการคัดกรองเบื้องต้นด้วยวิธีการตรวจเอกสาร โดยในแต่ละเครื่องหมายถึงจำนวนแอลลิล
ขั้นต่ำจำนวนไม่น้อยกว่า 4 แอลลิล และมีรูปแบบชุดซ้ำของนิวคลีโอไทด์ตั้งแต่ 4-5 ซ้ำต่อชุด (Tetra/Penta-nucleotide repeat) (ต่อ)

เครื่องหมาย	Primer Sequence (3'-->5')	รูปแบบซ้ำ (motif)	ประเภทซ้ำ (nucleotide repeat)	ความยาว (bp)	จำนวน แอลลิล	ชนิดสัตว์	งานวิจัยอ้างอิง
MsF115	F: CCCAAAGACCTGTTCTCTCTCC R: CCAGATTAAAGATGAGATTATTC	GAAA	Tetra	158 – 174	5	เสือดาว	(Mondol et al., 2012)
* msF41	F: TCAATAGGATTCTGTTCTTGA R: TGAGTTGGCTGTTGATTCATTC	GGAA	Tetra	102 – 122	5	เสือดาว	(Mondol et al., 2012)
msF42	F: TAATTATGAGGTGCTTTTAAAG R: GTTTTAGTTTTTCTCTATCC	GAAA	Tetra	152 – 180	5	เสือโคร่ง	(Mondol et al., 2012)
* msFCA391	F: GAAGTTACATCAAAAATGCCTG R: TTCCTTCAAAATTCATTGAA	TAGA	Tetra	128 – 156	15	เสือดาว	(Mondol et al., 2015)
* msFCA441	F: TATCGGTAGGTAGGTAGATATA R: TATGGCACAAAGCCTTGAAGCAA	GATA	Tetra	94 – 118	23	เสือดาว	(Mondol et al., 2015)
* msFCA453	F: AAACCATTTTGACAATAAATGT R: CCTCTATGGCAGGACTTTGATT	ATAG	Tetra	70 – 90	15	เสือดาว	(Mondol et al., 2015)

ตารางผนวกที่ ข-1 แสดงรายละเอียดเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ที่ได้จากการคัดกรองเบื้องต้นด้วยวิธีการตรวจเอกสาร โดยในแต่ละเครื่องหมายถึงจำนวนแอลลีล
ขึ้นต่ำจำนวนไม่น้อยกว่า 4 แอลลีล และมีรูปแบบชุดซ้ำของนิวคลีโอไทด์ตั้งแต่ 4-5 ซ้ำต่อชุด (Tetra/Penta-nucleotide repeat) (ต่อ)

เครื่องหมาย	Primer Sequence (3'-->5')	รูปแบบซ้ำ	ประเภทซ้ำ	ความยาว	จำนวน	ชนิดสัตว์	งานวิจัยอ้างอิง
(motif) (nucleotide repeat) (bp)							
Pan3A2	F: TTT CTG ATT CGG CCC TTT	(AGAC) _n	Tetra	202 – 214	4	เสือดาว	(Hyun et al., 2021)
	R: CCT GAG ATG GTT CCT GAG TTT						
Pan4A2	F: GAGAAGCATTACAAGAAGCA	(AACA) _n	Tetra	138 – 162	5	เสือดาว	(Hyun et al., 2021)
	R: CAGTCGTCACAGAAGGAAC						
Pan7A1	F: TACATCCCCTCCTTCCATCT	(ATCT) _n	Tetra	165 – 185	6	เสือดาว	(Hyun et al., 2021)
	R: ATATTCCCAGTGCCTCCT						
Pati16	F: CTGCCTGGAGTTGATGGG	(AGAT) ₅	Tetra	243 – 263	5	เสือโคร่ง	(Wu et al., 2009)
	R: ACGCTGGAGAAATACACCTGA	(GATA) ₁₃					
Pati18	F: TGTTTGGCTATAACCATT	(CAGA) ₆	Tetra	202 – 226	7	เสือโคร่ง	(Wu et al., 2009)
	R: AACCCAGTGCTCCTTGT	CAT					
(ATAG) ₁₁							
Pati19	F: CCTGCCTGGAGTTGATGG	(AGAT) ₅	Tetra	245 – 265	5	เสือโคร่ง	(Wu et al., 2009)
	R: ACGCTGGAGAAATACACCTGA	(GATA) ₁₄					

ตารางผนวกที่ ข-1 แสดงรายละเอียดเครื่องมือวิเคราะห์ที่ได้จากการคัดกรองเบื้องต้นด้วยวิธีการตรวจเอกสาร โดยในแต่ละเครื่องหมายถึงจำนวนแอลลีล
 ขึ้นต่ำจำนวนไม่น้อยกว่า 4 แอลลีล และมีรูปแบบชุดซ้ำของนิวคลีโอไทด์ตั้งแต่ 4-5 ซ้ำต่อชุด (Tetra/Penta-nucleotide repeat) (ต่อ)

เครื่องหมาย	Primer Sequence (3'-->5')	รูปแบบซ้ำ (motif)	ประเภทซ้ำ (nucleotide repeat)	ความยาว (bp)	จำนวน	ชนิดสัตว์	งานวิจัยอ้างอิง
* Pati20	F: TTAACAATGCAACATACAG R: TTTTCACCTTCCTTCG	(GATA) ₁₀	Tetra	247 – 279	5	เสือโคร่ง	(Wu et al., 2009)
Pati21	F: GGGCAAATACACTAACCA R: CTCCTGCTAGAAATCTCCAA	(TCTG) ₃ (TCTA) ₉	Tetra	300 – 324	6	เสือโคร่ง	(Wu et al., 2009)
PONCA1	F: GAGAGGAGCAGCCAGGAAA R: ACGGAGAAATGCTCCTATGAA	(TCTG) ₄ GAAA	Tetra	222 – 250	8	เสือจากัวร์	(Corner et al., 2019)
PONCA3	F: AGTGTCTAGAAGGTGAGTGACAGAA R: CCCATTATTCTATATGAGGA	GAAA	Tetra	251 – 284	9	เสือจากัวร์	(Corner et al., 2019)
PONCB3	F: CCAGGAACCCATGATTCAA R: TCCCCTTCCACTTTCAAAAA	TTTC	Tetra	277 – 306	10	เสือจากัวร์	(Corner et al., 2019)
PONCB4	F: TGGGTGATAAAGCCAAAGAA R: GCGAAGGATGTCACCATGAA	TTTC	Tetra	250 – 268	6	เสือจากัวร์	(Corner et al., 2019)

ตารางผนวกที่ ข-1 แสดงรายละเอียดเครื่องมือวิเคราะห์ที่ได้จากการคัดกรองเบื้องต้นด้วยวิธีการตรวจเอกสาร โดยในแต่ละเครื่องหมายถึงจำนวนแอลลีล
ขั้นต่ำจำนวนไม่น้อยกว่า 4 แอลลีล และมีรูปแบบชุดซ้ำของนิวคลีโอไทด์ตั้งแต่ 4-5 ซ้ำต่อชุด (Tetra/Penta-nucleotide repeat) (ต่อ)

เครื่องหมาย	Primer Sequence (3'-->5')	รูปแบบซ้ำ	ประเภทซ้ำ	ความยาว	จำนวน	ชนิดสัตว์	งานวิจัยอ้างอิง
(motif) (nucleotide repeat) แอลลีล							
PONCE3	F: CTGTTATAGAGGCCAAGAGGAA	TTTA	Tetra	129 – 154	6	เสือจากัวร์	(Corner et al., 2019)
	R: TGTCTCATTGGACGGGTCA						
PttB3	F: GAATGACCCCAAAATATCCAAAT	(CCTT) ₁₀	Tetra	241 – 253	7	เสือโคร่ง	(Sharma et al., 2008)
	R: GCTTGGCCTCTTGACTGAATAT						
PttD5	F: GTGCTGCACCTGTCAGCACAA	-	Tetra	235 – 259	6	เสือดำ	(Pandey et al., 2021)
	R: GTTGTGGTCGTGGTGATTCCAT						
PttG4	F: GATTCCAATACCTTCCAAGAGG	(GAAA) ₆	Tetra	201 – 278	8	เสือโคร่ง	(Sharma et al., 2008)
	R: GAGAAGCACACTCTCTCGCTCT	GA (GAAA) ₁					
PttG4	F: GATTCCAATACCTTCCAAGAGG	(CTTT) ₁₁	Tetra	100 – 120	5	เสือโคร่ง	(Sharma et al., 2008)
	R: GAGAAGCACACTCTCTCGCTCT						

ตารางผนวกที่ ข-1 แสดงรายละเอียดเครื่องมือโครมาโตกราฟีที่ได้จากการคัดกรองเบื้องต้นด้วยวิธีการตรวจเอกสาร โดยในแต่ละเครื่องหมายถึงจำนวนแอลลีล
ขั้นต่ำจำนวนไม่น้อยกว่า 4 แอลลีล และมีรูปแบบชุดซ้ำของนิวคลีโอไทด์ตั้งแต่ 4-5 ซ้ำต่อชุด (Tetra/Penta-nucleotide repeat) (ต่อ)

เครื่องมือ Primer Sequence (3'-->5')		รูปแบบซ้ำ	ประเภทซ้ำ	ความยาว	จำนวน	ชนิดสัตว์	งานวิจัยอ้างอิง
		(motif)	(nucleotide repeat)	(bp)	แอลลีล		
** PTZF	F: GTACAGWAYSMTGAAT	—	—	138 / 150	2	เสือโคร่ง	(McEwing et al., 2012)
R:	AAGTGTGYGTTCTGAACAT						

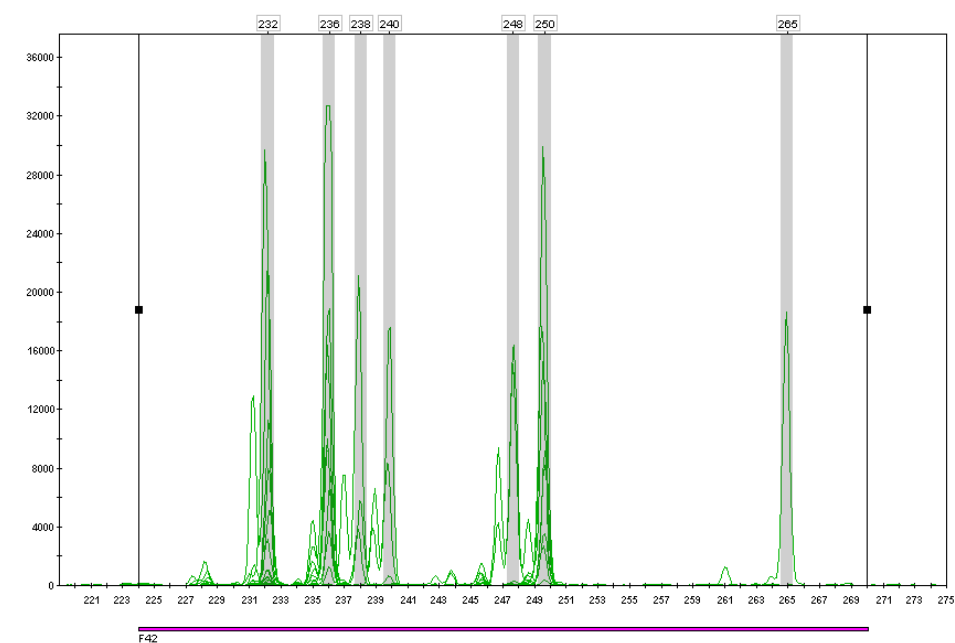
* และ ** หมายถึง เครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์เพื่อใช้ตรวจพิสูจน์ในงานนิติวิทยาศาสตร์ของศูนย์นิติวิทยาศาสตร์สัตว์ป่า

** หมายถึง เครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์สำหรับใช้จำแนกเพศเสือโคร่งสำหรับใช้ในงานนิติวิทยาศาสตร์ของศูนย์นิติวิทยาศาสตร์สัตว์ป่า

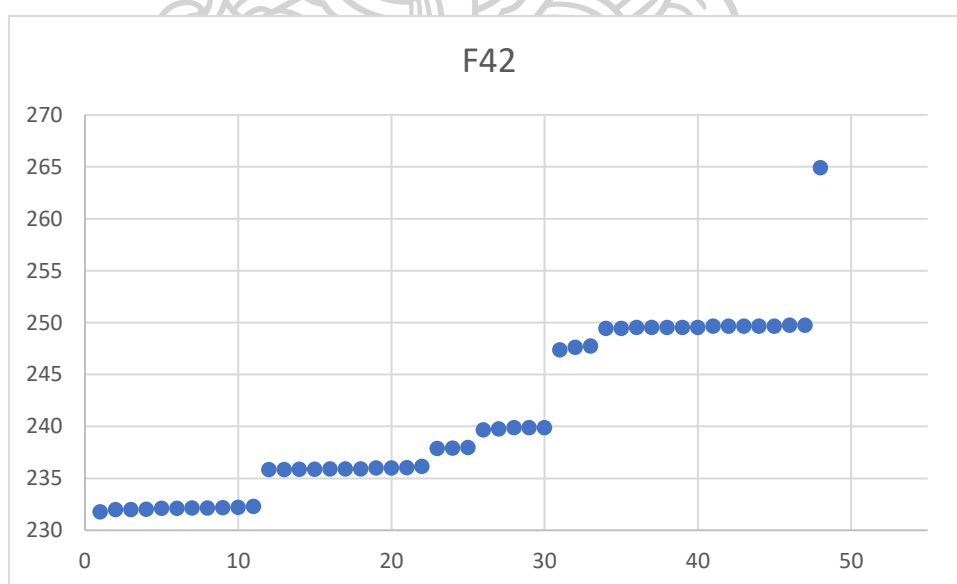


ภาคผนวก ค

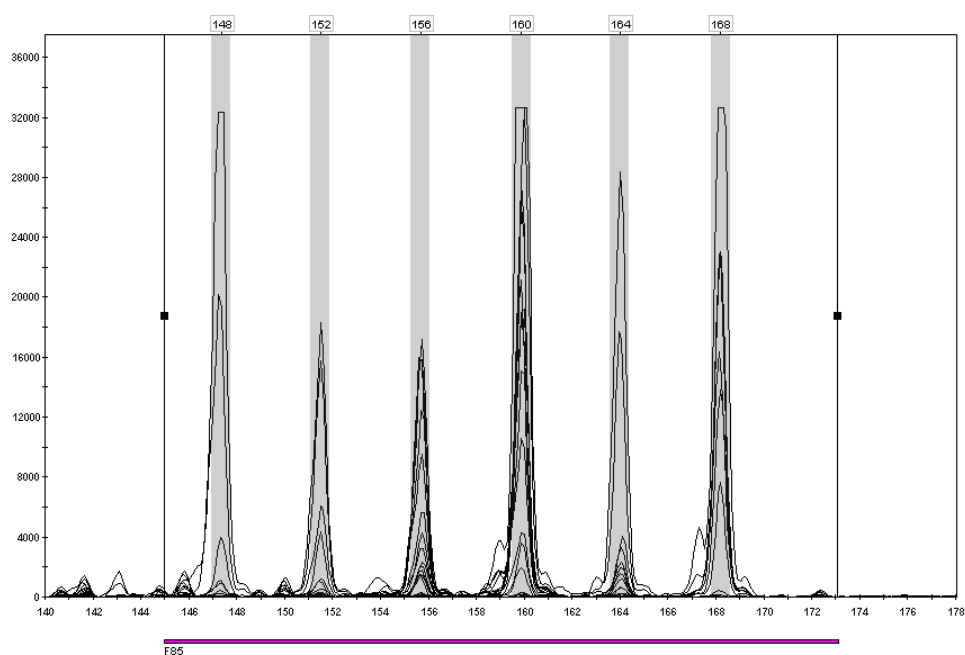
ลักษณะการซ้อนทับของฟิค ระยะห่างระหว่างแอลลีล
และกราฟขนาดของแอลลีลของเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์



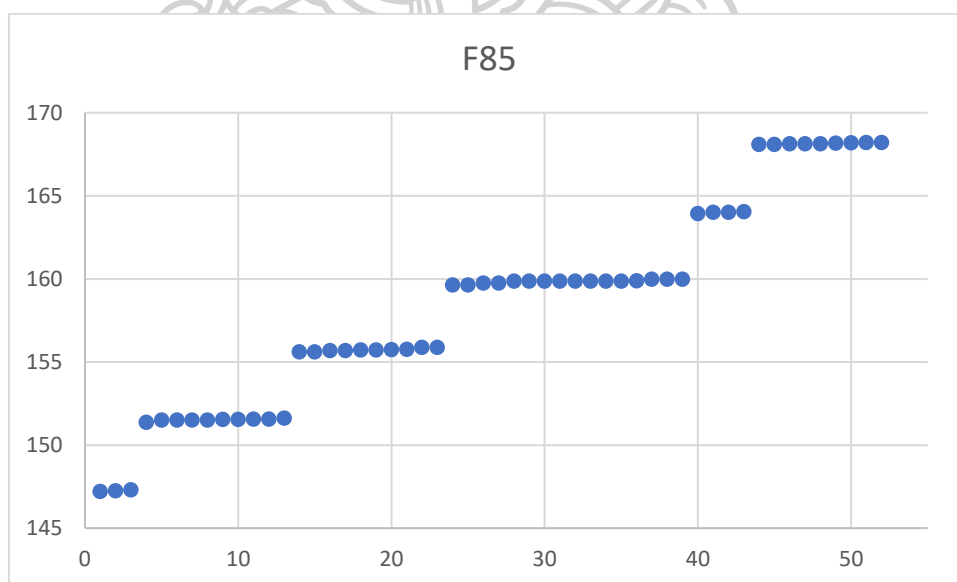
ภาพผนวกที่ ค-1 แสดงลักษณะการซ้อนทับของพีคและระยะห่างระหว่างขนาดแอลลีลของ
เครื่องมือ F42 ที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างเลือดดาวในห้องปฏิบัติการ
จำนวน 24 ตัวอย่าง



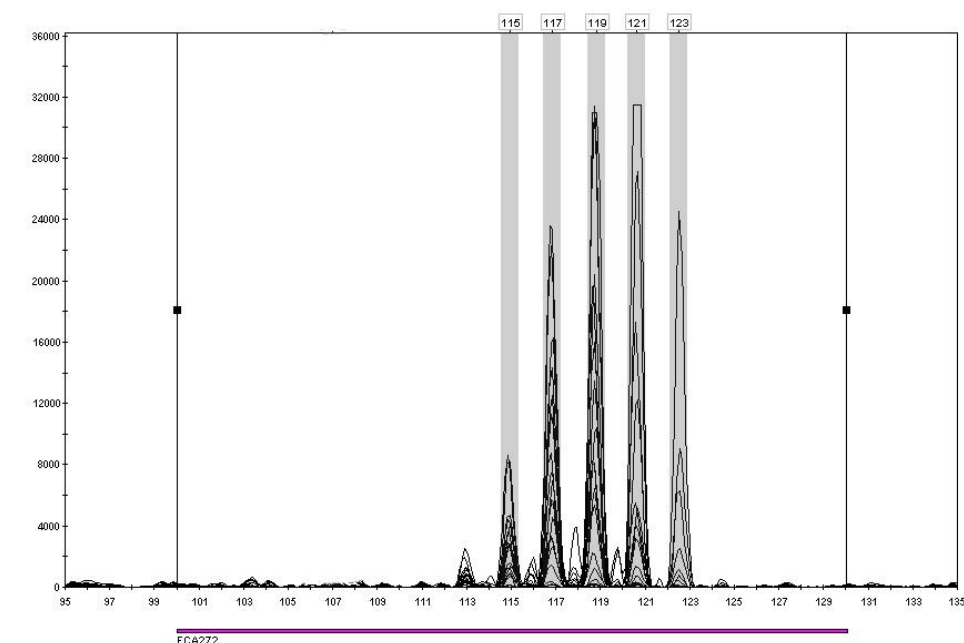
ภาพผนวกที่ ค-2 แสดงลักษณะกราฟจำนวนแอลลีลของตัวอย่างทั้งหมดและขนาดของแอลลีล
ของเครื่องมือ F42 ที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างเลือดดาวในห้องปฏิบัติการ
จำนวน 24 ตัวอย่าง (48 แอลลีล)



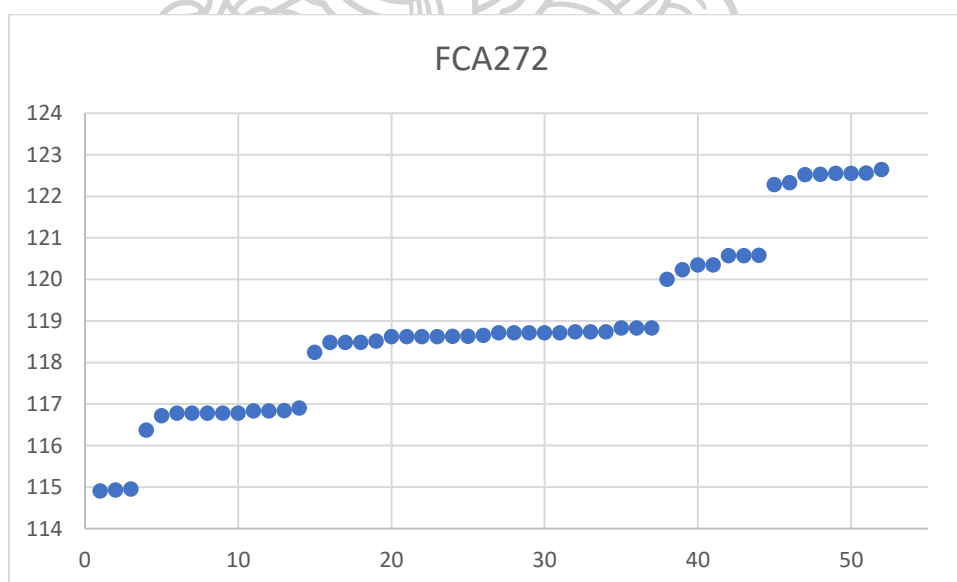
ภาพผนวกที่ ค-3 แสดงลักษณะการซ้อนทับของพีคและระยะห่างระหว่างขนาดแอลลีลของ
เครื่องหมาย F85 ที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างเลือดดาวในห้องปฏิบัติการ
จำนวน 26 ตัวอย่าง



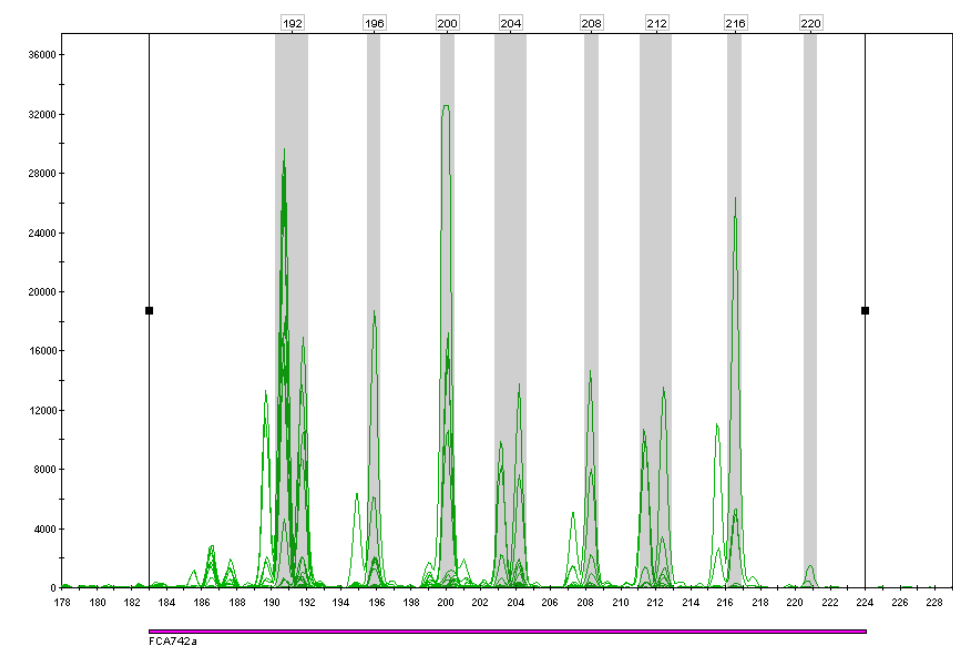
ภาพผนวกที่ ค-4 แสดงลักษณะกราฟจำนวนแอลลีลของตัวอย่างทั้งหมดและขนาดของแอลลีล
ของเครื่องหมาย F85 ที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างเลือดดาวในห้องปฏิบัติการ
จำนวน 26 ตัวอย่าง (52 แอลลีล)



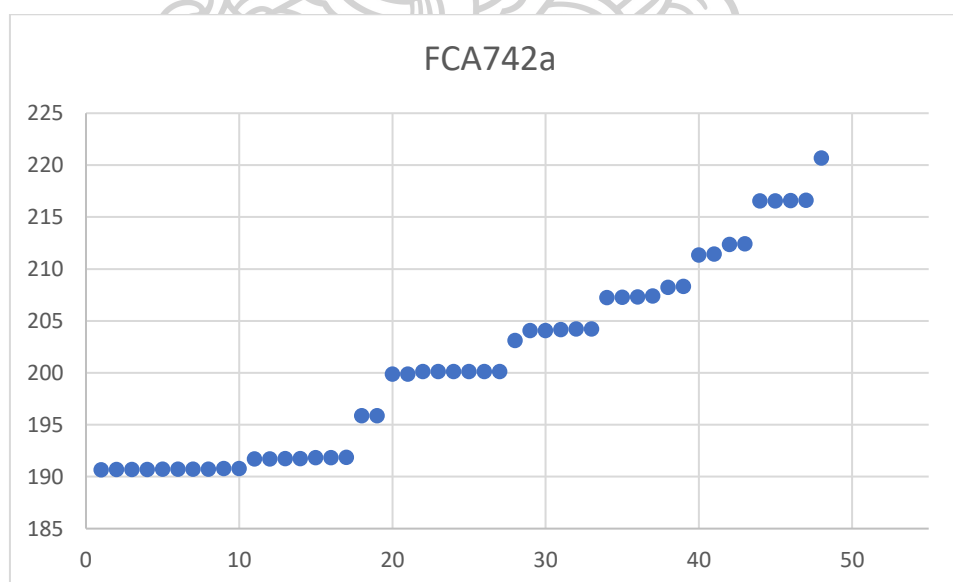
ภาพผนวกที่ ค-5 แสดงลักษณะการซ้อนทับของพีคและระยะห่างระหว่างขนาดแอลลีลของ
เครื่องหมาย FCA272 ที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างเลือดดาวในห้องปฏิบัติการ
จำนวน 26 ตัวอย่าง



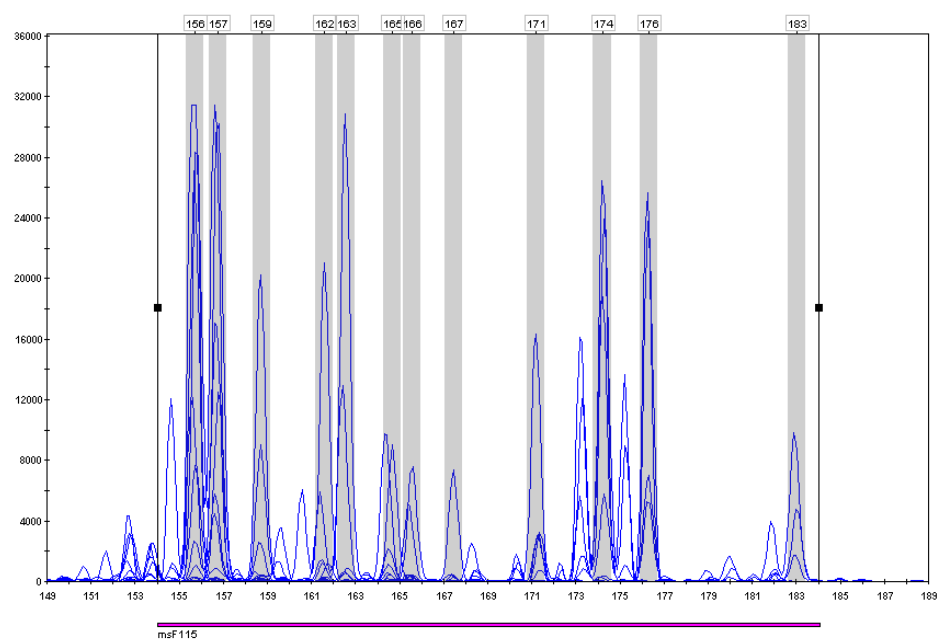
ภาพผนวกที่ ค-6 แสดงลักษณะกราฟจำนวนแอลลีลของตัวอย่างทั้งหมดและขนาดของแอลลีลของ
เครื่องหมาย FCA272 ที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างเลือดดาวในห้องปฏิบัติการ
จำนวน 26 ตัวอย่าง (52 แอลลีล)



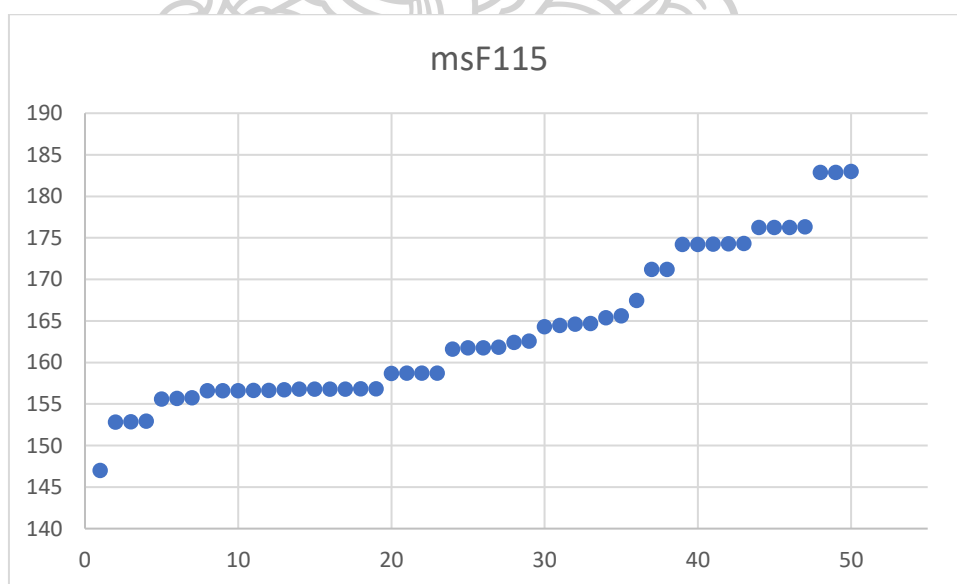
ภาพผนวกที่ ค-7 แสดงลักษณะการซ้อนทับของพีคและระยะห่างระหว่างขนาดแอลลีลของ
เครื่องหมาย FCA742a ที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างเลือดดาวในห้องปฏิบัติการ
จำนวน 24 ตัวอย่าง



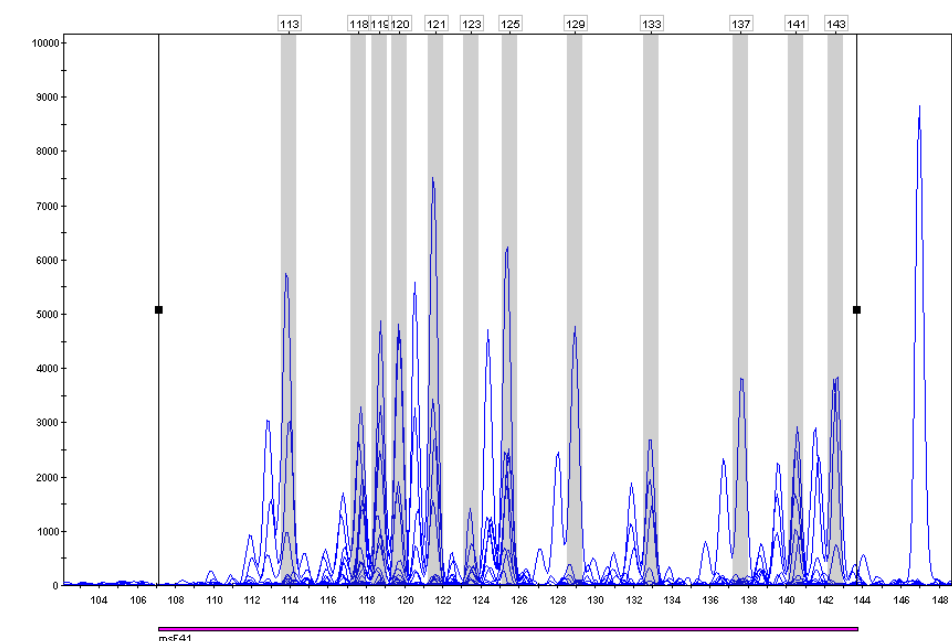
ภาพผนวกที่ ค-8 แสดงลักษณะกราฟจำนวนแอลลีลของตัวอย่างทั้งหมดและขนาดของแอลลีลของ
เครื่องหมาย FCA742a ที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างเลือดดาวในห้องปฏิบัติการ
จำนวน 24 ตัวอย่าง (48 แอลลีล)



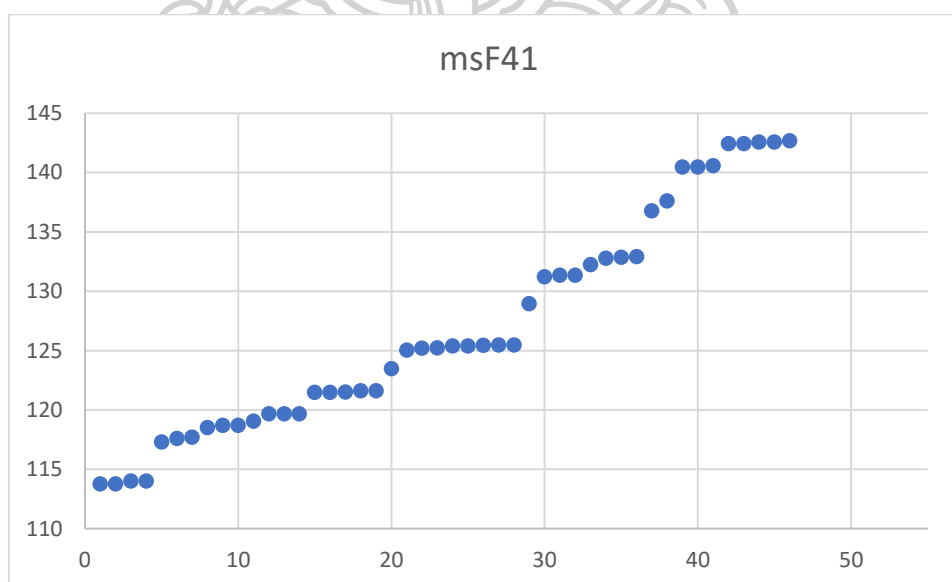
ภาพผนวกที่ ค-9 แสดงลักษณะการซ้อนทับของพีคและระยะห่างระหว่างขนาดแอลลีลของ
เครื่องหมาย msF115 ที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างเลือดดาวในห้องปฏิบัติการ
จำนวน 25 ตัวอย่าง



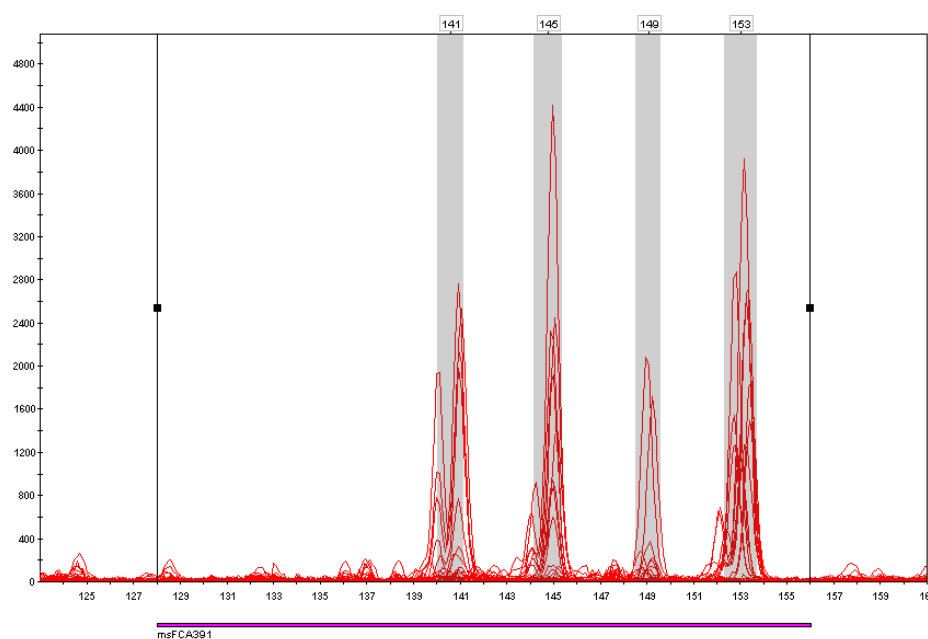
ภาพผนวกที่ ค-10 แสดงลักษณะกราฟจำนวนแอลลีลของตัวอย่างทั้งหมดและขนาดของแอลลีลของ
เครื่องหมาย msF115 ที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างเลือดดาวในห้องปฏิบัติการ
จำนวน 25 ตัวอย่าง (50 แอลลีล)



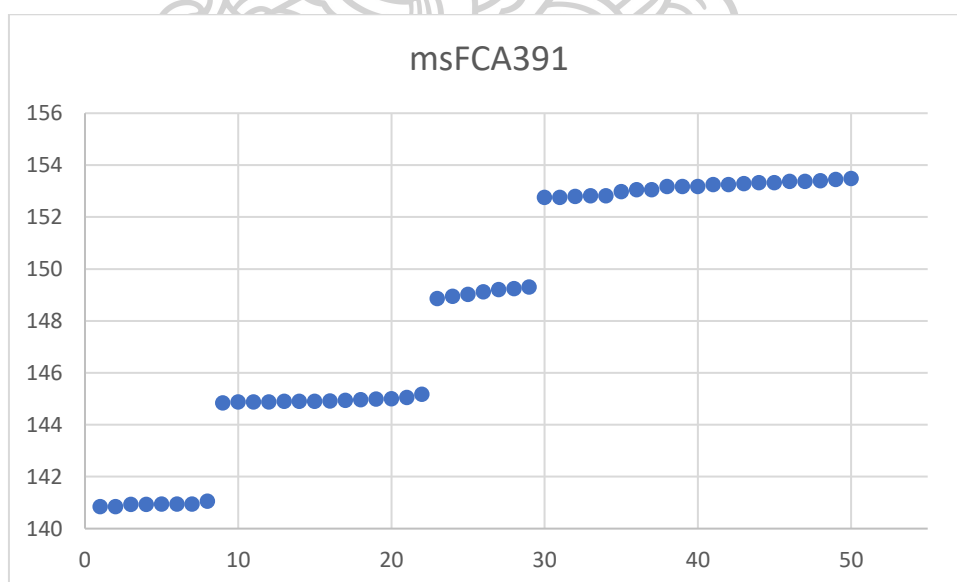
ภาพผนวกที่ ค-11 แสดงลักษณะการซ้อนทับของพีคและระยะห่างระหว่างขนาดแอลลีลของ
เครื่องหมาย msF41 ที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างเลือดดาวในห้องปฏิบัติการ
จำนวน 23 ตัวอย่าง



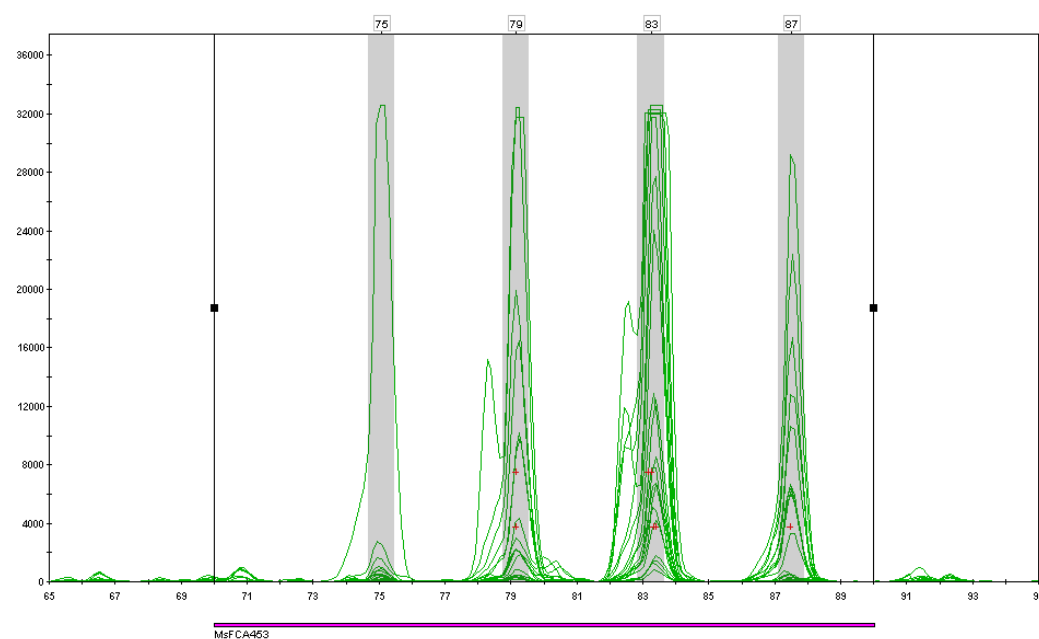
ภาพผนวกที่ ค-12 แสดงลักษณะกราฟจำนวนแอลลีลของตัวอย่างทั้งหมดและขนาดของแอลลีลของ
เครื่องหมาย msF41 ที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างเลือดดาวในห้องปฏิบัติการ
จำนวน 23 ตัวอย่าง (46 แอลลีล)



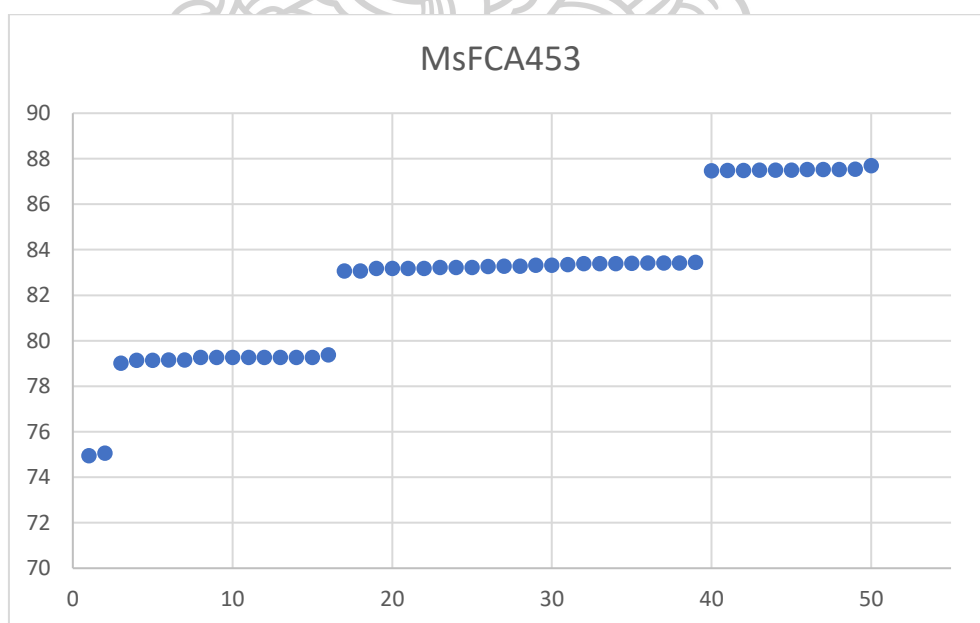
ภาพผนวกที่ ค-13 แสดงลักษณะการซ้อนทับของพีคและระยะห่างระหว่างขนาดแอลลีลของ
เครื่องหมาย msFCA391 ที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างเลือดดาวในห้องปฏิบัติการ
จำนวน 25 ตัวอย่าง



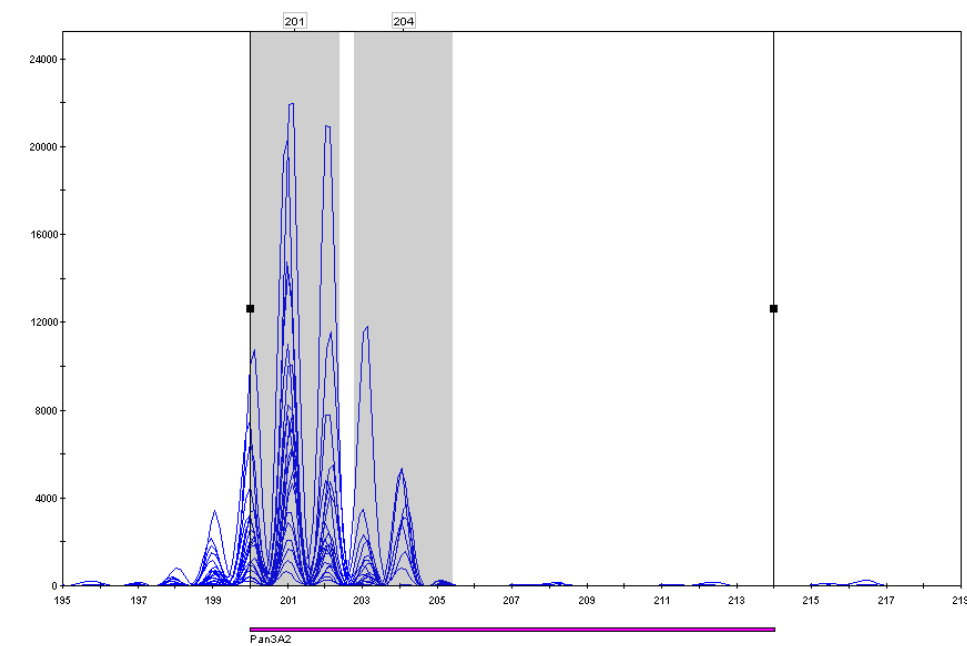
ภาพผนวกที่ ค-14 แสดงลักษณะกราฟจำนวนแอลลีลของตัวอย่างทั้งหมดและขนาดของแอลลีลของ
เครื่องหมาย msFCA391 ที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างเลือดดาวในห้องปฏิบัติการ
จำนวน 25 ตัวอย่าง (50 แอลลีล)



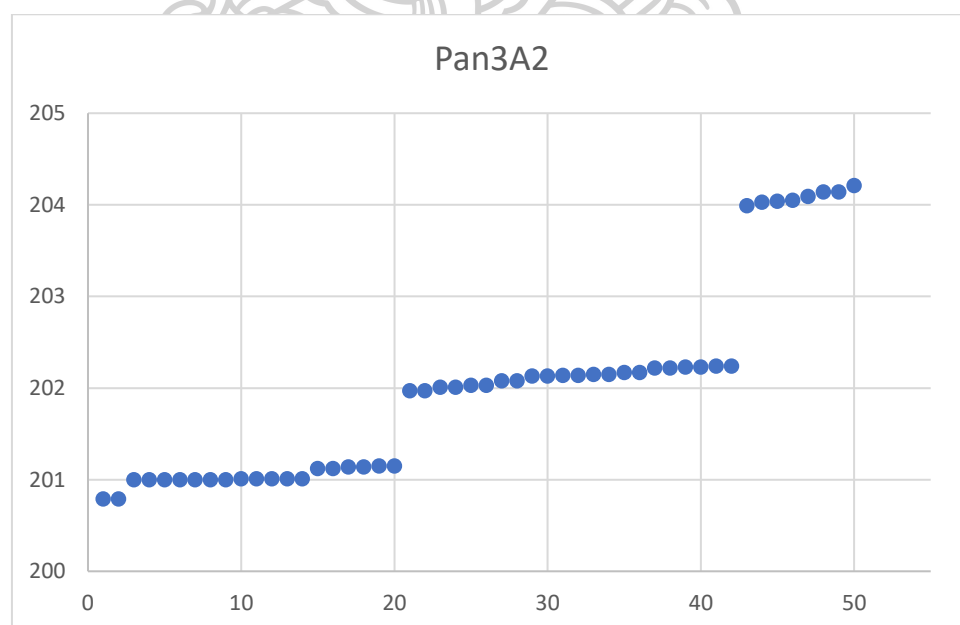
ภาพผนวกที่ ค-17 แสดงลักษณะการซ้อนทับของพีคและระยะห่างระหว่างขนาดแอลลีลของ
เครื่องหมาย msFCA453 ที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างเลือดดาวในห้องปฏิบัติการ
จำนวน 25 ตัวอย่าง



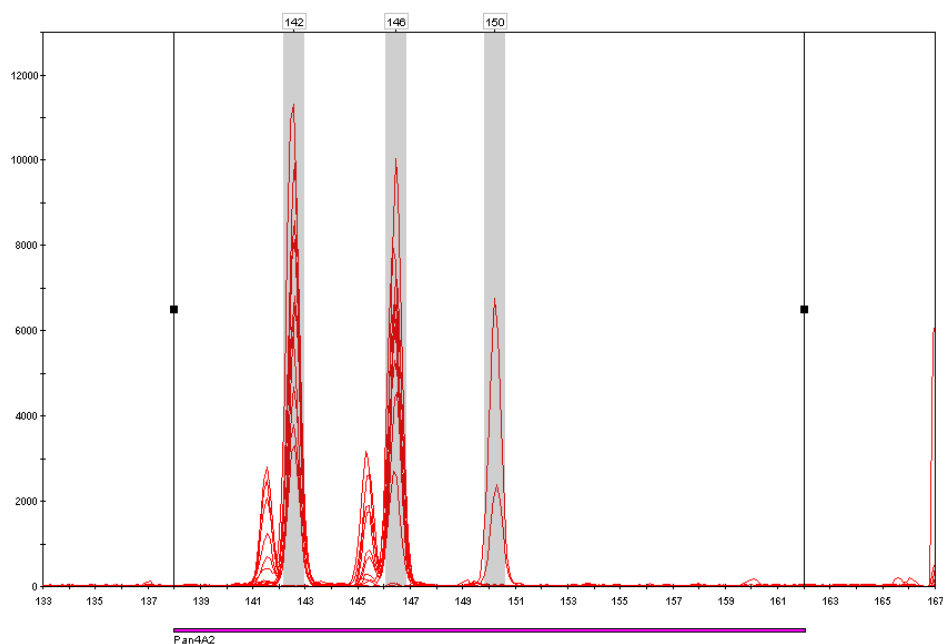
ภาพผนวกที่ ค-18 แสดงลักษณะกราฟจำนวนแอลลีลของตัวอย่างทั้งหมดและขนาดของแอลลีลของ
เครื่องหมาย msFCA453 ที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างเลือดดาวในห้องปฏิบัติการ
จำนวน 25 ตัวอย่าง (50 แอลลีล)



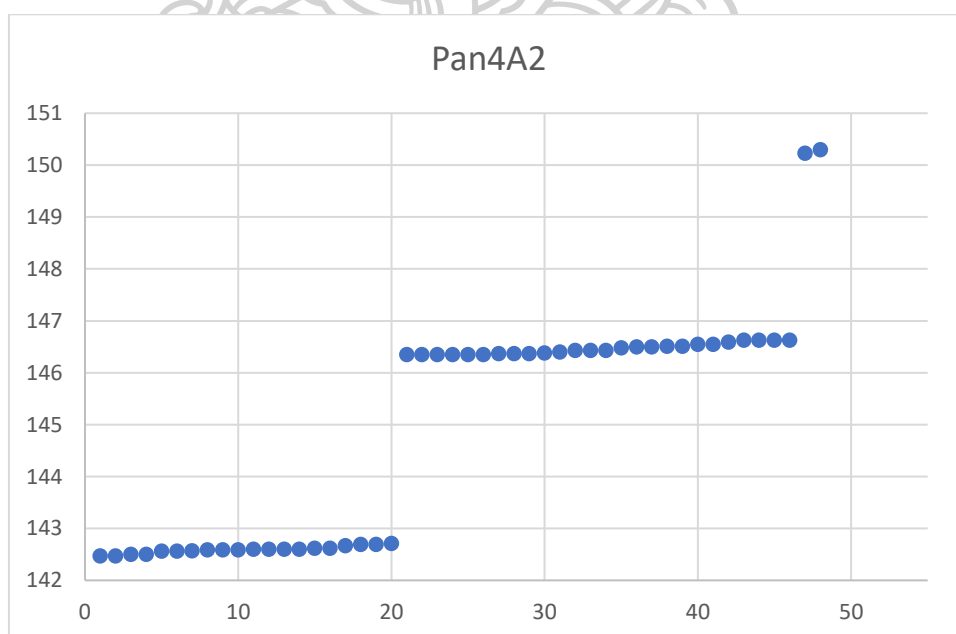
ภาพผนวกที่ ค-19 แสดงลักษณะการซ้อนทับของพีคและระยะห่างระหว่างขนาดแอลลีลของ
เครื่องหมาย Pan3A2 ที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างเลือดดาวในห้องปฏิบัติการ
จำนวน 25 ตัวอย่าง



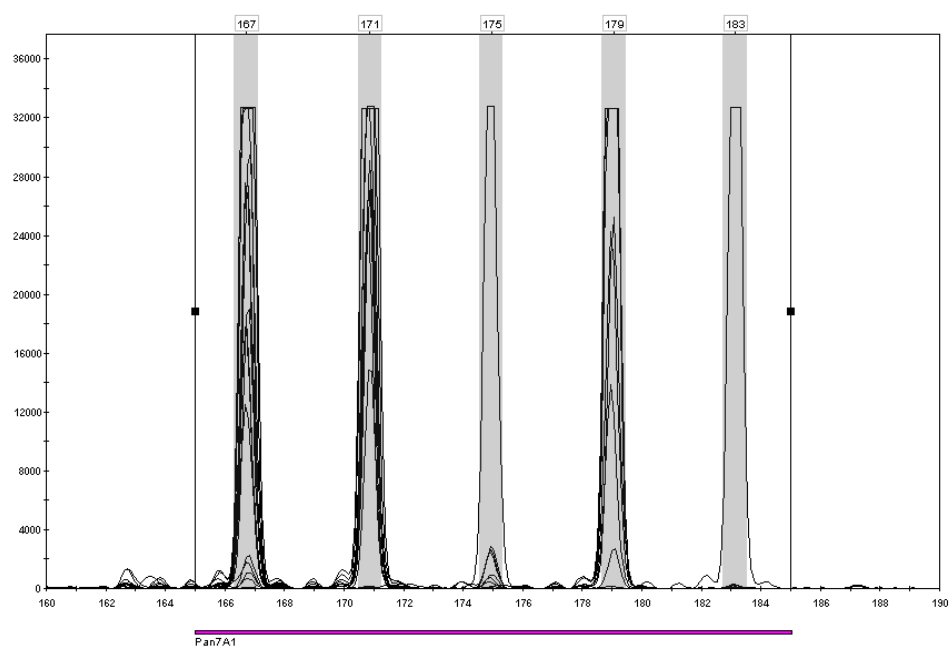
ภาพผนวกที่ ค-20 แสดงลักษณะกราฟจำนวนแอลลีลของตัวอย่างทั้งหมดและขนาดของแอลลีลของ
เครื่องหมาย Pan3A2 ที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างเลือดดาวในห้องปฏิบัติการ
จำนวน 25 ตัวอย่าง (50 แอลลีล)



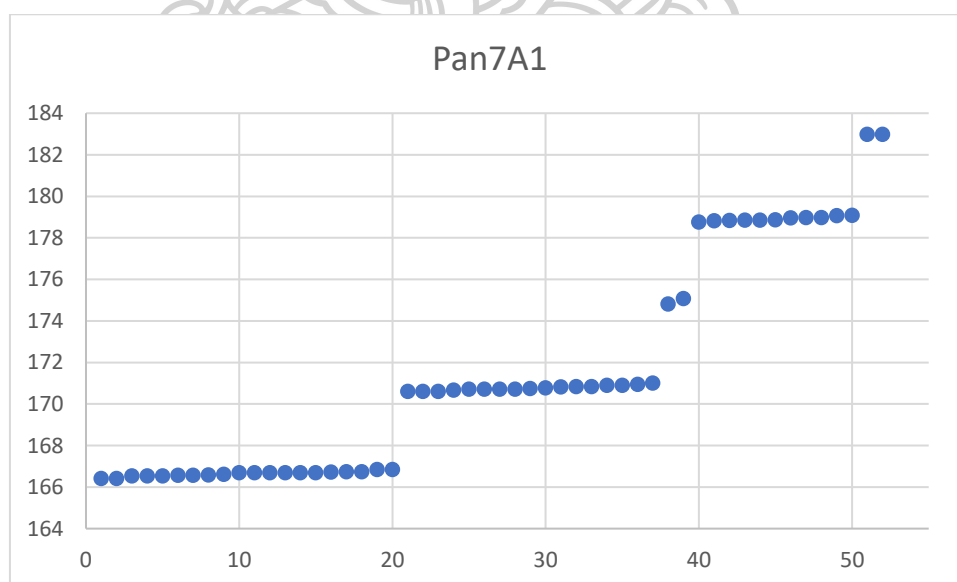
ภาพผนวกที่ ค-21 แสดงลักษณะการซ้อนทับของพีคและระยะห่างระหว่างขนาดแอลลีลของ
เครื่องหมาย Pan4A2 ที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างเลือดดาวในห้องปฏิบัติการ
จำนวน 24 ตัวอย่าง



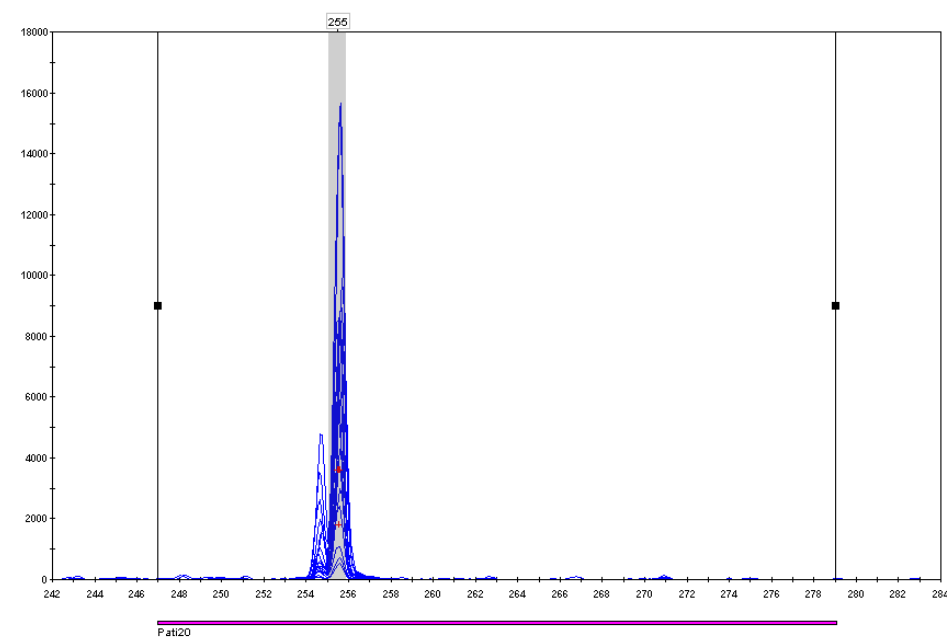
ภาพผนวกที่ ค-22 แสดงลักษณะกราฟจำนวนแอลลีลของตัวอย่างทั้งหมดและขนาดของแอลลีลของ
เครื่องหมาย Pan4A2 ที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างเลือดดาวในห้องปฏิบัติการ
จำนวน 24 ตัวอย่าง (48 แอลลีล)



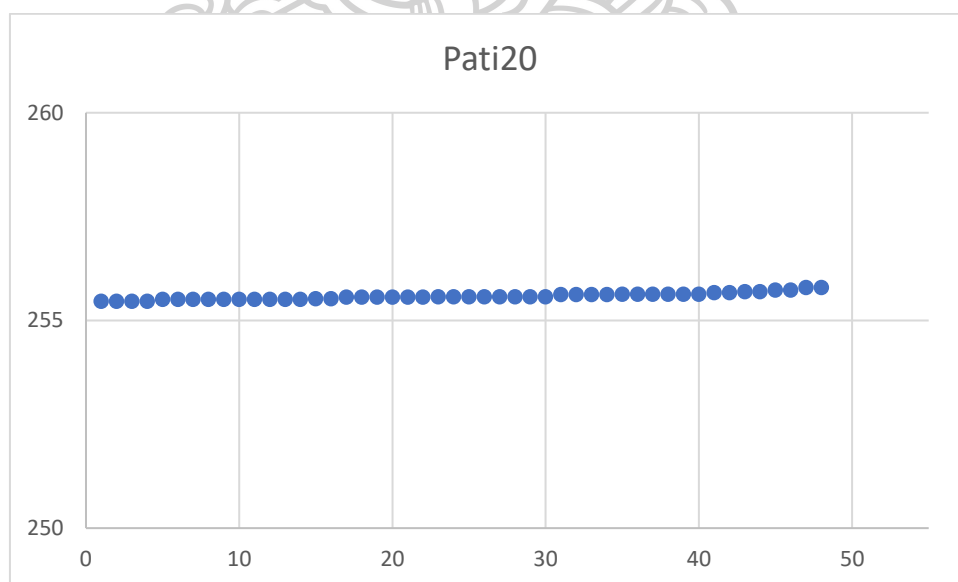
ภาพผนวกที่ ค-23 แสดงลักษณะการซ้อนทับของพีคและระยะห่างระหว่างขนาดแอลลีลของ
เครื่องหมาย Pan7A1 ที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างเลือดดาวในห้องปฏิบัติการ
จำนวน 26 ตัวอย่าง



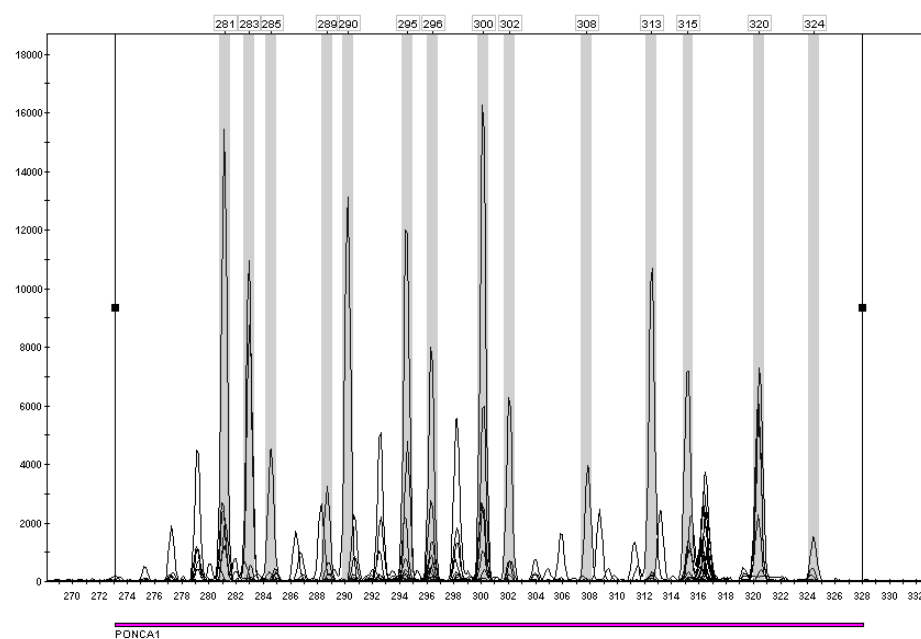
ภาพผนวกที่ ค-24 แสดงลักษณะกราฟจำนวนแอลลีลของตัวอย่างทั้งหมดและขนาดของแอลลีลของ
เครื่องหมาย Pan7A1 ที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างเลือดดาวในห้องปฏิบัติการ
จำนวน 26 ตัวอย่าง (52 แอลลีล)



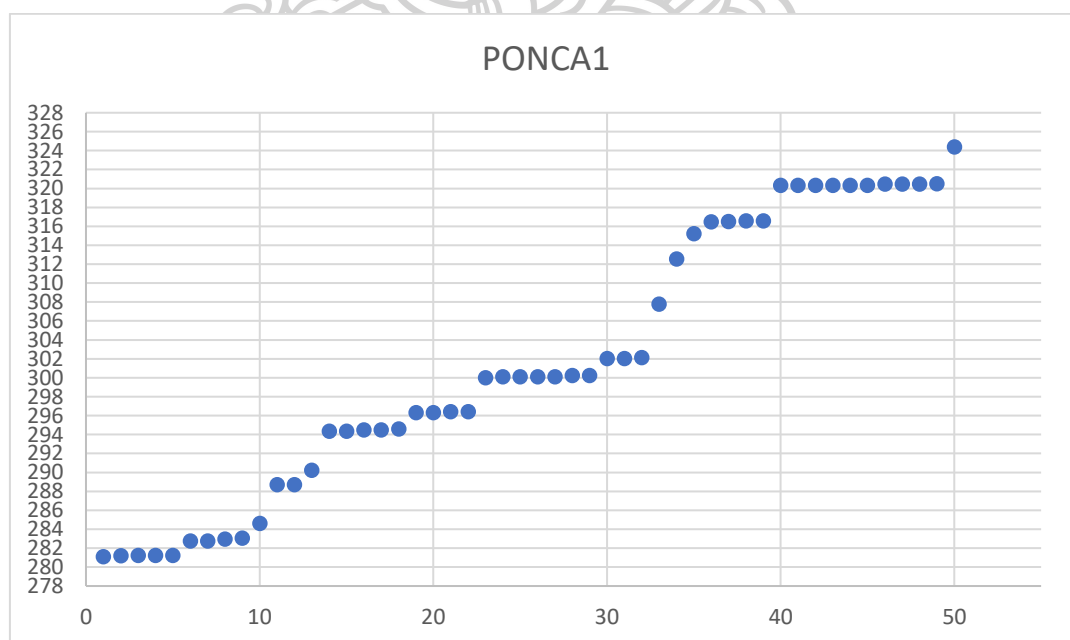
ภาพผนวกที่ ค-25 แสดงลักษณะการซ้อนทับของพีคและระยะห่างระหว่างขนาดแอสลิลของ
เครื่องหมาย Pati20 ที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างเสี้ยวดาวในห้องปฏิบัติการ
จำนวน 24 ตัวอย่าง



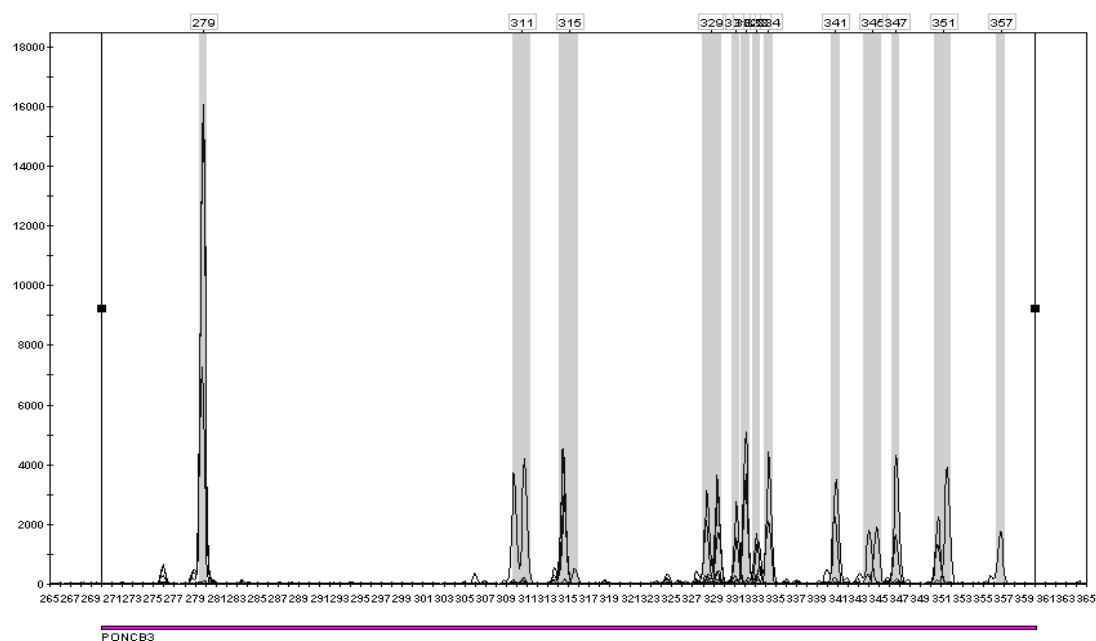
ภาพผนวกที่ ค-26 แสดงลักษณะกราฟจำนวนแอสลิลของตัวอย่างทั้งหมดและขนาดของแอสลิลของ
เครื่องหมาย Pati20 ที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างเสี้ยวดาวในห้องปฏิบัติการ
จำนวน 24 ตัวอย่าง (48 แอสลิล)



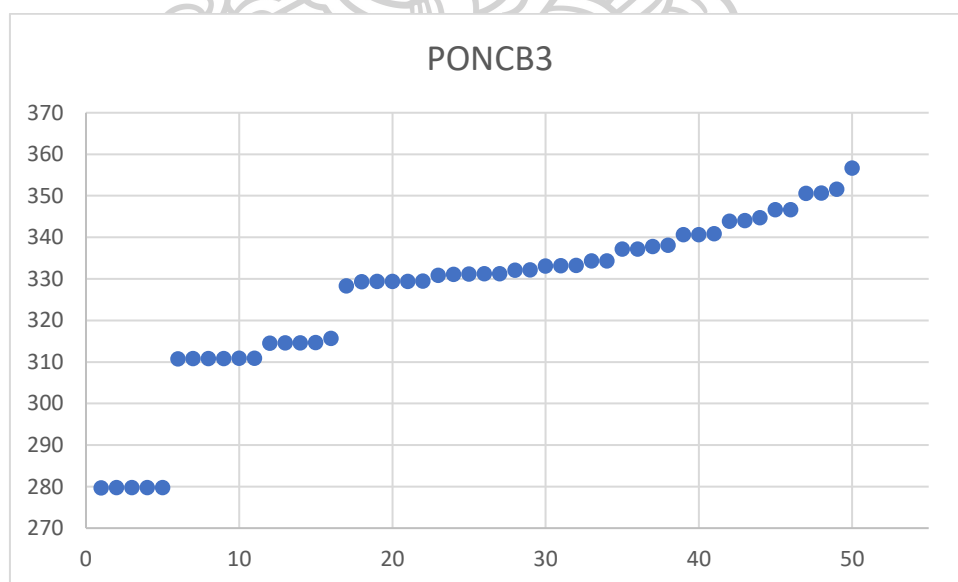
ภาพผนวกที่ ค-27 แสดงลักษณะการซ้อนทับของพีคและระยะห่างระหว่างขนาดแอลลีลของ
เครื่องหมาย PONCA1 ที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างเลือดดาวในห้องปฏิบัติการ
จำนวน 25 ตัวอย่าง



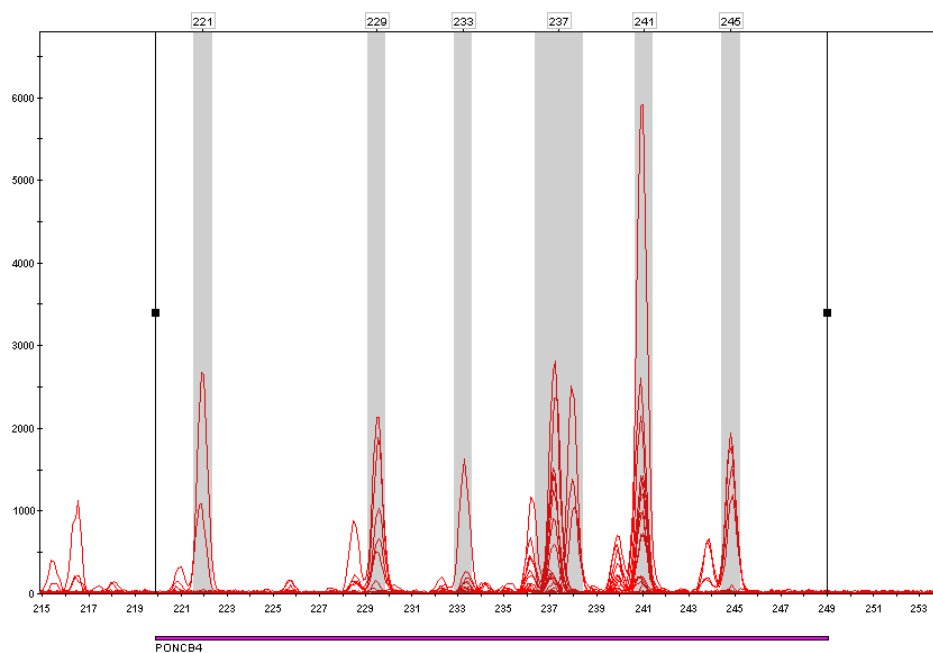
ภาพผนวกที่ ค-28 แสดงลักษณะกราฟจำนวนแอลลีลของตัวอย่างทั้งหมดและขนาดของแอลลีลของ
เครื่องหมาย PONCA1 ที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างเลือดดาวในห้องปฏิบัติการ
จำนวน 25 ตัวอย่าง (50 แอลลีล)



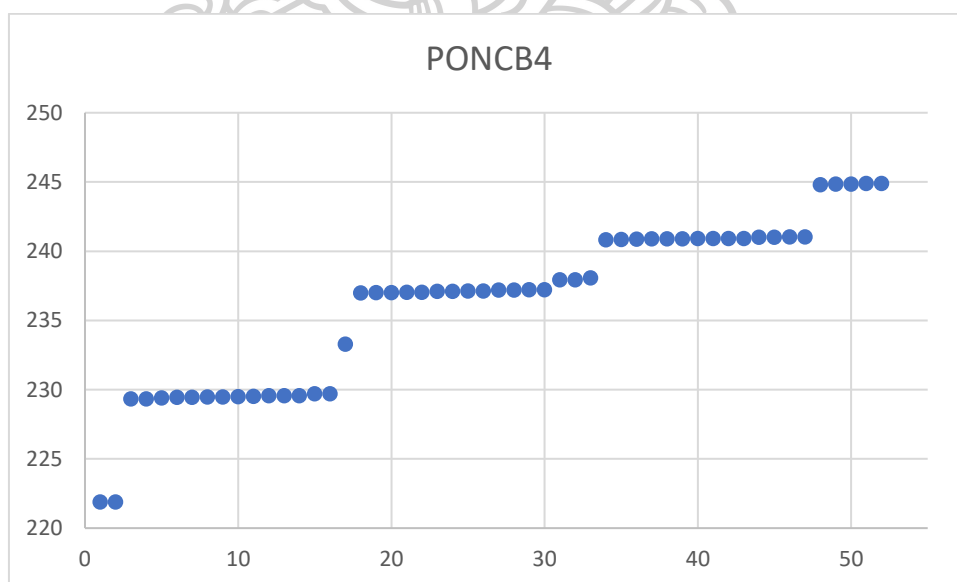
ภาพผนวกที่ ค-29 แสดงลักษณะการซ้อนทับของพีคและระยะห่างระหว่างขนาดแอลลีลของ
เครื่องหมาย PONCB3 ที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างเลือดดาวในห้องปฏิบัติการ
จำนวน 25 ตัวอย่าง



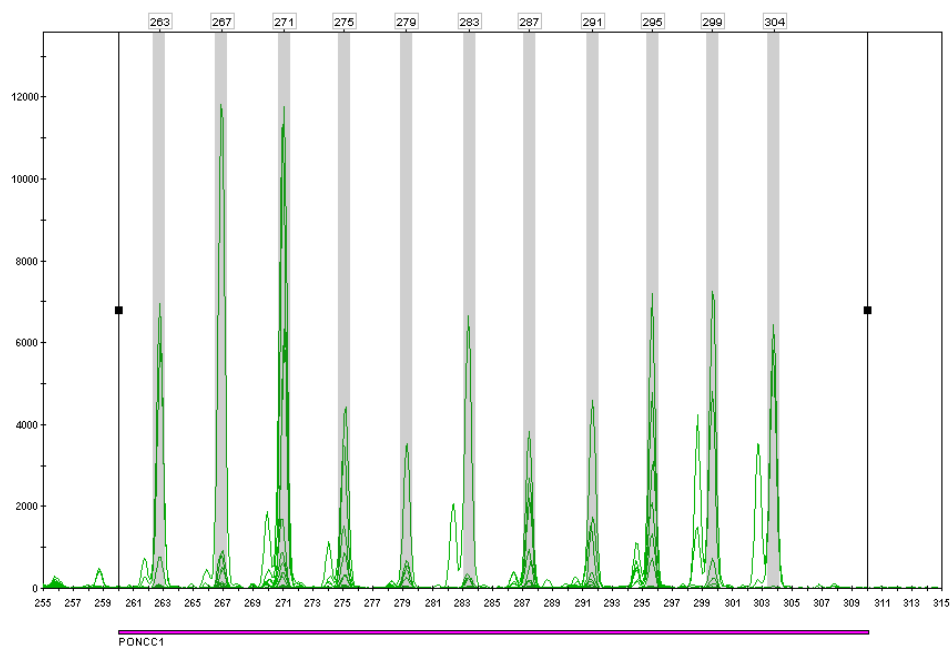
ภาพผนวกที่ ค-30 แสดงลักษณะกราฟจำนวนแอลลีลของตัวอย่างทั้งหมดและขนาดของแอลลีลของ
เครื่องหมาย PONCB3 ที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างเลือดดาวในห้องปฏิบัติการ
จำนวน 25 ตัวอย่าง (50 แอลลีล)



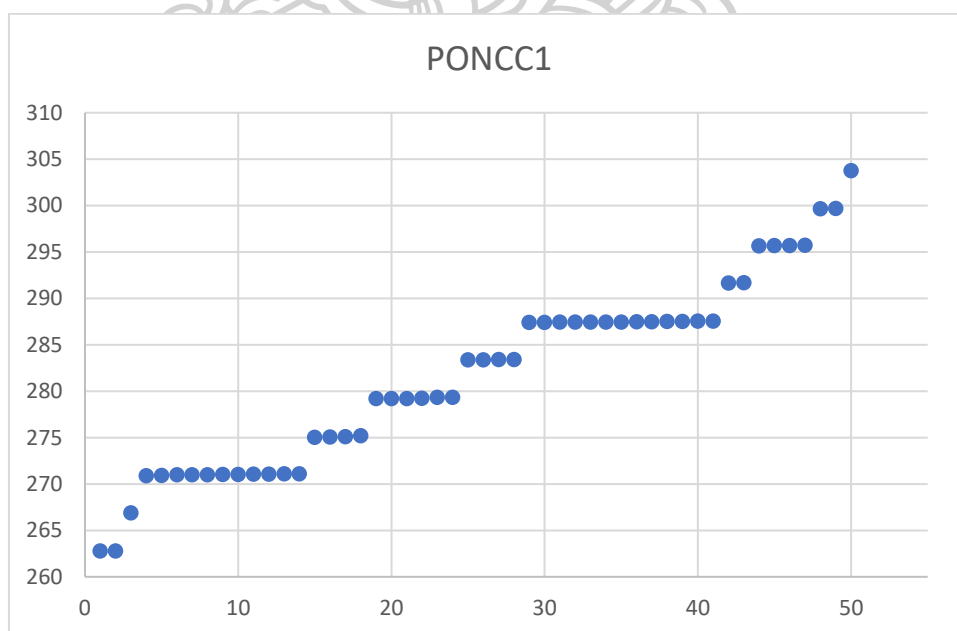
ภาพผนวกที่ ค-31 แสดงลักษณะการซ้อนทับของพีคและระยะห่างระหว่างขนาดแอลลีลของ
เครื่องหมาย PONCB4 ที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างเลือดดาวในห้องปฏิบัติการ
จำนวน 26 ตัวอย่าง



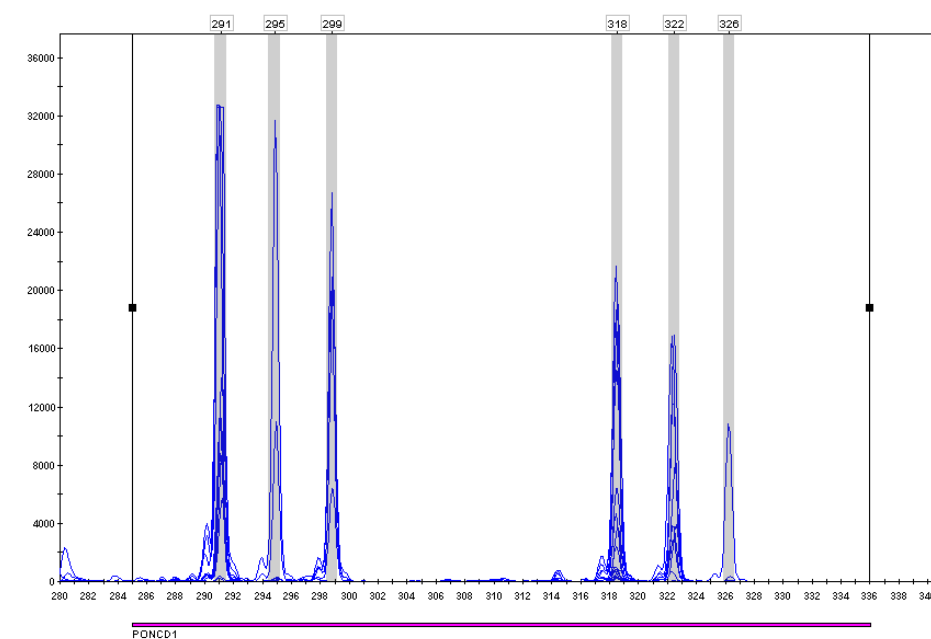
ภาพผนวกที่ ค-32 แสดงลักษณะกราฟจำนวนแอลลีลของตัวอย่างทั้งหมดและขนาดของแอลลีลของ
เครื่องหมาย PONCB4 ที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างเลือดดาวในห้องปฏิบัติการ
จำนวน 26 ตัวอย่าง (52 แอลลีล)



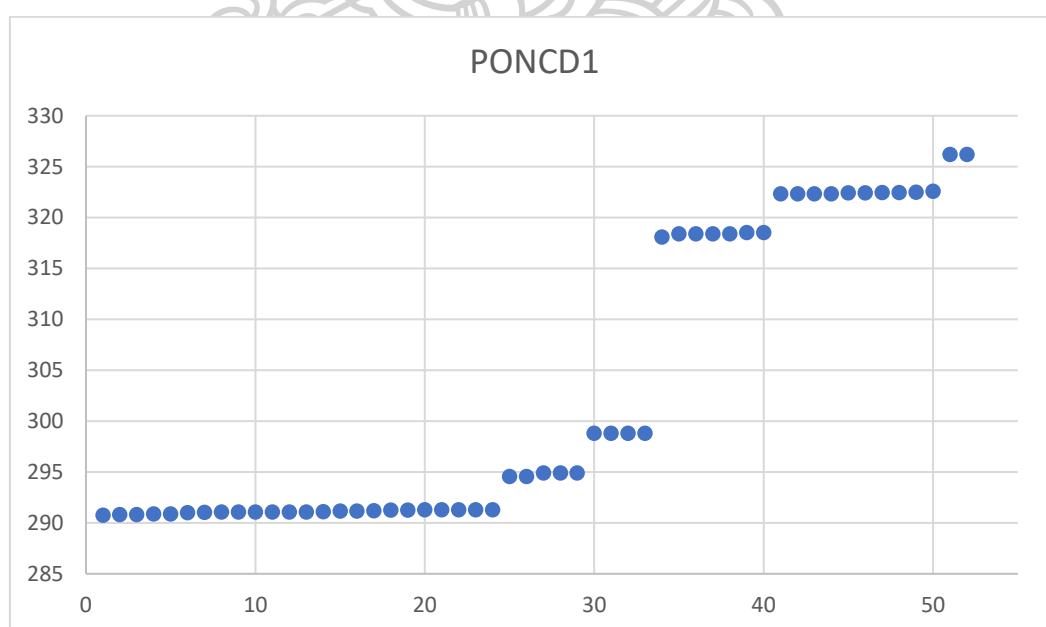
ภาพผนวกที่ ค-33 แสดงลักษณะการซ้อนทับของพีคและระยะห่างระหว่างขนาดแอลลีลของ
เครื่องหมาย PONCC1 ที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างเลือดดาวในห้องปฏิบัติการ
จำนวน 25 ตัวอย่าง



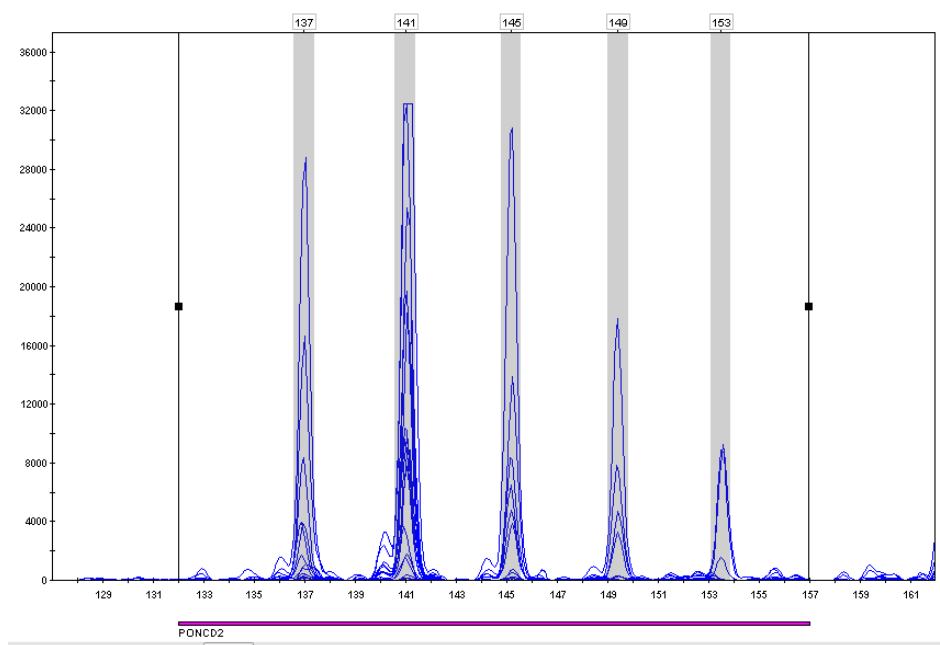
ภาพผนวกที่ ค-34 แสดงลักษณะกราฟจำนวนแอลลีลของตัวอย่างทั้งหมดและขนาดของแอลลีลของ
เครื่องหมาย PONCC1 ที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างเลือดดาวในห้องปฏิบัติการ
จำนวน 25 ตัวอย่าง (50 แอลลีล)



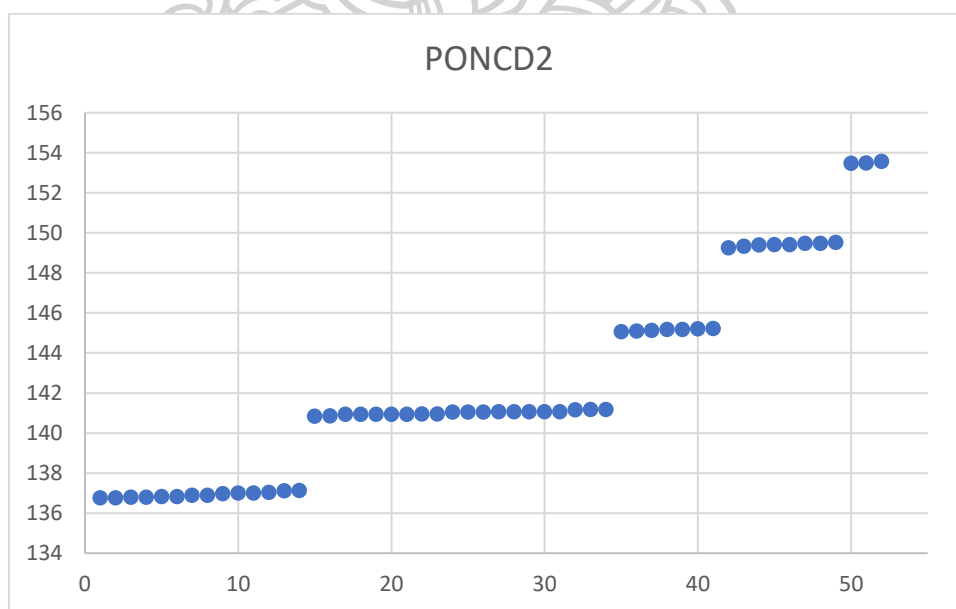
ภาพผนวกที่ ค-35 แสดงลักษณะการซ้อนทับของพีคและระยะห่างระหว่างขนาดแอลลีลของ
เครื่องหมาย PONCD1 ที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างเลือดดาวในห้องปฏิบัติการ
จำนวน 26 ตัวอย่าง



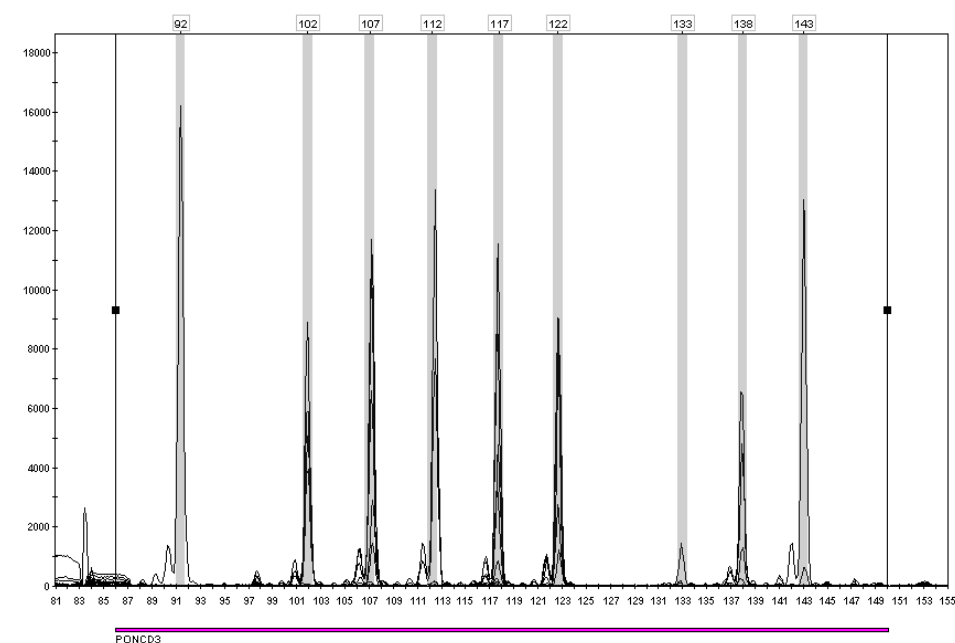
ภาพผนวกที่ ค-36 แสดงลักษณะกราฟจำนวนแอลลีลของตัวอย่างทั้งหมดและขนาดของแอลลีลของ
เครื่องหมาย PONCD1 ที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างเลือดดาวในห้องปฏิบัติการ
จำนวน 26 ตัวอย่าง (52 แอลลีล)



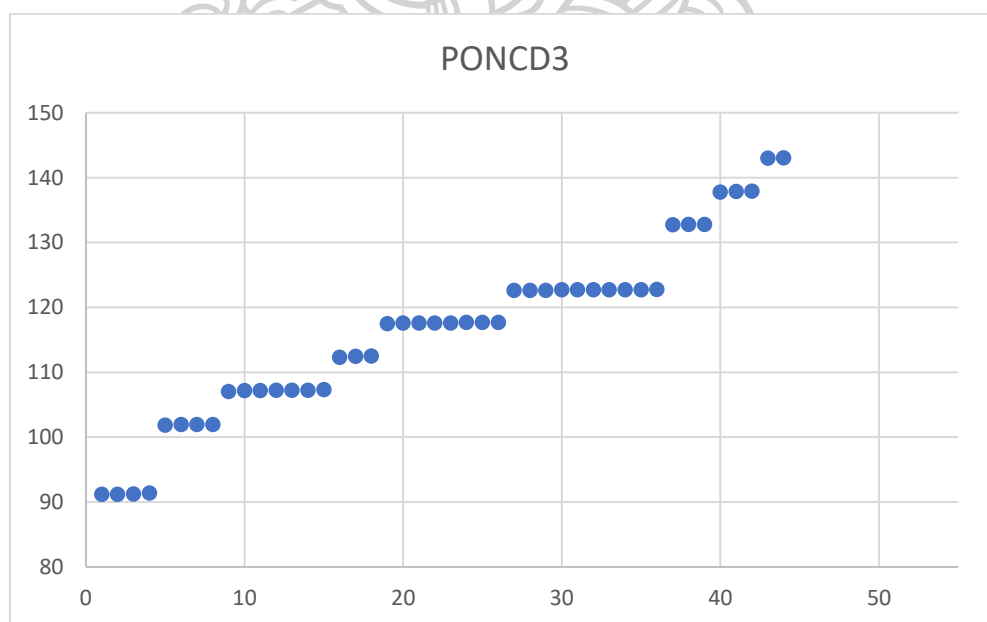
ภาพผนวกที่ ค-37 แสดงลักษณะการซ้อนทับของพีคและระยะห่างระหว่างขนาดแอลลีลของ
เครื่องหมาย PONCD2 ที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างเลือดดาวในห้องปฏิบัติการ
จำนวน 26 ตัวอย่าง



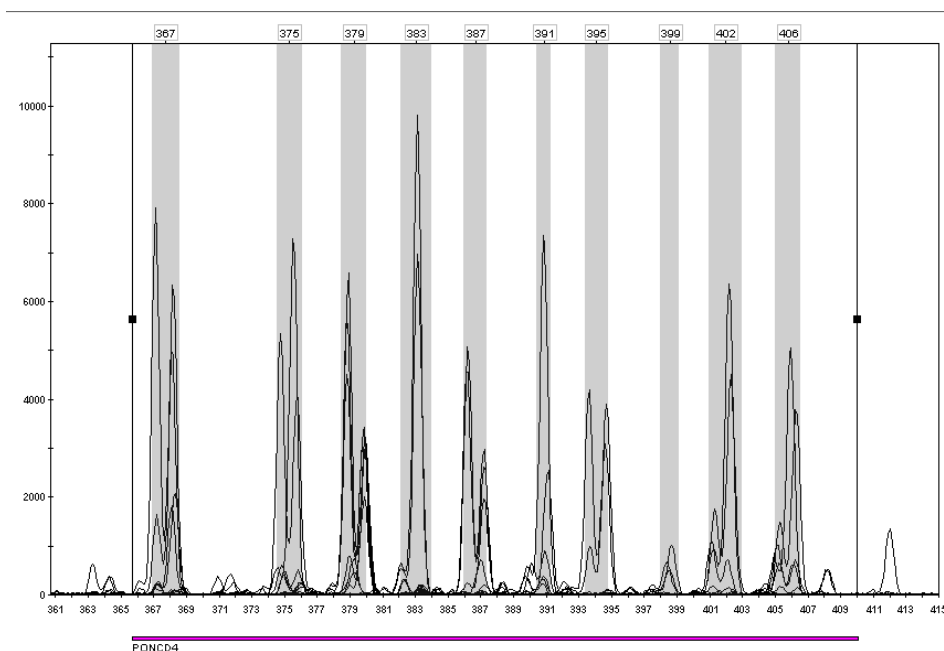
ภาพผนวกที่ ค-38 แสดงลักษณะกราฟจำนวนแอลลีลของตัวอย่างทั้งหมดและขนาดของแอลลีลของ
เครื่องหมาย PONCD2 ที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างเลือดดาวในห้องปฏิบัติการ
จำนวน 26 ตัวอย่าง (52 แอลลีล)



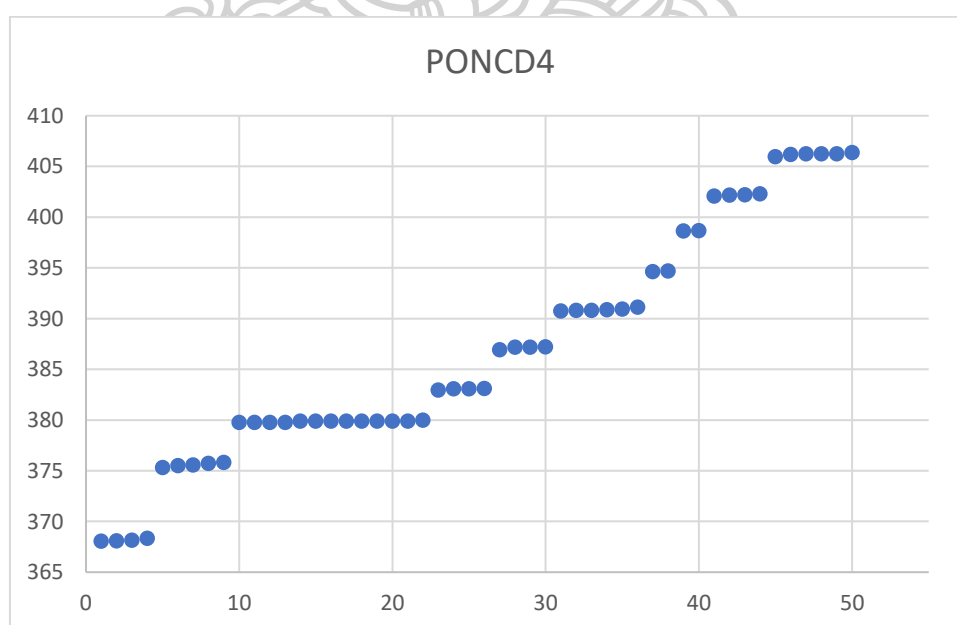
ภาพผนวกที่ ค-39 แสดงลักษณะการซ้อนทับของพีคและระยะห่างระหว่างขนาดแอลลีลของ
เครื่องหมาย PONCD3 ที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างเลือดดาวในห้องปฏิบัติการ
จำนวน 22 ตัวอย่าง



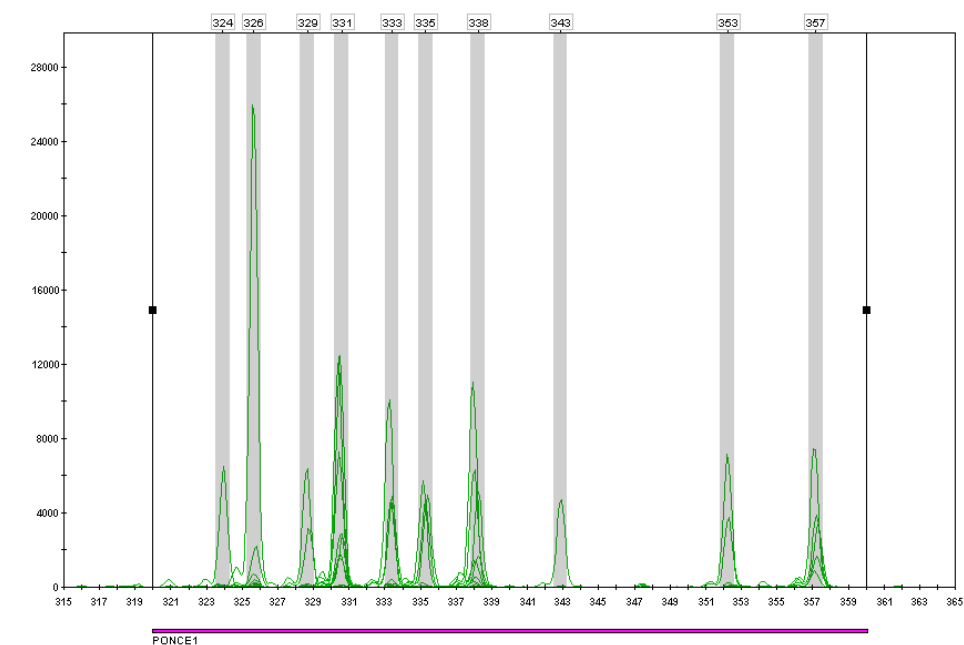
ภาพผนวกที่ ค-40 แสดงลักษณะกราฟจำนวนแอลลีลของตัวอย่างทั้งหมดและขนาดของแอลลีลของ
เครื่องหมาย PONCD3 ที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างเลือดดาวในห้องปฏิบัติการ
จำนวน 22 ตัวอย่าง (44 แอลลีล)



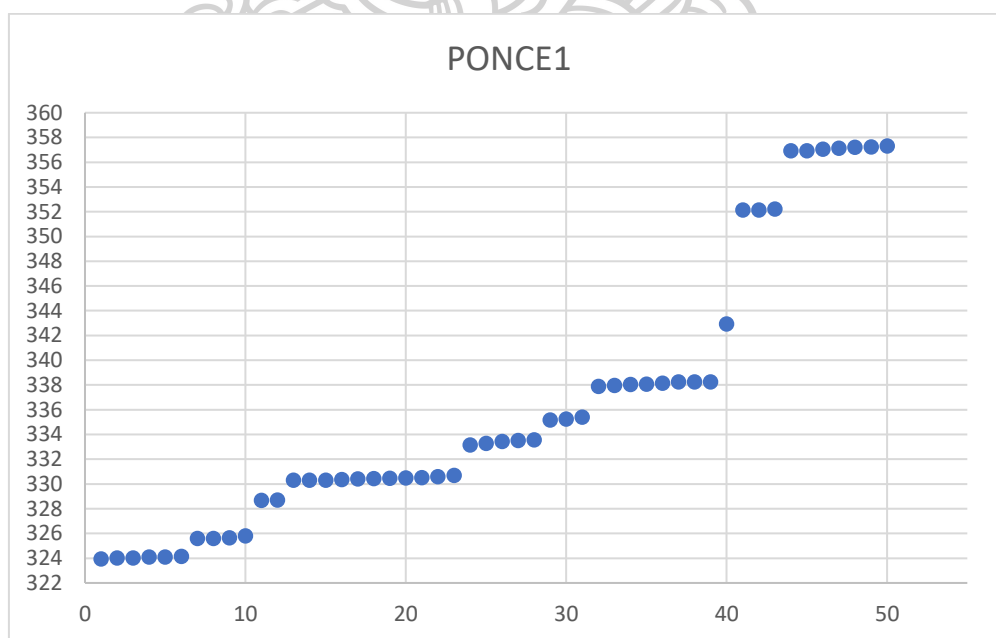
ภาพผนวกที่ ค-41 แสดงลักษณะการซ้อนทับของพีคและระยะห่างระหว่างขนาดแอลลีลของ
เครื่องหมาย PONCD4 ที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างเลือดดาวในห้องปฏิบัติการ
จำนวน 25 ตัวอย่าง



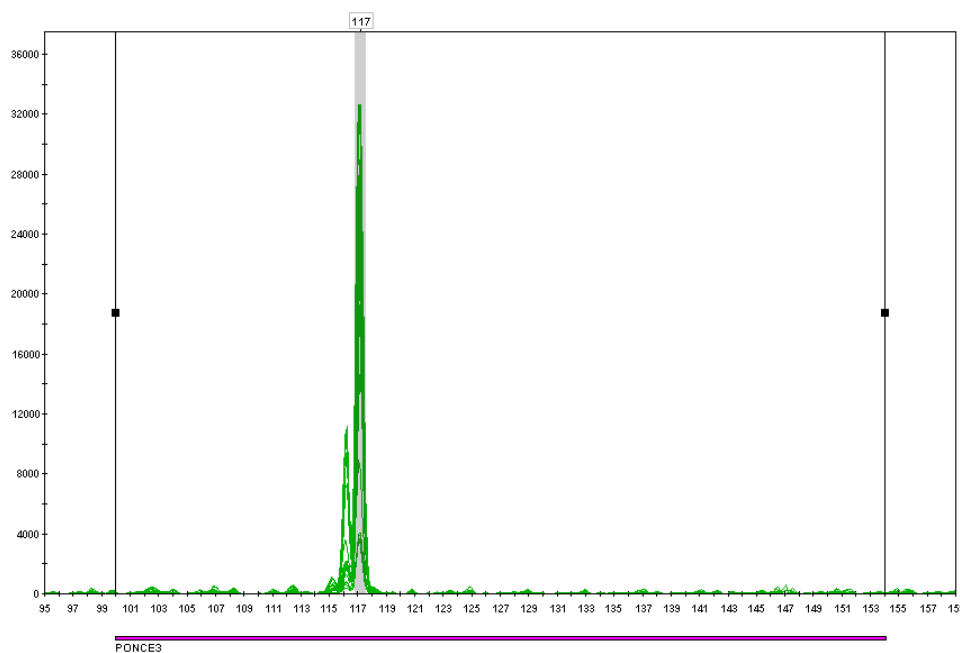
ภาพผนวกที่ ค-42 แสดงลักษณะกราฟจำนวนแอลลีลของตัวอย่างทั้งหมดและขนาดของแอลลีลของ
เครื่องหมาย PONCD4 ที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างเลือดดาวในห้องปฏิบัติการ
จำนวน 25 ตัวอย่าง (50 แอลลีล)



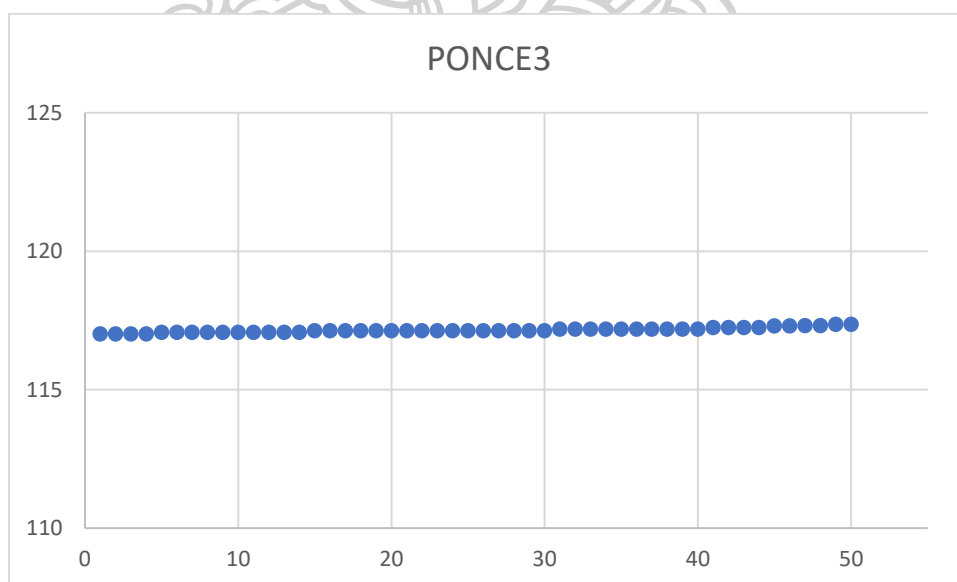
ภาพผนวกที่ ค-43 แสดงลักษณะการซ้อนทับของพีคและระยะห่างระหว่างขนาดแอลลีลของ
เครื่องหมาย Ponce1 ที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างเลือดดาวในห้องปฏิบัติการ
จำนวน 25 ตัวอย่าง



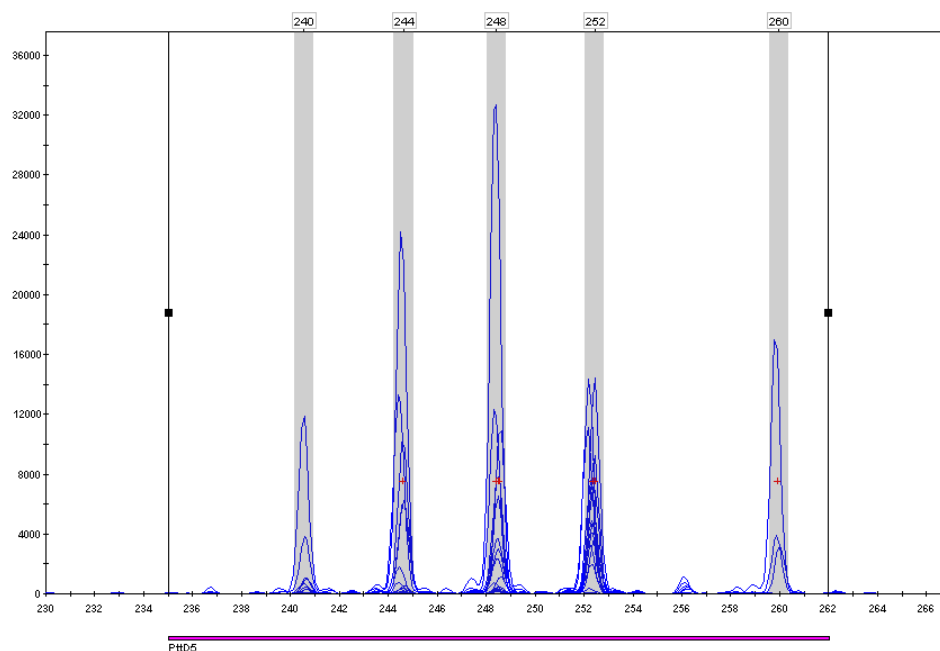
ภาพผนวกที่ ค-44 แสดงลักษณะกราฟจำนวนแอลลีลของตัวอย่างทั้งหมดและขนาดของแอลลีลของ
เครื่องหมาย Ponce1 ที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างเลือดดาวในห้องปฏิบัติการ
จำนวน 25 ตัวอย่าง (50 แอลลีล)



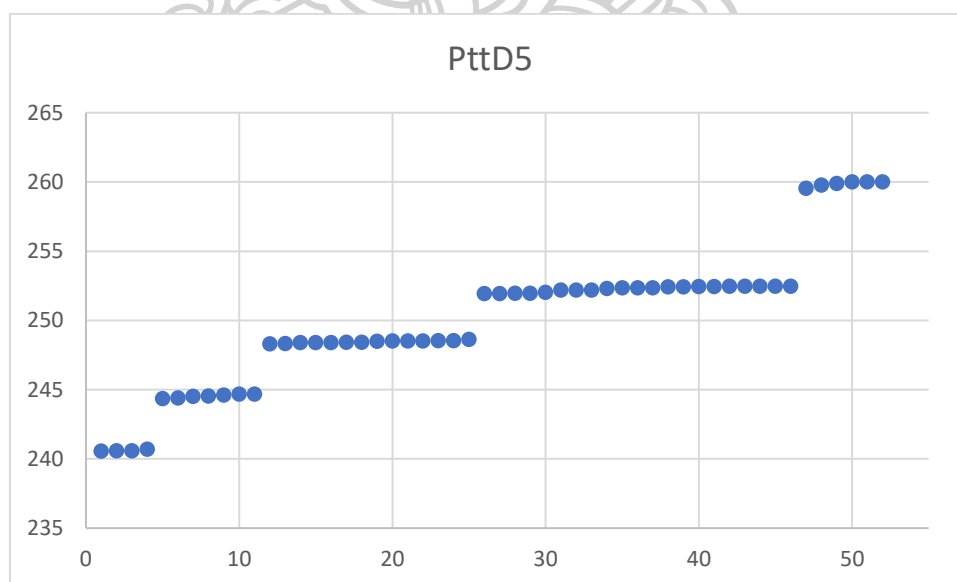
ภาพผนวกที่ ค-45 แสดงลักษณะการซ้อนทับของพีคและระยะห่างระหว่างขนาดแอลลีลของ
เครื่องหมาย Ponce3 ที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างเลือดดาวในห้องปฏิบัติการ
จำนวน 25 ตัวอย่าง



ภาพผนวกที่ ค-46 แสดงลักษณะกราฟจำนวนแอลลีลของตัวอย่างทั้งหมดและขนาดของแอลลีลของ
เครื่องหมาย Ponce3 ที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างเลือดดาวในห้องปฏิบัติการ
จำนวน 25 ตัวอย่าง (50 แอลลีล)



ภาพผนวกที่ ค-47 แสดงลักษณะการซ้อนทับของพีคและระยะห่างระหว่างขนาดแอลลีลของ
เครื่องหมาย PttD5 ที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างเลือดดาวในห้องปฏิบัติการ
จำนวน 26 ตัวอย่าง



ภาพผนวกที่ ค-48 แสดงลักษณะกราฟจำนวนแอลลีลของตัวอย่างทั้งหมดและขนาดของแอลลีลของ
เครื่องหมาย PttD5 ที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างเลือดดาวในห้องปฏิบัติการ
จำนวน 26 ตัวอย่าง (52 แอลลีล)



ภาคผนวก ง

แสดงขนาดผลิตภัณฑ์และชุดเข้าของเครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์แต่ละเครื่องหมายที่ตรวจสอบ
ด้วยกระบวนการทางชีวสารสนเทศจากข้อมูลจีโนมเลือดดาว

>ref|NW_026526654.1|:50854030-50854247 *Panthera pardus* isolate Hobbes unplaced
genomic scaffold, ASM2436296v1 HiC_scaffold_1, whole genome shotgun sequence

CTTCTTTGTTTTAGTTTTTCCTTTCCCTCTTCTCTCTTTCTGTTC[REDACTED]TTCTTTCTTTCTCTT
TCTTTCTTTCTTTCTTCTTCTTCTTTTTATTCTCTTTCCCTTCTCTCTTTCTTTCTTT
CTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTA AAAAGCACCTCAT AATTATCACT
CAATTTGATTAGTCCACGT

>ref|NW_026526688.1|:21862583-21862737 *Panthera pardus* isolate Hobbes unplaced
genomic scaffold, ASM2436296v1 HiC_scaffold_13, whole genome shotgun sequence
TAAATCTGGTCCTCACGTTTTCCTTTGTGTAAAGGATTGTATTAACTTGAAGACTTTCTTTCTTT
CTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTACTAAAAGAAGAAATCTAAAGTGATGGATACA
TTTTCAGGTAGAAATTTATAACT

>ref|NW_026526766.1|:14145871-14146142 *Panthera pardus* isolate Hobbes unplaced genomic scaffold, ASM2436296v1 HiC_scaffold_20, whole genome shotgun sequence
AATGACCCCAAATATCCAAATAAGTCCATCTGGGTCAGATGAATGGAATTCAAATGTCCTCAAGT
CTGTGTGAACTCGTCAAGTCTGTCTGTCTGTCTTTCTCCCCCATTCCCTTCCCTTTTCTTCTTT
CCTTCCTTCCTTCCTTCCTTCCTTCCTTCCTTCCTTCCTTCCTTCCTTTTGCCTGGCTTT
GTGGAATTTCACTCTGTGCACACAGAATAGGGTAATATTCAGTCAAGAGGCCAAGAGGACCTT
TGGAACATTTTC

[illegible]

>ref|NW_026526677.1|:28131002-28131182 *Panthera pardus* isolate Hobbes unplaced
genomic scaffold, ASM2436296v1 HiC_scaffold_12, whole genome shotgun sequence
CCCAAAGACCTGTTTCTCTTCCAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAGAAAG
GAAAGAGAGAAAGAAAGAGAGAAAGAAAGAAAGAGAGAAAGAAAGGAAGAAAGAAAGAGAGA
AAGAAAGAAAGGAAGAAAGAATAATCTCATCTTAATCTGGAAGCTCACAAATCT

[illegible]

>ref|NW_026526810.1|:56323557-56323711 *Panthera pardus* isolate Hobbes unplaced
genomic scaffold, ASM2436296v1 HiC_scaffold_24, whole genome shotgun sequence
GAAGTTACATCAAAAATGCCTGGAAATGGATGGATGGATGGATGGATGGATGGGATAGATA
GATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGAGAAGATAGAGAATTCAAATGGAAAT
TTGAAGGAAGAACTGGTTTGAGA

>ref|NW_026526710.1|:48966035-48966133 *Panthera pardus* isolate Hobbes unplaced
genomic scaffold, ASM2436296v1 HiC_scaffold_15, whole genome shotgun sequence
TATGGCACAAGCCTTGAAGCAAATATCATTATCTATCTATCTCTATCTATCTACCTATCTATCTA
TCTATCTATATCTACCTACCTACCGATCATCT

>ref|NW_026526765.1|:44029096-44029159 *Panthera pardus* isolate Hobbes unplaced
genomic scaffold, ASM2436296v1 HiC_scaffold_2, whole genome shotgun sequence
CCTCTATGGCAGGACTTTGATTCTATCTATCTATCTAACAATTTATTGTCAAAATGGTTTC

>ref|NW_026527013.1:29289275-29289492 *Panthera pardus* isolate Hobbes unplaced
genomic scaffold, ASM2436296v1 HiC_scaffold_8, whole genome shotgun sequence
TTTCTGATTCGGCCCTTTAACCATATTATACTGCTATCTTATAGGTTGTTCCCTTCTTTGCTGTTTT
TTTTTTTTTTTTAATGTTTATTTATTTATTTTGGAGAGAGAGAGAGAGAGAGACAGATAGACAGACA
GACAGACAGAATTCTTAGCAGGCTCCTTGCTGTCAGCGCAGAGCCCAGTGTGGGGCTCAAACCTC
AGGAACCATCTCAGGAACCTGT

>ref|NW_026527013.1|:39058415-39058569 *Panthera pardus* isolate Hobbes unplaced
genomic scaffold, ASM2436296v1 HiC_scaffold_8, whole genome shotgun sequence
GAGAAGCATTACAAGAAGCAAAGATGAAAAACAACAACCCGATAATAATTATAATAAAGCTCCAAT
GATGATAAAAAACAACAAACAAACAAACAAAAACCTGGCAGCAACCTGGGTTTCAAGTT
CCTTCTGTGACGACTGTGATAGCAG

>ref|NW_026526654.1|:27775626-27775806 *Panthera pardus* isolate Hobbes unplaced
genomic scaffold, ASM2436296v1 HiC_scaffold_1, whole genome shotgun sequence
ATATTCCCAGTGCCTCCTGTTGGACCAATCAATAAATATTTGATTAGTGAAGAATGTCTAGACAA
AGTTAAGATGGAAATATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATGAATAGATGGATGGATCAATGG
ATCAATGAGGGGATAATAGATGGAAGGAGGGGATGTAAAAAAGAAGTGG

>ref|NW_026526688.1|:5408784-5409055 *Panthera pardus* isolate Hobbes unplaced genomic scaffold, ASM2436296v1 HiC_scaffold_13, whole genome shotgun sequence

TTAACAAATGCAACATACAGGCAGCCAACGAAACCCTGCAGGACAGTGTGTACAAACTCAAAGG
ATTTTAAAAAATCACAAAAAGGAACTACTGCTGATTTAATTCAGCATTTGAGTTAAATATTAGA
AAGATATGCGCCTCTGAAAAATACTGTGTTTTAAGTAACTGAAATAGAAAGGAAAAATAGTAAAAG
GATAGATAGATAGATAGATATCAATTAAATGGGCAGTACTTTTAAAGGCGAAGGAAGGTGAAAATG
AATCCAGTAA

[illegible]

[illegible][illegible][illegible]

เครื่องหมาย PONCD1: (AAGG)₁₁ ขนาด 318 bp

>ref|NW_026526677.1|:106670698-106671016 *Panthera pardus* isolate Hobbes
unplaced genomic scaffold, ASM2436296v1 HiC_scaffold_12, whole genome shotgun
sequence

ACCAGGTAGGGGCTTGTTAAAGATAGAAGGAAAGAAAAGGAAGGAAGGAAGGAAGGAAGGA
GGAAGGAAGGAAGGAAGGAAAAAGGAAAGATAACCAATCACAAACGAATTAGAACAAGACAGCT
TCCCCAACACATACGAGTAGCACAACAATAAAATGGAAGCGAGAGCCCTATAATTAGGGCTGCA
GTTACAGGAAGCAGAGCGGGTTTTGCTGCTGAGTCACTGTGCCGCTGGAGAGTTGGGTGGTTAG
GTTGGGAAAGTCACCTTGATGTAGGGTCTAGGCTGGCTTCAGAGTCTAGGATGGGGGACAGGT

เครื่องหมาย PONCD2: (AGAA)₁₁ ขนาด 108 bp

>ref|NW_026526788.1|:36625788-36625896 *Panthera pardus* isolate Hobbes unplaced
genomic scaffold, ASM2436296v1 HiC scaffold 22, whole genome shotgun sequence

AGAATGAGATACAGGTTAAAAAGACAAGGTAAAAGAAAAAAGAAAGAAAAAAGAAAGAAAGAA
AGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAGGAAATCCACATT

เครื่องหมาย PONCD3: (CTTTT)₆TT(CTTTT)₂ ขนาด 90 bp

>ref|NW_026526710.1|:8198229-8198319 *Panthera pardus* isolate Hobbes unplaced
genomic scaffold, ASM2436296v1 HiC scaffold 15, whole genome shotgun sequence

CTTAACCATGGCTGGATGGCTTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTTCTTTCTTTTTTTA
ATTGTCCTCCAAAGCTGGAGTTGC

เครื่องหมาย PONCD4: (TTTC)₄T(TCCT)₁₃ ขนาด 356 bp

>ref|NW_026526766.1|:62754523-62754879 *Panthera pardus* isolate Hobbes unplaced genomic scaffold, ASM2436296v1 HiC scaffold 20, whole genome shotgun sequence

CACAGCATGTGTTTCATTTCAATGACTATATCTTGAAGGGTGTTATGCAAAGGCCACTAATCAG
GGAAAAGGCTCTCTTCAATTGGCAACTTCTCAGGGCCACATGCAAAGGAAAATTTGCATGTTTCA
TTAAGAATGAACCAACCTATTGGTTTGTGTACAACCTAGATCATTTACATTTTCTTTCTTTCTTTC

เครื่องหมาย PONCE1: (GA)₄...(GT)₃ ขนาด 334 bp

เครื่องหมาย PONCE3: (AAAT)₄A(GATA)₅GA(TAAA)₄ ขนาด 135 bp

เครื่องหมาย PttD5: (GAAA)₁₂...(AAGA)₃ ขนาด 243 bp

[illegible]



ภาคผนวก จ
แสดงตารางวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ตารางผนวกที่ จ-1 แสดงการทดสอบความไม่สมดุลของลิงเกจ (Linkage Disequilibrium; LD)

Locus#1	Locus#2	P-Value	S.E.	Switches	n	Bonferroni correction	
PONCC1	PONCB4	0.98675	0.007948	4992	1	0.05	NS
F85	FCA272	0.98313	0.006062	29000	2	0.025	NS
MsFCA453	PONCD2	0.97426	0.010051	20876	3	0.008333	NS
MsFCA453	PttD5	0.97396	0.008482	24960	4	0.002083	NS
PONCD3	Pan4A2	0.97258	0.008486	22621	5	0.000417	NS
F85	PONCD2	0.96756	0.011639	15660	6	6.94E-05	NS
Pan7A1	PONCD4	0.95838	0.014857	6578	7	9.92E-06	NS
msFCA391	PONCD3	0.95646	0.015321	4405	8	1.24E-06	NS
msFCA441	PONCD1	0.95344	0.018449	18282	9	1.38E-07	NS
msFCA391	F85	0.94917	0.016628	9681	10	1.38E-08	NS
FCA742a	F85	0.94446	0.019708	14909	11	1.25E-09	NS
FCA742a	PttD5	0.90917	0.02108	16040	12	1.04E-10	NS
PONCD3	PttD5	0.89432	0.023349	9271	13	8.03E-12	NS
F85	Pan4A2	0.88913	0.019482	31731	14	5.74E-13	NS
msFCA391	PONCD1	0.8881	0.024854	9632	15	3.82E-14	NS
msFCA391	PONCD2	0.88691	0.024619	8846	16	2.39E-15	NS
FCA272	Pan4A2	0.86689	0.014992	48903	17	1.41E-16	NS
PONCD2	PONCD4	0.86598	0.028463	9855	18	7.81E-18	NS
PONCD3	FCA272	0.85872	0.028184	16727	19	4.11E-19	NS
PONCC1	PttD5	0.85613	0.030013	9368	20	2.06E-20	NS
F42	PttD5	0.85528	0.026995	10594	21	9.79E-22	NS
PONCC1	PONCD3	0.83555	0.035246	2811	22	4.45E-23	NS
Pan7A1	Pan4A2	0.82445	0.023684	21922	23	1.93E-24	NS
msFCA441	F42	0.81622	0.034831	9827	24	8.06E-26	NS
PONCC1	msFCA441	0.80414	0.035791	8204	25	3.22E-27	NS
msFCA391	PONCB4	0.79845	0.034273	6000	26	1.24E-28	NS

ตารางผนวกที่ จ-1 แสดงการทดสอบความไม่สมดุลของลิงเกจ (Linkage Disequilibrium; LD) (ต่อ)

Locus#1	Locus#2	P-Value	S.E.	Switches	n	Bonferroni correction	
msFCA441	PONCD2	0.79627	0.03039	16436	27	4.59E-30	NS
msFCA441	Pan7A1	0.79469	0.033684	10595	28	1.64E-31	NS
FCA272	PONCE1	0.78545	0.03402	16396	29	5.65E-33	NS
FCA742a	PONCB4	0.78389	0.037544	8906	30	1.88E-34	NS
F85	PONCD1	0.77759	0.031535	17482	31	6.08E-36	NS
msFCA391	FCA742a	0.77696	0.036921	7745	32	1.9E-37	NS
MsFCA453	PONCD1	0.75437	0.03062	23720	33	5.76E-39	NS
MsFCA453	PONCD4	0.7475	0.03464	16987	34	1.69E-40	NS
msFCA391	FCA272	0.73719	0.031967	17504	35	4.84E-42	NS
PONCD1	PttD5	0.73277	0.033399	19172	36	1.34E-43	NS
msFCA441	PONCD4	0.71928	0.038541	10756	37	3.63E-45	NS
FCA742a	msFCA441	0.70081	0.040103	15004	38	9.56E-47	NS
PttD5	PONCE1	0.6847	0.040225	9249	39	2.45E-48	NS
PONCD2	Pan4A2	0.68384	0.025203	31053	40	6.13E-50	NS
PONCB4	FCA272	0.68331	0.03546	18954	41	1.49E-51	NS
msFCA391	F42	0.66751	0.040316	5201	42	3.56E-53	NS
MsFCA453	F42	0.64815	0.037344	13878	43	8.28E-55	NS
PONCB4	F42	0.64742	0.044092	5894	44	1.88E-56	NS
F42	FCA272	0.64476	0.039448	17541	45	4.18E-58	NS
PONCC1	Pan4A2	0.63971	0.03688	21636	46	9.09E-60	NS
PONCC1	FCA272	0.62679	0.039666	16305	47	1.93E-61	NS
Pan4A2	PONCD4	0.62544	0.037232	26558	48	4.03E-63	NS
MsFCA453	msFCA441	0.62484	0.037177	23989	49	8.22E-65	NS
PONCC1	FCA742a	0.60379	0.04433	6051	50	1.64E-66	NS
PONCE1	Pan4A2	0.58762	0.037234	21666	51	3.22E-68	NS
msFCA391	msFCA441	0.58627	0.042341	9920	52	6.2E-70	NS

ตารางผนวกที่ จ-1 แสดงการทดสอบความไม่สมดุลของลิงเกจ (Linkage Disequilibrium; LD) (ต่อ)

Locus#1	Locus#2	P-Value	S.E.	Switches	n	Bonferroni correction	
PONCC1	PONCE1	0.58521	0.047653	2617	53	1.17E-71	NS
FCA742a	F42	0.58491	0.041987	7712	54	2.17E-73	NS
FCA742a	Pan4A2	0.58341	0.030244	31220	55	3.94E-75	NS
MsFCA453	PONCD3	0.57684	0.043489	13332	56	7.03E-77	NS
FCA742a	PONCE1	0.57643	0.044129	5823	57	1.23E-78	NS
FCA272	PttD5	0.55426	0.036951	32135	58	2.13E-80	NS
PttD5	Pan7A1	0.5534	0.040567	11153	59	3.61E-82	NS
PONCD3	msFCA441	0.55154	0.044047	8323	60	6.01E-84	NS
PttD5	PONCD4	0.54893	0.043675	12107	61	9.85E-86	NS
msFCA391	Pan4A2	0.54446	0.032441	21732	62	1.59E-87	NS
F85	Pan7A1	0.53955	0.042033	9927	63	2.52E-89	NS
MsFCA453	msFCA391	0.51546	0.042111	13862	64	3.94E-91	NS
MsFCA453	FCA742a	0.51329	0.039105	20721	65	6.06E-93	NS
MsFCA453	PONCE1	0.51232	0.041755	13123	66	9.19E-95	NS
FCA272	Pan7A1	0.50399	0.036991	17707	67	1.37E-96	NS
MsFCA453	F85	0.50139	0.037923	21855	68	2.02E-98	NS
PONCB4	PONCD1	0.4909	0.041233	10879	69	2.9E-100	NS
PONCB4	PONCE1	0.48466	0.045393	4946	70	4.2E-102	NS
FCA742a	PONCD1	0.48151	0.043445	14487	71	5.9E-104	NS
PONCD3	F85	0.47454	0.043129	8539	72	8.2E-106	NS
PONCC1	msFCA391	0.46131	0.045559	4138	73	1.1E-107	NS
PONCD1	Pan7A1	0.45001	0.041323	10597	74	1.5E-109	NS
PONCD3	PONCD4	0.43967	0.048475	3589	75	2E-111	NS
PONCB4	PONCD4	0.43705	0.045908	6466	76	2.7E-113	NS
PONCC1	F85	0.43563	0.042328	8418	77	3.4E-115	NS
PONCC1	Pan7A1	0.43475	0.045678	5095	78	4.4E-117	NS

ตารางผนวกที่ จ-1 แสดงการทดสอบความไม่สมดุลของลิงเกจ (Linkage Disequilibrium; LD) (ต่อ)

Locus#1	Locus#2	P-Value	S.E.	Switches	n	Bonferroni correction	
PONCB4	Pan4A2	0.43053	0.032222	22663	79	5.6E-119	NS
msFCA441	PONCE1	0.42612	0.046094	8121	80	7E-121	NS
PONCD2	PONCE1	0.42502	0.045239	7562	81	8.6E-123	NS
PONCD1	Pan4A2	0.42341	0.030085	35202	82	1.1E-124	NS
F85	msFCA441	0.41652	0.041436	17895	83	1.3E-126	NS
MsFCA453	Pan4A2	0.41608	0.0274	38275	84	1.5E-128	NS
F42	PONCD4	0.40305	0.04408	5333	85	1.8E-130	NS
msFCA391	PONCE1	0.39982	0.043872	4173	86	2.1E-132	NS
FCA742a	FCA272	0.38524	0.037734	26891	87	2.4E-134	NS
PONCD1	PONCD2	0.36364	0.037674	16123	88	2.7E-136	NS
FCA742a	Pan7A1	0.35958	0.039257	8447	89	3E-138	NS
PONCD3	PONCE1	0.35783	0.046345	2634	90	3.4E-140	NS
PONCC1	PONCD2	0.35282	0.040489	7883	91	3.7E-142	NS
MsFCA453	FCA272	0.34988	0.032698	35937	92	4E-144	NS
PONCD3	F42	0.33981	0.044346	4014	93	4.3E-146	NS
F85	PONCE1	0.33158	0.041686	8386	94	4.6E-148	NS
F85	PONCD4	0.32814	0.041973	10814	95	4.8E-150	NS
FCA742a	PONCD2	0.32673	0.038691	13528	96	5E-152	NS
PttD5	Pan4A2	0.32581	0.028016	36056	97	5.2E-154	NS
PONCE1	Pan7A1	0.32253	0.043644	4997	98	5.3E-156	NS
msFCA441	PONCB4	0.32107	0.041734	10841	99	5.4E-158	NS
PONCB4	Pan7A1	0.31206	0.041705	6575	100	5.4E-160	NS
PONCD3	PONCD2	0.30551	0.038766	7608	101	5.3E-162	NS
msFCA391	PttD5	0.30117	0.035921	10710	102	5.2E-164	NS
MsFCA453	Pan7A1	0.29566	0.034281	14259	103	5E-166	NS
FCA272	PONCD4	0.29401	0.036283	21157	104	4.9E-168	NS

ตารางผนวกที่ จ-1 แสดงการทดสอบความไม่สมดุลของลิงเกจ (Linkage Disequilibrium; LD) (ต่อ)

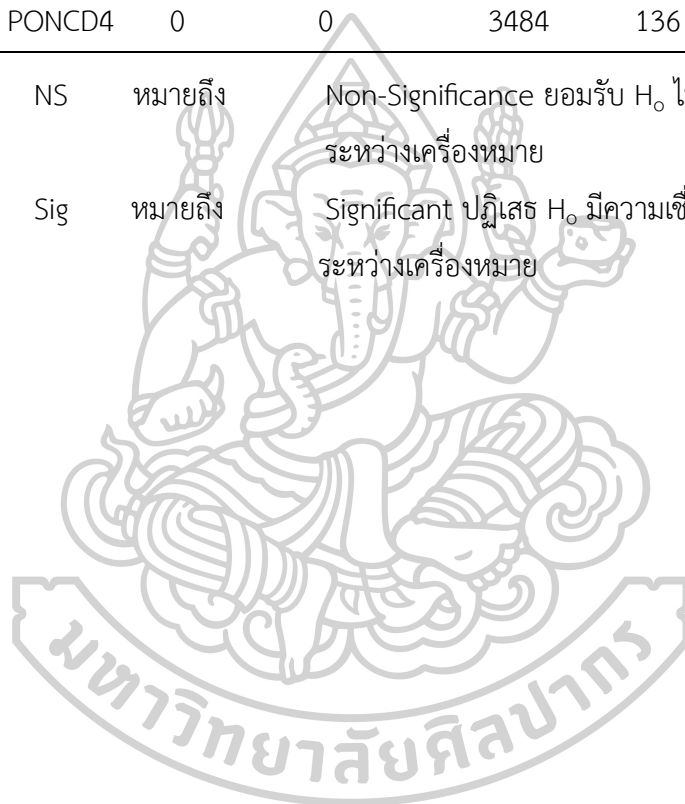
Locus#1	Locus#2	P-Value	S.E.	Switches	n	Bonferroni correction	
PONCC1	PONCD1	0.28578	0.035752	8204	105	4.6E-170	NS
msFCA441	Pan4A2	0.28459	0.028533	34841	106	4.4E-172	NS
PONCD1	PONCD4	0.26613	0.0376	10462	107	4.1E-174	NS
msFCA391	Pan7A1	0.26188	0.034147	5981	108	3.8E-176	NS
PONCD1	PONCE1	0.23727	0.036722	7992	109	3.5E-178	NS
MsFCA453	PONCB4	0.21217	0.028808	14654	110	3.1E-180	NS
F42	Pan4A2	0.18984	0.027121	21685	111	2.8E-182	NS
msFCA441	FCA272	0.18185	0.027885	31695	112	2.5E-184	NS
PONCD2	Pan7A1	0.17884	0.031557	9487	113	2.2E-186	NS
PONCD1	FCA272	0.17025	0.028248	31640	114	2E-188	NS
FCA272	PONCD2	0.16245	0.02406	27708	115	1.7E-190	NS
PONCB4	PttD5	0.15951	0.031573	11466	116	1.5E-192	NS
PONCD1	F42	0.15753	0.029845	9655	117	1.3E-194	NS
F42	PONCE1	0.08513	0.022791	4000	118	1.1E-196	NS
MsFCA453	PONCC1	0.0819	0.021261	13023	119	9E-199	NS
msFCA391	PONCD4	0.0774	0.024593	5498	120	7.5E-201	NS
F85	PONCB4	0.06512	0.01699	10667	121	6.2E-203	NS
F85	PttD5	0.06054	0.017208	18410	122	5.1E-205	NS
PONCD3	PONCB4	0.05663	0.017703	5035	123	4.1E-207	NS
FCA742a	PONCD4	0.05555	0.015469	7952	124	3.3E-209	NS
msFCA441	PttD5	0.03708	0.013696	19772	125	2.7E-211	NS
F42	Pan7A1	0.03017	0.014112	5832	126	2.1E-213	NS
PONCD2	PttD5	0.0263	0.012782	17538	127	1.7E-215	NS
PONCB4	PONCD2	0.02038	0.00843	9695	128	1.3E-217	NS
F42	PONCD2	0.01815	0.009338	8825	129	1E-219	NS
F85	F42	0.01493	0.011002	9532	130	7.7E-222	NS

ตารางผนวกที่ จ-1 แสดงการทดสอบความไม่สมดุลของลิงเกจ (Linkage Disequilibrium; LD) (ต่อ)

Locus#1	Locus#2	P-Value	S.E.	Switches	n	Bonferroni correction
PONCC1	PONCD4	0.01359	0.009648	3647	131	5.9E-224
PONCC1	F42	0.00767	0.006709	4088	132	4.5E-226
PONCD3	FCA742a	0.00033	0.00033	6020	133	3.4E-228
PONCD3	PONCD1	0	0	8098	134	2.5E-230
PONCD3	Pan7A1	0	0	5205	135	1.9E-232
PONCE1	PONCD4	0	0	3484	136	1.4E-234

หมายเหตุ NS หมายถึง Non-Significance ยอมรับ H_0 ไม่มีความเชื่อมโยง
ระหว่างเครื่องหมาย

 Sig หมายถึง Significant ปฏิเสธ H_0 มีความเชื่อมโยง
ระหว่างเครื่องหมาย





ตารางผนวกที่ ฉ-1 แสดงความถี่ของแอลลีลของเครื่องหมาย F42 จำนวนตัวอย่างทั้งหมด 96 ตัวอย่าง

เครื่องหมาย	ชื่อแอลลีล	ความถี่แอลลีล
F42	232	0.083
	236	0.281
	238	0.135
	240	0.234
	242	0.021
	246	0.005
	248	0.016
	250	0.151
	265	0.073
รวม	9 แอลลีล	1.000

ตารางผนวกที่ ฉ-2 แสดงความถี่ของแอลลีลของเครื่องหมาย F85 จำนวนตัวอย่างทั้งหมด 96 ตัวอย่าง

เครื่องหมาย	ชื่อแอลลีล	ความถี่แอลลีล
F85	143	0.005
	147	0.141
	151	0.177
	155	0.161
	159	0.281
	163	0.167
	167	0.068
รวม	7 แอลลีล	1.000

ตารางผนวกที่ ฉ-3 แสดงความถี่ของแอลลีลของเครื่องหมาย FCA272 จำนวนตัวอย่างทั้งหมด 96 ตัวอย่าง

เครื่องหมาย	ชื่อแอลลีล	ความถี่แอลลีล
FCA272	115	0.109
	117	0.359
	119	0.307
	121	0.083
	123	0.141
รวม	5 แอลลีล	1.000

ตารางผนวกที่ ฉ-4 แสดงความถี่ของแอลลีลของเครื่องหมาย FCA742a จำนวนตัวอย่างทั้งหมด 96 ตัวอย่าง

เครื่องหมาย	ชื่อแอลลีล	ความถี่แอลลีล
FCA742a	188	0.031
	192	0.151
	196	0.151
	200	0.089
	204	0.214
	208	0.146
	212	0.089
	216	0.125
	220	0.005
รวม	9 แอลลีล	1.000

ตารางผนวกที่ ฉ-5 แสดงความถี่ของแอลลีลของเครื่องหมาย msFCA391 จำนวนตัวอย่างทั้งหมด 93 ตัวอย่าง

เครื่องหมาย	ชื่อแอลลีล	ความถี่แอลลีล
msFCA391	141	0.172
	145	0.194
	149	0.134
	153	0.446
	157	0.027
	161	0.016
	165	0.005
	169	0.005
รวม	8 แอลลีล	1.000

ตารางผนวกที่ ฉ-6 แสดงความถี่ของแอลลีลของเครื่องหมาย msFCA441 จำนวนตัวอย่างทั้งหมด 94 ตัวอย่าง

เครื่องหมาย	ชื่อแอลลีล	ความถี่แอลลีล
msFCA441	95	0.069
	103	0.197
	107	0.324
	111	0.165
	115	0.170
	119	0.048
	123	0.027
รวม	7 แอลลีล	1.000

ตารางผนวกที่ ฉ-7 แสดงความถี่ของแอลลีลของเครื่องหมาย msFCA453 จำนวนตัวอย่างทั้งหมด 95 ตัวอย่าง

เครื่องหมาย	ชื่อแอลลีล	ความถี่แอลลีล
MsFCA453	75	0.132
	79	0.300
	83	0.421
	87	0.142
	91	0.005
รวม	5 แอลลีล	1.000

ตารางผนวกที่ ฉ-8 แสดงความถี่ของแอลลีลของเครื่องหมาย Pan4A2 จำนวนตัวอย่างทั้งหมด 94 ตัวอย่าง

เครื่องหมาย	ชื่อแอลลีล	ความถี่แอลลีล
Pan4A2	143	0.335
	147	0.622
	151	0.043
รวม	3 แอลลีล	1.000

ตารางผนวกที่ ฉ-9 แสดงความถี่ของแอลลีลของเครื่องหมาย Pan7A1 จำนวนตัวอย่างทั้งหมด 96 ตัวอย่าง

เครื่องหมาย	ชื่อแอลลีล	ความถี่แอลลีล
Pan7A1	162	0.005
	166	0.417
	170	0.349
	174	0.010
	178	0.156
	182	0.057
	190	0.005
รวม	7 แอลลีล	1.000

ตารางผนวกที่ ฉ-10 แสดงความถี่ของแอลลีลของเครื่องหมาย PONCB4 จำนวนตัวอย่างทั้งหมด 95 ตัวอย่าง

เครื่องหมาย	ชื่อแอลลีล	ความถี่แอลลีล
PONCB4	222	0.032
	226	0.005
	230	0.284
	234	0.142
	238	0.237
	242	0.147
	246	0.137
	250	0.011
	254	0.005
รวม	9 แอลลีล	1.000

ตารางผนวกที่ ฉ-11 แสดงความถี่ของแอลลีลของเครื่องหมาย PONCC1 จำนวนตัวอย่างทั้งหมด 96 ตัวอย่าง

เครื่องหมาย	ชื่อแอลลีล	ความถี่แอลลีล
PONCC1	259	0.010
	263	0.068
	267	0.005
	271	0.203
	275	0.078
	279	0.146
	283	0.125
	287	0.177
	291	0.057
	295	0.047
	299	0.016
	303	0.068
รวม	12 แอลลีล	1.000

ตารางผนวกที่ ฉ-12 แสดงความถี่ของแอลลีลของเครื่องหมาย PONCD1 จำนวนตัวอย่างทั้งหมด 96 ตัวอย่าง

เครื่องหมาย	ชื่อแอลลีล	ความถี่แอลลีล
PONCD1	291	0.297
	295	0.063
	299	0.141
	319	0.109
	323	0.318
	327	0.047
	331	0.026
รวม	7 แอลลีล	1.000

ตารางผนวกที่ ฉ-13 แสดงความถี่ของแอลลีลของเครื่องหมาย PONCD2 จำนวนตัวอย่างทั้งหมด 96 ตัวอย่าง

เครื่องหมาย	ชื่อแอลลีล	ความถี่แอลลีล
PONCD2	133	0.016
	137	0.172
	141	0.484
	145	0.177
	149	0.115
	153	0.036
รวม	6 แอลลีล	1.000

ตารางผนวกที่ ฉ-14 แสดงความถี่ของแอลลีลของเครื่องหมาย PttD5 จำนวนตัวอย่างทั้งหมด 96
ตัวอย่าง

เครื่องหมาย	ชื่อแอลลีล	ความถี่แอลลีล
PttD5	241	0.089
	245	0.115
	249	0.359
	253	0.349
	257	0.052
	261	0.036
รวม	6 แอลลีล	1.000

ตารางผนวกที่ ฉ-15 แสดงความถี่ของแอลลีลของเครื่องหมาย PONCE1 จำนวนตัวอย่างทั้งหมด 96
ตัวอย่าง

เครื่องหมาย	ชื่อแอลลีล	ความถี่แอลลีล
PONCE1	316	0.010
	324	0.031
	326	0.135
	329	0.089
	331	0.104
	333	0.104
	335	0.052
	338	0.172
	340	0.005
	343	0.089
	348	0.031
	352	0.052
	357	0.125
รวม	13 แอลลีล	1.000

ภาคผนวก ข
แสดงตารางการกำหนดระยะทางและความยาวของแอลลีลที่เหมาะสม (Bin)



ตารางผนวกที่ ข-1 แสดงค่าเฉลี่ยความยาวผลิตรัณฑ์และค่าต่ำสุด-สูงสุด ที่วิเคราะห์ได้ในแต่ละแอลลีล
ของเครื่องหมาย F42

ชื่อแอลลีล	ค่าเฉลี่ย (Bin Center)	ค่าต่ำสุด (Left Cutoff)	ค่าสูงสุด (Right Cutoff)
232	232.12	-0.5	+0.5
236	235.99	-0.5	+0.5
238	237.93	-0.5	+0.5
240	239.82	-0.5	+0.5
242	241.75	-0.5	+0.5
246	245.70	-0.5	+0.5
248	247.58	-0.5	+0.5
250	249.58	-0.5	+0.5
265	264.89	-0.5	+0.5

ตารางผนวกที่ ข-2 แสดงค่าเฉลี่ยความยาวผลิตรัณฑ์และค่าต่ำสุด-สูงสุด ที่วิเคราะห์ได้ในแต่ละแอลลีล
ของเครื่องหมาย msFCA391

ชื่อแอลลีล	ค่าเฉลี่ย (Bin Center)	ค่าต่ำสุด (Left Cutoff)	ค่าสูงสุด (Right Cutoff)
141	141.04	-1	+1
145	145.05	-1	+1
149	149.27	-1	+1
153	153.20	-1	+1
157	157.28	-1	+1
161	161.48	-1	+1
165	165.51	-1	+1
169	169.52	-1	+1

ตารางผนวกที่ ข-3 แสดงค่าเฉลี่ยความยาวผลิตภัณฑ์และค่าต่ำสุด-สูงสุด ที่วิเคราะห์ได้ในแต่ละแอลลีล
ของเครื่องหมาย MsFCA441

ชื่อแอลลีล	ค่าเฉลี่ย (Bin Center)	ค่าต่ำสุด (Left Cutoff)	ค่าสูงสุด (Right Cutoff)
95	94.92	-1	+1
103	102.98	-1	+1
107	107.08	-1	+1
111	111.11	-1	+1
115	115.11	-1	+1
119	119.00	-1	+1
123	122.84	-1	+1

ตารางผนวกที่ ข-4 แสดงค่าเฉลี่ยความยาวผลิตภัณฑ์และค่าต่ำสุด-สูงสุด ที่วิเคราะห์ได้ในแต่ละแอลลีล
ของเครื่องหมาย MsFCA453

ชื่อแอลลีล	ค่าเฉลี่ย (Bin Center)	ค่าต่ำสุด (Left Cutoff)	ค่าสูงสุด (Right Cutoff)
75	75.12	-1	+1
79	79.32	-1	+1
83	83.43	-1	+1
87	87.61	-1	+1
91	90.81	-1	+1

ตารางผนวกที่ ข-5 แสดงค่าเฉลี่ยความยาวผลิตภัณฑ์และค่าต่ำสุด-สูงสุด ที่วิเคราะห์ได้ในแต่ละแอลลีล
ของเครื่องหมาย PONCD1

ชื่อแอลลีล	ค่าเฉลี่ย (Bin Center)	ค่าต่ำสุด (Left Cutoff)	ค่าสูงสุด (Right Cutoff)
291	291.18	-1	+1
295	294.97	-1	+1
299	298.93	-1	+1
319	318.52	-1	+1
323	322.52	-1	+1
327	326.28	-1	+1
331	330.31	-1	+1

ตารางผนวกที่ ข-6 แสดงค่าเฉลี่ยความยาวผลิตภัณฑ์และค่าต่ำสุด-สูงสุด ที่วิเคราะห์ได้ในแต่ละแอลลีล
ของเครื่องหมาย PONCB4

ชื่อแอลลีล	ค่าเฉลี่ย (Bin Center)	ค่าต่ำสุด (Left Cutoff)	ค่าสูงสุด (Right Cutoff)
222	221.96	-1	+1
226	225.83	-1	+1
230	229.57	-1	+1
234	233.38	-1	+1
238	237.32	-1	+1
242	240.98	-1	+1
246	244.93	-1	+1
250	248.79	-1	+1
254	252.68	-1	+1

ตารางผนวกที่ ข-7 แสดงค่าเฉลี่ยความยาวผลิตรัณฑ์และค่าต่ำสุด-สูงสุด ที่วิเคราะห์ได้ในแต่ละแอลลีล
ของเครื่องหมาย PONCE1

ชื่อแอลลีล	ค่าเฉลี่ย (Bin Center)	ค่าต่ำสุด (Left Cutoff)	ค่าสูงสุด (Right Cutoff)
316	316.26	-0.5	+0.5
324	324.05	-0.5	+0.5
326	325.82	-0.5	+0.5
329	328.79	-0.5	+0.5
331	330.52	-0.5	+0.5
333	333.48	-0.5	+0.5
335	335.31	-0.5	+0.5
338	338.19	-0.5	+0.5
340	340.22	-0.5	+0.5
343	342.87	-0.5	+0.5
348	347.60	-0.5	+0.5
352	352.30	-0.5	+0.5
357	357.20	-0.5	+0.5

ตารางผนวกที่ ข-8 แสดงค่าเฉลี่ยความยาวผลิตรัณฑ์และค่าต่ำสุด-สูงสุด ที่วิเคราะห์ได้ในแต่ละแอลลีล
ของเครื่องหมาย Pan7A1

ชื่อแอลลีล	ค่าเฉลี่ย (Bin Center)	ค่าต่ำสุด (Left Cutoff)	ค่าสูงสุด (Right Cutoff)
162	162.87	-1	+1
166	166.80	-1	+1
170	170.88	-1	+1
174	174.95	-1	+1
178	179.03	-1	+1
182	183.12	-1	+1
190	188.69	-1	+1

ตารางผนวกที่ ข-9 แสดงค่าเฉลี่ยความยาวผลิตภัณฑ์และค่าต่ำสุด-สูงสุด ที่วิเคราะห์ได้ในแต่ละแอลลีล
ของเครื่องหมาย PTZF

ชื่อแอลลีล	ค่าเฉลี่ย (Bin Center)	ค่าต่ำสุด (Left Cutoff)	ค่าสูงสุด (Right Cutoff)
137	136.94	-1	+1
147	147.51	-1	+1

ตารางผนวกที่ ข-10 แสดงค่าเฉลี่ยความยาวผลิตภัณฑ์และค่าต่ำสุด-สูงสุด ที่วิเคราะห์ได้ในแต่ละแอลลีล
ของเครื่องหมาย F85

ชื่อแอลลีล	ค่าเฉลี่ย (Bin Center)	ค่าต่ำสุด (Left Cutoff)	ค่าสูงสุด (Right Cutoff)
143	143.18	-1	+1
147	147.37	-1	+1
151	151.58	-1	+1
155	155.73	-1	+1
159	159.96	-1	+1
163	164.11	-1	+1
167	168.18	-1	+1

ตารางผนวกที่ ข-11 แสดงค่าเฉลี่ยความยาวผลิตภัณฑ์และค่าต่ำสุด-สูงสุด ที่วิเคราะห์ได้ในแต่ละแอลลีล
ของเครื่องหมาย FCA272

ชื่อแอลลีล	ค่าเฉลี่ย (Bin Center)	ค่าต่ำสุด (Left Cutoff)	ค่าสูงสุด (Right Cutoff)
115	114.98	-0.5	+0.5
117	116.87	-0.5	+0.5
119	118.77	-0.5	+0.5
121	120.56	-0.5	+0.5
123	122.60	-0.5	+0.5

ตารางผนวกที่ ข-12 แสดงค่าเฉลี่ยความยาวผลิตรัณฑ์และค่าต่ำสุด-สูงสุด ที่วิเคราะห์ได้ในแต่ละแอลลีล
ของเครื่องหมาย FCA742a

ชื่อแอลลีล	ค่าเฉลี่ย (Bin Center)	ค่าต่ำสุด (Left Cutoff)	ค่าสูงสุด (Right Cutoff)
188	187.67	-1	+1
192	191.44	-1	+1
196	196.01	-1	+1
200	200.00	-1	+1
204	203.91	-1	+1
208	208.04	-1	+1
212	212.17	-1	+1
216	216.65	-1	+1
220	220.78	-1	+1

ตารางผนวกที่ ข-13 แสดงค่าเฉลี่ยความยาวผลิตรัณฑ์และค่าต่ำสุด-สูงสุด ที่วิเคราะห์ได้ในแต่ละแอลลีล
ของเครื่องหมาย Pan4A2

ชื่อแอลลีล	ค่าเฉลี่ย (Bin Center)	ค่าต่ำสุด (Left Cutoff)	ค่าสูงสุด (Right Cutoff)
143	142.62	-1	+1
147	146.50	-1	+1
151	150.35	-1	+1

ตารางผนวกที่ ข-14 แสดงค่าเฉลี่ยความยาวผลิตภัณฑ์และค่าต่ำสุด-สูงสุด ที่วิเคราะห์ได้ในแต่ละแอลลีล
ของเครื่องหมาย PONCC1

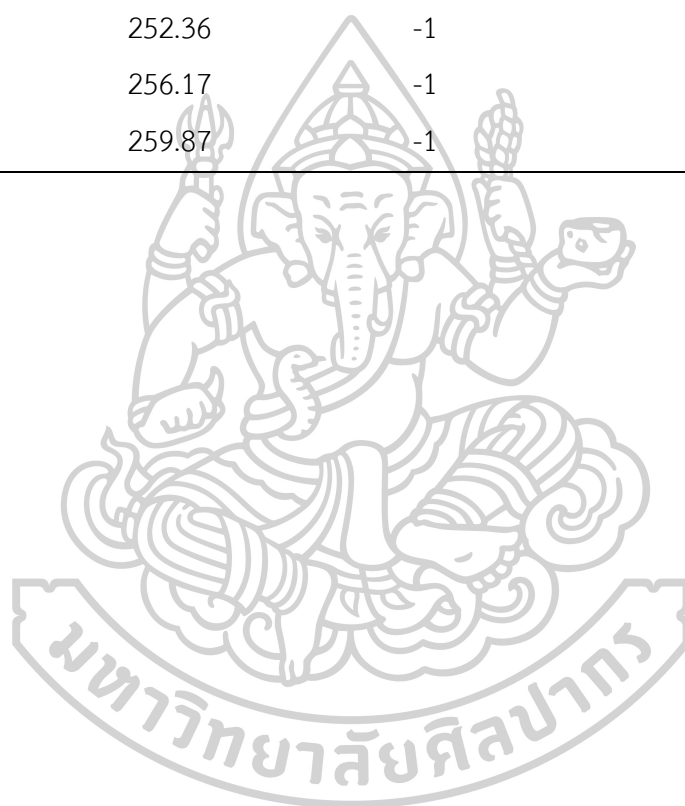
ชื่อแอลลีล	ค่าเฉลี่ย (Bin Center)	ค่าต่ำสุด (Left Cutoff)	ค่าสูงสุด (Right Cutoff)
259	258.83	-1	+1
263	262.84	-1	+1
267	266.88	-1	+1
271	271.08	-1	+1
275	275.17	-1	+1
279	279.31	-1	+1
283	283.47	-1	+1
287	287.51	-1	+1
291	291.66	-1	+1
295	295.68	-1	+1
299	299.76	-1	+1
303	303.86	-1	+1

ตารางผนวกที่ ข-15 แสดงค่าเฉลี่ยความยาวผลิตภัณฑ์และค่าต่ำสุด-สูงสุด ที่วิเคราะห์ได้ในแต่ละแอลลีล
ของเครื่องหมาย PONCD2

ชื่อแอลลีล	ค่าเฉลี่ย (Bin Center)	ค่าต่ำสุด (Left Cutoff)	ค่าสูงสุด (Right Cutoff)
133	132.88	-1	+1
137	137.00	-1	+1
141	141.12	-1	+1
145	145.28	-1	+1
149	149.48	-1	+1
153	153.60	-1	+1

ตารางผนวกที่ ข-16 แสดงค่าเฉลี่ยความยาวผลิตภัณฑ์และค่าต่ำสุด-สูงสุด ที่วิเคราะห์ได้ในแต่ละแอลลีล
ของเครื่องหมาย PttD5

ชื่อแอลลีล	ค่าเฉลี่ย (Bin Center)	ค่าต่ำสุด (Left Cutoff)	ค่าสูงสุด (Right Cutoff)
241	240.62	-1	+1
245	244.61	-1	+1
249	248.55	-1	+1
253	252.36	-1	+1
257	256.17	-1	+1
261	259.87	-1	+1





ตารางผนวกที่ ซ-1 แสดงคู่ตัวอย่างเลือดดาวที่มีโอกาสมีความสัมพันธ์ทางสายเลือดแบบแม่-ลูก
หรือ พ่อ-ลูก

เลือดดาว ตัวที่ 1	เลือดดาว ตัวที่ 2	Likelihood Ratio (LR)	เปอร์เซ็นต์ ความน่าจะเป็น แม่-ลูก หรือ พ่อ-ลูก	การแชร์ แอลลีล	จำนวน เครื่องหมาย ที่สอดคล้อง
025 (E)	075 (J)	3,470,320,000	99.99999997	76.67%	15
096 (K)	106 (D)	262,281,000	99.99999962	73.33%	15
071 (D)	098 (D)	256,067,000	99.99999961	73.33%	15
059 (D)	096 (K)	91,093,100	99.9999989	76.67%	15
059 (D)	106 (D)	78,582,100	99.99999873	60%	15
065 (D)	071 (D)	40,371,200	99.99999752	76.67%	15
065 (D)	098 (D)	28,053,000	99.99999644	73.33%	15
062 (D)	098 (D)	17,191,800	99.99999418	76.67%	15
065 (D)	068 (D)	14,354,100	99.99999303	76.67%	15
068 (D)	071 (D)	10,324,400	99.99999031	66.67%	15
062 (D)	071 (D)	9,505,680	99.99998948	73.33%	15
065 (D)	072 (D)	9,262,300	99.9999892	70%	15
096 (K)	109 (D)	8,220,510	99.99998784	80%	15
062 (D)	068 (D)	6,665,790	99.999985	83.33%	15
065 (D)	067 (D)	5,781,560	99.9999827	76.67%	15
014 (S)	027 (E)	5,487,330	99.99998178	63.33%	15
072 (D)	112 (D)	4,200,410	99.99997619	76.67%	15
059 (D)	109 (D)	4,095,790	99.99997558	73.33%	15
061 (D)	065 (D)	3,726,470	99.99997316	66.67%	15
106 (D)	109 (D)	3,197,370	99.99996872	60%	15
078 (J)	081 (J)	2,753,510	99.99996368	70%	15
067 (D)	068 (D)	2,266,460	99.99995588	70%	15
065 (D)	066 (D)	2,116,490	99.99995275	80%	15
067 (D)	112 (D)	1,739,740	99.99994252	70%	15

ตารางผนวกที่ ซ-1 แสดงคู่ตัวอย่างเลือดดาวที่มีโอกาสมีความสัมพันธ์ทางสายเลือดแบบแม่-ลูก
หรือ พ่อ-ลูก (ต่อ)

เลือดดาว ตัวที่ 1	เลือดดาว ตัวที่ 2	Likelihood Ratio (LR)	เปอร์เซ็นต์ ความน่าจะเป็น แม่-ลูก หรือ พ่อ-ลูก	การแชร์ แอลลีล	จำนวน เครื่องหมาย ที่สอดคล้อง
016 (S)	027 (E)	1,665,730	99.99993997	56.67%	15
001 (A)	006 (S)	1,592,120	99.99993719	76.67%	15
020 (E)	021 (E)	1,342,660	99.99992552	75%	14
114 (L)	116 (L)	1,207,660	99.9999172	63.33%	15
021 (E)	027 (E)	1,200,860	99.99991673	67.86%	14
020 (E)	027 (E)	1,143,820	99.99991257	60.71%	14
028 (E)	116 (L)	1,139,780	99.99991226	70%	15
014 (S)	029 (E)	1,097,980	99.99990892	83.33%	15
062 (D)	067 (D)	1,038,590	99.99990372	76.67%	15
064 (D)	070 (D)	1,032,860	99.99990318	80%	15
061 (D)	072 (D)	946,842	99.99989439	66.67%	15
059 (D)	065 (D)	786,809	99.9998729	56.67%	15
114 (L)	115 (L)	786,403	99.99987284	63.33%	15
059 (D)	063 (D)	708,902	99.99985894	70%	15
028 (E)	115 (L)	659,926	99.99984847	70%	15
037 (G)	086 (J)	552,198	99.99981891	66.67%	12
062 (D)	065 (D)	470,716	99.99978756	66.67%	15
039 (G)	091 (J)	462,577	99.99978382	76.67%	15
050 (G)	090 (J)	440,846	99.99977316	76.67%	15
065 (D)	070 (D)	406,253	99.99975385	60%	15
066 (D)	068 (D)	357,618	99.99972037	76.67%	15
037 (G)	046 (G)	353,776	99.99971734	66.67%	12
082 (J)	116 (L)	335,627	99.99970205	73.33%	15
034 (G)	084 (J)	331,308	99.99969817	83.33%	12

ตารางผนวกที่ ซ-1 แสดงคู่ตัวอย่างเลือดดาวที่มีโอกาสมีความสัมพันธ์ทางสายเลือดแบบแม่-ลูก
หรือ พ่อ-ลูก (ต่อ)

เลือดดาว ตัวที่ 1	เลือดดาว ตัวที่ 2	Likelihood Ratio (LR)	เปอร์เซ็นต์ ความน่าจะเป็น แม่-ลูก หรือ พ่อ-ลูก	การแชร์ แอลลีล	จำนวน เครื่องหมาย ที่สอดคล้อง
028 (E)	077 (J)	319,907	99.99968741	66.67%	15
023 (E)	116 (L)	309,666	99.99967707	73.33%	15
062 (D)	112 (D)	217,467	99.99954016	70%	15
043 (G)	045 (G)	173,305	99.99942298	66.67%	15
082 (J)	115 (L)	163,118	99.99938695	76.67%	15
039 (G)	084 (J)	153,399	99.99934811	73.33%	15
064 (D)	072 (D)	142,172	99.99929663	80%	15
081 (J)	083 (J)	138,688	99.99927896	60%	15
047 (G)	092 (J)	131,017	99.99923674	73.33%	15
049 (G)	092 (J)	122,831	99.99918587	60%	15
028 (E)	082 (J)	117,813	99.9991512	60%	15
049 (G)	052 (G)	115,498	99.99913418	76.67%	15
002 (A)	005 (S)	100,177	99.99900177	73.33%	15
037 (G)	047 (G)	88,443.9	99.99886934	58.33%	12
012 (C)	058 (D)	88,310.6	99.99886763	76.67%	15
058 (D)	106 (D)	83,124.4	99.99879698	60%	15
052 (G)	090 (J)	75,793.4	99.99868062	70%	15
013 (C)	066 (D)	75,579.9	99.9986769	60%	15
064 (D)	067 (D)	68,198.3	99.99853369	70%	15
049 (G)	090 (J)	68,113.8	99.99853187	63.33%	15
027 (E)	029 (E)	64,004.6	99.99843761	60%	15
039 (G)	087 (J)	58,815.9	99.99829978	70%	15
002 (A)	006 (S)	53,746.5	99.99813941	70%	15
064 (D)	065 (D)	51,733.8	99.99806703	66.67%	15

ตารางผนวกที่ ซ-1 แสดงคู่ตัวอย่างเลือดดาวที่มีโอกาสมีความสัมพันธ์ทางสายเลือดแบบแม่-ลูก
หรือ พ่อ-ลูก (ต่อ)

เลือดดาว ตัวที่ 1	เลือดดาว ตัวที่ 2	Likelihood Ratio (LR)	เปอร์เซ็นต์ ความน่าจะเป็น แม่-ลูก หรือ พ่อ-ลูก	การแชร์ แอลลีล	จำนวน เครื่องหมาย ที่สอดคล้อง
J081 (J)	116 (L)	49,457.5	99.99797806	66.67%	15
035 (G)	049 (G)	39,196.6	99.99744876	73.33%	15
038 (G)	046 (G)	39,031.8	99.99743799	53.57%	14
051 (G)	085 (J)	37,843.8	99.99735756	83.33%	15
013 (C)	065 (D)	28,143.3	99.99644676	53.33%	15
015 (S)	047 (G)	27,367.5	99.99634603	63.33%	15
062 (D)	066 (D)	25,945	99.99614569	70%	15
058 (D)	060 (D)	24,972.1	99.99599553	73.33%	15
036 (G)	049 (G)	21,860.5	99.99542554	70%	15
050 (D)	052 (G)	20,577.7	99.99514037	70%	15
063 (D)	064 (D)	16,725	99.99402093	63.33%	15
052 (G)	087 (J)	15,941	99.99372687	56.67%	15
060 (D)	063 (D)	15,455.3	99.99352973	73.33%	15
035 (G)	052 (G)	15,278.9	99.99345503	73.33%	15
023 (E)	081 (J)	15,199.2	99.99342071	56.67%	15
058 (D)	105 (D)	14,905.2	99.99329093	70%	15
039 (G)	050 (G)	14,620.5	99.99316029	66.67%	15
052 (G)	084 (J)	13,059	99.99234245	66.67%	15
034 (G)	039 (G)	12,877.2	99.99223434	66.67%	12
052 (G)	092 (J)	11,599.6	99.99137901	56.67%	15
046 (G)	052 (G)	9,716.28	99.989708	60%	15
035 (G)	044 (G)	9,314.63	99.9892642	66.67%	15
001 (A)	005 (S)	8,740.94	99.98855958	60%	15
012 (C)	105 (D)	7,972.93	99.98745756	63.33%	15

ตารางผนวกที่ ซ-1 แสดงคู่ตัวอย่างเลือดดาวที่มีโอกาสมีความสัมพันธ์ทางสายเลือดแบบแม่-ลูก
หรือ พ่อ-ลูก (ต่อ)

เลือดดาว ตัวที่ 1	เลือดดาว ตัวที่ 2	Likelihood Ratio (LR)	เปอร์เซ็นต์ ความน่าจะเป็น แม่-ลูก หรือ พ่อ-ลูก	การแชร์ แอลลีล	จำนวน เครื่องหมาย ที่สอดคล้อง
058 (D)	096 (K)	7,684.41	99.98698664	63.33%	15
062 (D)	105 (D)	7,666.9	99.98695692	56.67%	15
047 (G)	051 (G)	5,426.81	99.98157297	73.33%	15
034 (G)	052 (G)	4,539.56	99.97797143	58.33%	12
012 (C)	064 (D)	4,292.82	99.97670529	66.67%	15
035 (G)	042 (G)	4,224.09	99.97632626	70%	15
058 (D)	109 (D)	4,215.13	99.97627594	60%	15
043 (G)	047 (G)	3,047.06	99.96718148	60%	15
035 (G)	043 (G)	2,911.68	99.96565557	66.67%	15
035 (G)	036 (G)	2,334.03	99.95715565	66.67%	15
036 (G)	052 (G)	2,330.2	99.95708523	63.33%	15
015 (S)	052 (G)	1,730.9	99.94222659	60%	15
039 (G)	088 (J)	1,519.58	99.93419234	60%	15
013 (C)	060 (D)	1,370.74	99.9270467	63.33%	15
047 (G)	050 (G)	1,328.53	99.92472884	60%	15
001 (A)	002 (A)	1,087.56	99.90805105	60%	15
052 (G)	085 (J)	448.735*	99.77715133	60%	15
001 (A)	057 (I)	438.229*	99.7718088	63.33%	15
042 (G)	088 (J)	374.044*	99.73265177	66.67%	15
038 (G)	085 (J)	228.196*	99.56178022	53.57%	14
060 (D)	062 (D)	217.727*	99.54070924	60%	15
035 (G)	047 (G)	173.31*	99.42299925	60%	15
038 (G)	051 (G)	164.687*	99.39278753	60.71%	14
060 (D)	061 (D)	108.735*	99.08033292	56.67%	15

ตารางผนวกที่ ซ-1 แสดงคู่ตัวอย่างเลือดดาวที่มีโอกาสมีความสัมพันธ์ทางสายเลือดแบบแม่-ลูก
หรือ พ่อ-ลูก (ต่อ)

เลือดดาว ตัวที่ 1	เลือดดาว ตัวที่ 2	Likelihood Ratio (LR)	เปอร์เซ็นต์ ความน่าจะเป็น แม่-ลูก หรือ พ่อ-ลูก	การแชร์ แอลลีล	จำนวน เครื่องหมาย ที่สอดคล้อง
035 (G)	088 (J)	101.181*	99.01167215	60%	15
035 (G)	051 (G)	84.2753*	98.81341271	60%	15
036 (G)	042 (G)	82.9443*	98.79437164	56.67%	15
083 (J)	086 (J)	49.3569*	97.97394083	53.33%	15

หมายเหตุ * หมายถึง ผลรวมค่า Likelihood Ratio (LR) ต่ำกว่าจำนวน
ประชากรเลือดดาวของประเทศไทย (<1,000)
(A), (C), (D), (E), (G), (I), (J), (K) และ (L)
หมายถึง ตัวอย่างเลือดดาวจากสถานที่เลี้ยง A, C, D, E, G, I, J, K
และ L
(S) หมายถึง ตัวอย่างเลือดดาวของกลางที่ได้จากการตรวจยึด (Seized)



ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล

นางสาวกิตติยา เพ็ญชาติ

วุฒิการศึกษา

2555-2558 กษ.บ. (การจัดการทรัพยากรป่าไม้และสิ่งแวดล้อม)

มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมมาธิราช

2551-2554

วท.ม. (วิทยาศาสตร์ชีวภาพป่าไม้)

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2547-2551

วท.บ. (ชีววิทยา)

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผลงานตีพิมพ์

กิตติยา เพ็ญชาติ, ศิริรัตน์ ชูสกุลเกรียง, และณัฐพจน์ วาฤทธิ. (2568). การตรวจพิสูจน์พันธุกรรมสำหรับใช้ติดตามและตรวจสอบแหล่งที่มาของสัตว์ป่าของกลาง. วารสารวิชาการอาชีวศึกษาและนิติวิทยาศาสตร์, 11(1).

กิตติยา เพ็ญชาติ, ศิริรัตน์ ชูสกุลเกรียง, เจริญชัย โตไธสง. (2568).

สถานการณ์การลักลอบค้าสัตว์ป่าและการบังคับใช้กฎหมายของประเทศไทยเพื่อการคุ้มครองสัตว์ป่า. วารสารอาชีวศึกษาและสังคมศาสตร์, 7(1).

Ewart, K. M., Sitam, F. T., Ali, N. A. N. B. G., Ogden, R., Morgan, K. I., Tran, H. M., Bui, P.T.T., Nguyen, Q. T., Nguyen, G. S., Rosli, N., Penchart, K., Ouitavon, K. and McEwing, R. (2025). TigerBase: A DNA registration system to enhance enforcement and compliance testing of captive tiger facilities. Forensic Science International: Genetics, 74, 103149.

Ouitavon, K., McEwing, R., Penchart, K., Sri-aksorn, K., and Chimchome, V. (2022). DNA recovery and analysis from helmeted hornbill (*Rhinoplax vigil*) casques and its potential application in wildlife law enforcement. Forensic Science International: Animals and Environments, 2, 100037.

Kitpipit, T., Thongjued, K., Penchart, K., Ouithavon, K., and Chotigeat, W. (2017). Mini-SNaPshot multiplex assays authenticate elephant ivory and simultaneously identify the species origin. *Forensic Science International: Genetics*, 27, 106-115.

Kitpipit, T., Penchart, K., Ouithavon, K., Satasook, C., Linacre, A., and Thanakiatkrai, P. (2016). A novel real time PCR assay using melt curve analysis for ivory identification. *Forensic science international*, 267, 210-217.

Kitpipit, T., Thanakiatkrai, P., Penchart, K., Ouithavon, K., Satasook, C., and Linacre, A. (2016). Ivory species identification using electrophoresis-based techniques. *Electrophoresis*, 37(23-24), 3068-3075.

Buddhachat, K., Thitaram, C., Brown, J. L., Klinhom, S., Bansiddhi, P., Penchart, K., Ouithavon, K., Sriaksorn, K., Pa-in, C., Kanchanasaka, B., Somgird, C. and Nganvongpanit, K. (2016). Use of handheld X-ray fluorescence as a non-invasive method to distinguish between Asian and African elephant tusks. *Scientific Reports*, 6(1), 1-11.

Penchart, K., Sukmasuang, R., & Wajjawalku, W. (2012). Genetic Diversity of Selected Pheasant Species in Captive Conditions. *European Journal of Scientific Research*, 83(2), 190-199.

รางวัลที่ได้รับ

SWFS Bob Anderson Student Scholarship Award for dedication to wildlife forensics