

Thesis Title DNA Analysis for Parentage Test in Domesticated Asian Elephant (*Elephas maximus*)

Author Mr. Chaleamchat Somgird

Degree Master of Science (Health Sciences)

Thesis Advisory Committee

Assoc. Prof. Dr. Suvichai Rojanasthien Chairperson

Assoc. Prof. Dr. Daoroong Kangwanpong Member

Assoc. Prof. Dr. Siriwan Ong-chai Member

ABSTRACT

Population numbers of Asian elephants (*Elephas maximus*) in Thailand have declined rapidly due to the habitat fragmentation, and the distribution of most populations is at present restricted to protected areas or in captivity. Studying the genetic status of Thai elephant populations can make a major contribution to an effective long term management of this species. To make clear of the domesticated elephants' biographies would be a practical point to start with, especially reform the elephant's registration form for prevent the illegal poaching and registration fraud. This study aimed to identify individual and the pedigree of domesticated Asian

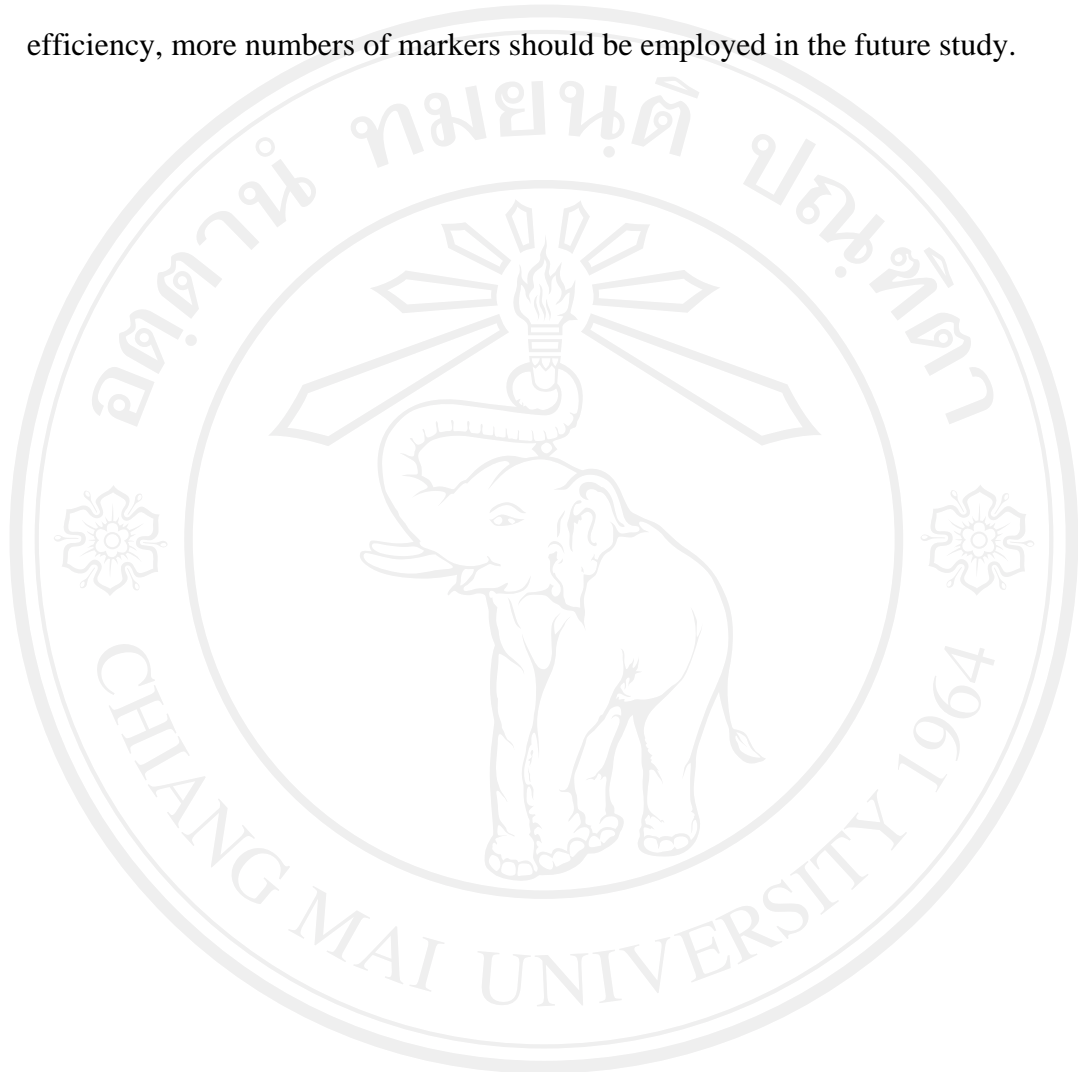
elephants in the upper northern part of Thailand, using autosomal microsatellites and mitochondrial DNA.

Parentage test was performed in 5 domesticated elephant families (N=22) with clear background. DNA was extracted from either blood or hair follicles using DNA Blood Mini Kit and adapted phenol-chloroform-isoamyl alcohol technique respectively. DNA samples was amplified and then genotyped at 3 microsatellite loci (FH94, FH102 and LafMS03) using the automated ABI 3130XL DNA analyzer with GeneScan 4.0 software. The result mostly showed biparental allelic inheritance. Null alleles were observed only at FH102 locus in 2 calves. The power of discrimination (PD) and the power of exclusion (PE) evaluating from frequency distributions, indicated that all families have true blood line, with the cumulative values of 99.72 and 75.31 percents respectively.

Mitochondrial partial D-loop and cytochrome b of female elephants and their calves were sequenced by ABI Prism 3130XL automated DNA sequencer using BigDye Terminator V3.0 Cycle Sequencing Kit. DNA sequences from female elephants were compared with their calves using SeqMan 5.08; DNA Star Inc. and Clustal X multiple sequence alignment program. The inheritance showed mother and calf relationship in all families.

Three microsatellite markers, mitochondrial DNA at D-loop region and cytochrome *b* were proved to be a useful tool for Thai elephant parentage test and individual identification. However in the forensic medicine, the parentage test is assessing by genotyping information from DNA fingerprint or fragment analysis, such as electrophoresis or electrophorogram, and combined with a PD and PE. Because of PD and PE are used for evaluate the efficiency of method or markers, especially a

high polymorphism loci. The information evaluate should be done with PD, PE and paternity index of the individual case. Therefore in order to make the test to more efficiency, more numbers of markers should be employed in the future study.



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์

การวิเคราะห์ดีเอ็นเอเพื่อพิสูจน์ความเป็นพ่อ-แม่-ลูกในช้างเลี้ยง

ผู้เขียน

นายเฉลิมชาติ สมเกิด

ปริญญา

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตรสุขภาพ)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

รองศาสตราจารย์ ดร. สุวิชัย โจรนเสถียร ประธานกรรมการ
 รองศาสตราจารย์ ดร. ดาวรุ่ง กังวานพงศ์ กรรมการ
 รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริวรรณ องค์กรไชย กรรมการ

บทคัดย่อ

จำนวนประชากรของช้างเอเชีย (*Elephas maximus*) ในประเทศไทยลดลงอย่างรวดเร็วจากการที่พื้นที่อยู่อาศัยเหลือน้อยลง และในปัจจุบันประชากรช้างส่วนใหญ่กระจายตัวอยู่อย่างจำกัดในเขตอนุรักษ์หรือตามปางช้าง การศึกษาสถานภาพทางพันธุกรรมของประชากรช้างไทย น่าจะช่วยเสริมสร้างให้การบริหารจัดการช้างในระยะยาวมีประสิทธิภาพได้ โดยเฉพาะการแก้ไขทะเบียนช้างเสียใหม่เพื่อป้องกันการลักลอบจับช้างป่าและการสวมทะเบียนในช้างเลี้ยง ซึ่งการจัดการให้ประวัติของช้างเลี้ยงมีความชัดเจนจะเป็นจุดเริ่มต้นที่เป็นรูปธรรมอย่างยิ่ง การศึกษานี้จึงมุ่งหมายที่จะตรวจสอบพันธุประวัติของช้างเลี้ยงในภาคเหนือตอนบนของประเทศไทย โดยใช้ไมโครแซเทลไลต์และดีเอ็นเอไมโทคอนเดรีย

การทดสอบความเป็นพ่อ-แม่-ลูก ทำในช้างเลี้ยงจำนวน 5 ครอบครัว (n=22) ที่มีประวัติชัดเจน โดยสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือดและขนช้าง ด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป (DNA Blood Mini Kit) และวิธีที่ปรับปรุงมาจากมาตรฐาน phenol-chloroform-isoamyl alcohol ตามลำดับ จากนั้นนำตัวอย่างดีเอ็นเอไปเพิ่มปริมาณ แล้วนำไปหาจีโนไทป์ของไมโครแซเทลไลต์ จำนวน 3 ตำแหน่ง คือ FH94, FH102 และ LafMS03 ด้วยเครื่องวิเคราะห์ดีเอ็นเออัตโนมัติ ABI 3130XL พร้อมโปรแกรม GeneScan 4.0 ผลส่วนใหญ่ออกมาในลักษณะการถ่ายทอดอัลลีลจากทั้งพ่อและแม่ พบ null alleles ที่ตำแหน่ง FH102 ในลูกช้างเพียง 2 เชือก จากการคำนวณค่าการแยกแยะ (PE)

และค่าการคัดออก (PD) พบว่ามีค่าสะสมร้อยละ 99.72 และ 75.31 ตามลำดับ แสดงว่าเป็นครอบครัวที่แท้จริงทั้ง 5 ครอบครัว

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอไมโทคอนเดรียส่วน D-loop และ cytochrome *b* ทำด้วยเครื่องวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์อัตโนมัติ ABI Prism 3130XL โดยใช้ BigDye Terminator V3.0 Cycle Sequencing Kit แล้วนำมาวิเคราะห์เปรียบเทียบระหว่างแม่และลูกด้วยโปรแกรม SeqMan 5.08; DNA Star Inc. และ Clustal X พบว่า การถ่ายทอดทางพันธุกรรมแสดงความสัมพันธ์ระหว่างแม่และลูกข้างในทุกครอบครัว

การวิจัยครั้งนี้สามารถพิสูจน์ได้ว่า เครื่องหมายทางพันธุกรรมชนิดไมโครแซเทลไลต์ 3 ตำแหน่งและดีเอ็นเอไมโทคอนเดรีย ส่วน D-loop และ cytochrome *b* เป็นเครื่องมือที่เป็นประโยชน์สำหรับทดสอบความเป็นพ่อ-แม่-ลูกของช้างไทย อย่างไรก็ตามการที่จะเพิ่มประสิทธิภาพของวิธีการที่ใช้ให้สูงขึ้น จำเป็นต้องเพิ่มจำนวนเครื่องหมายพันธุกรรมที่ใช้ทดสอบให้มากขึ้น สำหรับการศึกษาดำเนินไปในอนาคต ด้วยที่ค่า PD และ PE ที่แสดงนั้นจะบอกประสิทธิภาพของวิธีการที่ใช้โดยเฉพาะการใช้ตำแหน่งทางพันธุกรรมที่มีการผันแปรทางพันธุกรรมที่สูง ทั้งนี้ในกรณีวิทยาศาสตร์แล้วยังมีความจำเป็นที่ต้องวิเคราะห์จากลักษณะของ genotype ที่ปรากฏจากการทำ electrophoresis หรือ electrophorogram ในการพิจารณาประกอบ ซึ่งจะพิจารณาจากข้อมูลของค่า PD, PE และโอกาสของความเป็นพ่อเป็นแม่เพิ่มเติมร่วมกันตามแต่ละกรณีไป