



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและพฤติกรรมของช้างที่ปล่อยคืนสู่ธรรมชาติ

โดย ผศ.นสพ.ดร. ฉัตรโชติ ทิตาราม

เดือน ปี ที่เสร็จโครงการ มิถุนายน 2556

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและพฤติกรรมของช้างที่ปล่อยคืนสู่ธรรมชาติ

ผู้วิจัย	สังกัด
ผศ.นสพ.ดร. จัตรโชติ ทิตาราม	คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ผศ.ดร. สิริวดี ชมเดช	คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
อ.น.สพ. เฉลิมชาติ สมเกิด	คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
น.สพ.ทวีโชค อังควานิช	สถาบันคชบาลแห่งชาติ องค์การอุตสาหกรรมป่าไม้
นางสาว สุรชาติพย์ เดชชัยศรี	ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
รศ.ดร. ดาวรุ่ง กังวานพงศ์	คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
และมหาวิทยาลัยเชียงใหม่
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : MRG5480260

ชื่อโครงการ : ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและพฤติกรรมของช้างที่ปล่อยคืนสู่ธรรมชาติ

ชื่อนักวิจัย : ฉัตรโชติ ทิตาราม สุรชาติพย์ เดชชัยศรี เฉลิมชาติ สมเกิด ทวีโชค อังควานิช สิริวดี ชมเดช

อีเมลล์ : chatchte.thitaram@cmu.ac.th, cthitar@gmail.com

ระยะเวลาโครงการ : 2 ปี

บทคัดย่อ:

ช้างที่ปล่อยคืนสู่ธรรมชาติเป็นช้างที่มาจากหลากหลายพื้นที่ของประเทศไทย ช้างเหล่านี้มีพฤติกรรมที่แตกต่างกันไปเฉพาะตัว ความสามารถในการอยู่ร่วมกันหรือการจับกลุ่มเข้าเป็นโขลงเดียวกันย่อมแตกต่างกันไปตามลักษณะของช้างแต่ละตัว จากการศึกษาด้านความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและพฤติกรรมตามธรรมชาติพบว่าช้างป่าโขลงเดียวกันที่มีแม่แปรกเป็นผู้นำจะอยู่ในกลุ่มพันธุกรรมที่มาจากสายแม่เดียวกัน และมีความสัมพันธ์ด้านพันธุกรรมทางเครือญาติแบบใกล้ชิด คณะผู้วิจัยมีสมมติฐานว่า ช้างที่ปล่อยคืนสู่ธรรมชาติจะจับกลุ่มกันตามพันธุกรรมสายแม่และตามความสัมพันธ์ทางเครือญาติ ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้ จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความเข้ากันได้และการรวมฝูงของช้าง ในโครงการคืนช้างสู่ธรรมชาติ โดยใช้ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมเป็นเครื่องมือ เก็บตัวอย่างเลือดช้างก่อนปล่อยคืนสู่ธรรมชาติจากเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง จังหวัดลพบุรี และ เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าดอยผาเมือง จังหวัดลำปาง นำมาสกัดดีเอ็นเอและทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสที่ไม่โครมาทเทิล 12 ตำแหน่ง และดีเอ็นเอไมโทคอนเดรียส่วนดีลูปพร้อมทั้งเก็บข้อมูลพฤติกรรมการรวมกลุ่มของช้างทุกสัปดาห์เป็นระยะเวลา 12 เดือน ผลการศึกษาที่ได้ คือ ช้างที่มีการจับกลุ่มกันจะมีค่าสหสัมพันธ์ความเกี่ยวข้องทางเครือญาติเฉลี่ยอยู่ที่ 0.075 ± 0.14 ในขณะที่ช้างซึ่งแยกตัวอยู่โดดเดี่ยวจะมีค่าสหสัมพันธ์ความเกี่ยวข้องทางเครือญาติเฉลี่ยอยู่ที่ 0.038 ± 0.05 โดยช้างที่อยู่ในกลุ่มเดียวกันจะมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสายแม่ค่อนข้างมาก นอกจากนี้ความหลากหลายทางพันธุกรรมของช้างในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง จังหวัดลพบุรี และ เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าดอยผาเมือง จังหวัดลำปาง มีค่าเท่ากับ 0.7385 ($n = 29$) และ 0.8083 ($n = 36$) ตามลำดับ โดยพบกลุ่มของดีเอ็นเอไมโทคอนเดรีย 12 กลุ่มจากทั้งสองเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่า สรุปคือ ลักษณะการจับกลุ่มของช้างที่ไม่ได้มีความสัมพันธ์ทางเครือญาติ และ ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมสายแม่ แต่จะมีการจับกลุ่มกันโดยมีลูกช้างเป็นศูนย์กลาง ในบางครั้ง ช้างบางตัวอาจแยกอยู่โดดเดี่ยวโดยไม่รวมกลุ่มกับช้างตัวอื่น อย่างไรก็ตามการวางแผนการจัดกลุ่มของช้างที่คืนสู่ธรรมชาติ โดยการนำช้างที่มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมทางสายแม่ และ ความสัมพันธ์ของเครือญาติใกล้เคียงกันมารวมกลุ่มกัน จะมีโอกาสที่ช้างเหล่านั้นจับกลุ่มกันได้สูงกว่า โดยเป็นการสร้างกลุ่มใหม่ของช้างที่ใกล้เคียงกับธรรมชาติ

คำหลัก:

ช้างเอเชีย, การคืนสัตว์สู่ธรรมชาติ, ไมโครแซทเทลไลท์, ไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ, พฤติกรรมการรวมกลุ่ม

Abstract

Project Code : MRG5480260

Project Title : Genetic relatedness and behaviors of releasing Asian elephants (*Elephas maximus*) in the elephant reintroduction project

Investigator : Chatchote Thitaram, Suthathip ejchaisri, Chaleamchat Somgird, Taweepoke Angkawanish and Siriwadee Chomdet

E-mail Address : chatchote.thitaram@cmu.ac.th, cthitaram@gmail.com

Project Period : 2 years

Abstract:

Elephants in the reintroduction project were recruited from several parts of Thailand. Their behaviors, i.e. social organization, differed individually. Previous reports illustrated that wild elephants with the matriarch in the herd contained same matrilineal line and had close genetic relatedness. We, therefore, hypothesized that the reintroduced elephants would set up the social structure based on maternal inherited DNA and genetic relatedness. The objective of this study was to investigate the genetic relatedness and behavioral relationship of the elephants in the reintroduction project. Blood samples were collected from 65 elephants before releasing to the Sublanka and Doiphamuang wildlife sanctuary, and DNA was extracted for microsatellite 12 loci and mitochondrial DNA (D-loop region) analysis. Information of social bonding behaviors was collected weekly for 12 months. The results showed that the average pairwise relatedness of the elephants in the same group was 0.0885, while that of isolated elephants was 0.0316. Several mitochondrial haplotypes were found in the same elephant group. Furthermore, the observed heterozygosity in the Sublanka and Doiphamuang wildlife sanctuaries were 0.7385 (n = 29) and 0.8083 (n = 36) respectively, and 12 mitochondrial haplotypes were found in each location. In conclusion, social bonding of the reintroduced elephants was not influenced by genetic relatedness and mitochondrial DNA haplotype, but was impacted by the elephant calf, which was the center of gathering, while many elephants occasionally preferred isolation. However, the management of reintroduction procedure by introducing the elephants, carrying closed pairwise relatedness and same mitochondrial haplotype, would increase the chance of group forming which lead to the establishment of natural-liked elephant herd.

Keywords :

Asian elephant, reintroduction, microsatellite, mitochondrial DNA, group forming behavior

แบบสรุปผู้บริหาร
[Executive Summary]

1. ชื่อโครงการ

(ภาษาไทย) ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและพฤติกรรมของช้างที่ปล่อยคืนสู่ธรรมชาติ

(ภาษาอังกฤษ) (Genetic relatedness and behaviors of releasing Asian elephants (*Elephas maximus*) in the elephant reintroduction project)

2. ชื่อคณะผู้วิจัย

1. ชื่อ นามสกุล ผศ.น.สพ.ดร. จัตรีโชติ ทิตาราม (หัวหน้าโครงการวิจัย)
สถานที่ทำงาน คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
โทรศัพท์ 053-948015, 053-948055 โทรสาร 053-948015
e-mail cthitaram@gmail.com, thitaram@chiangmai.ac.th
2. ชื่อ นามสกุล ผศ.ดร. สิริวดี ชมเดช
สถานที่ทำงาน ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
โทรศัพท์ 086-9143228 โทรสาร
e-mail siriwadee@yahoo.com
3. ชื่อ นามสกุล อ.น.สพ. เฉลิมชาติ สมเกิด
สถานที่ทำงาน คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
โทรศัพท์ 053-948015, 053-948055 โทรสาร 053-948015
e-mail nibivet@yahoo.com
4. ชื่อ นามสกุล น.สพ.ทวีโชค อังควานิช
สถานที่ทำงาน สถาบันคชบาลแห่งชาติ องค์การอุตสาหกรรมป่าไม้
โทรศัพท์ 083-1520001 โทรสาร
e-mail taweepoke@gmail.com
5. ชื่อ นามสกุล นางสาว สุรชาติพย์ เดชชัยศรี
สถานที่ทำงาน ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
โทรศัพท์ โทรสาร
e-mail sdejchaisri@yahoo.com
6. ชื่อ นามสกุล รศ.ดร. ดาวรุ่ง กังวานพงศ์
สถานที่ทำงาน ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
โทรศัพท์ โทรสาร

4. สรุปโครงการวิจัย

การนำช้างคืนสู่ธรรมชาติ เป็นอีกหนึ่งความพยายามเพื่อช่วยแก้ปัญหาช้างไม่มีงานทำและนำมาเร่ร่อนในเมืองใหญ่ และมีความเป็นเอกลักษณ์ที่ยังไม่มีผู้ใดทำมาก่อน โดยช้างที่นำมาคืนสู่ธรรมชาติเป็นช้างที่มาจากหลากหลายพื้นที่ของประเทศไทย ซึ่งช้างเหล่านี้มีพฤติกรรมที่แตกต่างกันไปเฉพาะตัว ความสามารถในการอยู่ร่วมกันหรือการจับกลุ่มเข้าเป็นโขลงเดียวกันย่อมแตกต่างกันไปตามลักษณะของช้างแต่ละตัวเช่นเดียวกัน การตรวจหาความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) และความสัมพันธ์ทางด้านพันธุกรรม (genetic relatedness) ในสัตว์นั้นมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการจัดการด้านพันธุกรรมในสัตว์นั้น ๆ โดยเฉพาะสัตว์ที่ประชากรขนาดเล็ก จากการศึกษาทางด้านความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและพฤติกรรมตามธรรมชาติของช้างเอเชียพบว่า ช้างป่าที่อยู่ในโขลงเดียวกันที่มีแม่แปรง (matriarch) เป็นผู้นำจะอยู่ในกลุ่มทางพันธุกรรม (haplotype) ที่มาจากสายแม่เดียวกัน ซึ่งสามารถศึกษาโดยใช้ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ (mitochondrial DNA) นอกจากนี้ช้างป่าโตเต็มวัยเพศเมียที่อยู่ในแต่ละโขลงจะมีความสัมพันธ์ทางด้านพันธุกรรมทางเครือญาติแบบใกล้ชิด โดยใช้ nuclear microsatellite DNA โดยช้างเพศเมียในโขลงมีความสัมพันธ์แบบเครือญาติทุกตัว ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความเข้ากันได้ และการรวมฝูงของช้างในโครงการคืนช้างสู่ธรรมชาติ โดยใช้ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมเป็นเครื่องมือ

ผลการศึกษาที่ได้ คือ ลักษณะการจับกลุ่มของช้างที่ไม่ได้มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมสายแม่ และ ความสัมพันธ์ทางเครือญาติ แต่จะมีการจับกลุ่มกันโดยมีลูกช้างเป็นศูนย์กลาง และบางครั้งช้างบางตัวอาจแยกอยู่โดดเดี่ยวโดยไม่รวมกลุ่มกับช้างตัวอื่น อย่างไรก็ตามการวางแผนการจัดกลุ่มของช้างที่คืนสู่ธรรมชาติ โดยการนำช้างที่มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมทางสายแม่ และ ความสัมพันธ์ของเครือญาติใกล้ชิดกันนำมารวมกลุ่มกันจะมีโอกาสที่ช้างตัวนั้นจะจับกลุ่มกับกันเป็นไปได้อย่างสูง โดยเป็นการสร้างกลุ่มใหม่ของช้างที่ใกล้เคียงกับธรรมชาติ และ เป็นการลดภาระในการติดตามพฤติกรรมช้างของเจ้าหน้าที่อีกด้วย

นอกจากนี้การวิเคราะห์ทางพันธุกรรมจะเป็นข้อมูลพื้นฐานลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) ของช้างแต่ละตัว ทำให้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ทางนิติวิทยาศาสตร์ได้ในอนาคตเนื่องจากช้างที่คืนสู่ธรรมชาติแล้วโอกาสเกิดดีเอ็นเออีกครั้งทำได้ยาก ผลที่ได้จากการวิเคราะห์ค่าทางพันธุกรรมทำให้สามารถทราบค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของกลุ่มประชากรช้างที่คืนสู่ธรรมชาติ ซึ่งจะเป็นตัวบ่งชี้ว่าช้างที่ปล่อยคืนสู่ป่าในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าทั้ง 2 แห่งมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง และ โอกาสที่จะเกิดภาวะเลือดชิดต่ำในกลุ่มประชากรทั้งสองนี้ โดยหลักการสร้างประชากรของสัตว์ที่คืนสู่ธรรมชาติควรมีความหลากหลายสูง และสารพัดความหลากหลายทางพันธุกรรมนี้ต่อไปได้อีกอย่างน้อย 100 ปี จึงนับว่าเป็นความสำเร็จอีกอย่างหนึ่งของการคืนสัตว์สู่ธรรมชาติ

รายงานผลโครงการ การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและพฤติกรรมของช้างที่ปล่อยคืนสู่ธรรมชาติ (Genetic relatedness and behaviors of releasing Asian elephants (*Elephas maximus*) in the elephant reintroduction project)

หลักการและเหตุผล

มูลนิธิคืนช้างสู่ธรรมชาติจัดทำโครงการคืนช้างสู่ธรรมชาติ เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าซับลังกา จังหวัดลพบุรี เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าดอยผาเมือง จังหวัดลำปาง และ เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูพาน จังหวัดสกลนครซึ่งเป็นพื้นที่โครงการฯ ที่มีการนำช้างเข้ามาปรับพฤติกรรม โดยช้างที่นำมาคืนสู่ธรรมชาติเป็นช้างที่มาจากหลากหลายพื้นที่ของประเทศไทย ซึ่งช้างเหล่านี้มีพฤติกรรมที่แตกต่างกันไปเฉพาะตัว ความสามารถในการอยู่ร่วมกันหรือการจับกลุ่มเข้าเป็นโขลงเดียวกันย่อมแตกต่างกันไปตามลักษณะของช้างแต่ละตัวเช่นเดียวกัน โดยเฉพาะช้างเพศเมียและลูกช้างจะมีความสามารถในการอยู่ร่วมกันได้มากกว่าในการจัดการของมูลนิธิคืนช้างสู่ธรรมชาติ ถ้าสามารถจัดกลุ่มช้างให้รวมเข้าเป็นโขลงเดียวกันได้ จะลดภาระการดูแลและการจัดการของเจ้าหน้าที่ได้มาก เนื่องจากไม่ต้องมีการเฝ้าระวังพื้นที่ของช้างแต่ละกลุ่ม ดังนั้นการศึกษาหาความสัมพันธ์ของการจัดกลุ่มของช้างโดยใช้เครื่องมือทางชีวโมเลกุลจึงเป็นวิธีหนึ่งที่จะช่วยลดภาระของบุคลากรในการควบคุมและจัดการช้างซึ่งส่วนมากเป็นช้างที่ถูกปล่อยเป็นอิสระแบบสมบูรณ์

การตรวจหาความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) และความสัมพันธ์ทางด้านพันธุกรรม (genetic relatedness) ในสัตว์นั้นมีความสำคัญ อย่างยิ่งต่อการจัดการด้านพันธุกรรมในสัตว์นั้น ๆ โดยเฉพาะสัตว์ที่ประชากรขนาดเล็ก ขาดการเคลื่อนย้ายระหว่างกลุ่มประชากรหรือมีการแลกเปลี่ยนทางพันธุกรรมที่ต่ำ เช่น สัตว์สวนสัตว์ หรือ สัตว์ที่มีจำนวนประชากรในกลุ่มน้อยเช่น ช้าง ที่มีการกระจายอยู่เป็นกลุ่มเล็ก ๆ ทั้งช้างเลี้ยงและช้างป่า โดยประชากรช้างแต่ละกลุ่มอยู่ห่างกันมาก ไม่มีการเคลื่อนย้ายหรือมีการเปลี่ยนแปลงจำนวนของประชากรมากนัก ซึ่งการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและของสัตว์ในแต่ละกลุ่มจะสามารถช่วยประเมินความสำคัญทางอนุรักษของสัตว์กลุ่มนั้นได้

วิธีการที่จะตรวจหาความหลากหลายทางพันธุกรรมนั้นในปัจจุบันเป็นการศึกษาในระดับของดีเอ็นเอและระดับเบสบนสายของดีเอ็นเอ ที่สามารถบอกหรืออธิบายถึงรายละเอียดต่างได้มากและเป็นอย่างดีในคำทางพันธุศาสตร์ต่าง ๆ เช่น polymorphic loci, heterozygosity และ genetic variation เป็นต้น โดยอาศัยวิธีการสกัดดีเอ็นเอ การขยายปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยวิธีทางอณูชีววิทยาที่ชื่อว่า Polymerase Chain Reaction (PCR) และการแยกหาลำดับเบสบนสายของดีเอ็นเอ นั้น โดยดีเอ็นเอที่ทำการศึกษาคือ Mitochondrial DNA (mtDNA) ซึ่ง mtDNA มีคุณสมบัติที่เหมาะสมหลายประการ คือ 1) มีปริมาณของสำเนาดีเอ็นเอมากในหนึ่งเซลล์ 2) มีการถ่ายทอดผ่านทางแม่เท่านั้น (maternal inheritance) 3) มีอัตราการเกิดวิวัฒนาการและมี polymorphism ที่สูง และ 4) มีการเกิดการกลายพันธุ์ (mutation) ได้สูง โดยเทียบกับ Nuclear DNA แต่ส่วน Microsatellite ของ nuclear DNA นั้นเป็นที่นิยมใช้ในการจำแนกตัวบุคคลโดยเฉพาะในกรณีการพิสูจน์ความเป็นพ่อแม่ลูก ทั้งนี้ทั้งนั้นเพื่อนำมาหาคำทางพันธุศาสตร์ต่าง ๆ และใช้ประโยชน์ในการจัดการด้านพันธุกรรมและการผสมพันธุ์ช้างเลี้ยงของไทยที่ถูกต้องเหมาะสมต่อไป โดยเฉพาะในเรื่องของการอนุรักษ์ช้าง

จากการศึกษาทางด้านความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและพฤติกรรมตามธรรมชาติของช้างเอเชียพบว่า ช้างป่าที่อยู่ในโขลงเดียวกันที่มีแม่แปรง (matriarch) เป็นผู้นำ จะอยู่ในกลุ่มทางพันธุกรรม (haplotype) ที่มาจากสายแม่เดียวกัน ซึ่งสามารถศึกษาโดยใช้ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ (mitochondrial DNA) (Fernando and Lande, 2000) ช้างป่าโตเต็มวัยเพศเมียที่อยู่ในแต่ละโขลงจะมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมตั้งแต่ 0.16 – 0.37 โดยใช้ nuclear microsatellite DNA ซึ่งมีความละเอียดกว่าแบบแรก โดยช้างเพศเมียในโขลงมีความสัมพันธ์แบบเครือญาติทุกตัว (Vidya and Sukumar, 2005) ซึ่งมีรายงานลักษณะความสัมพันธ์แบบเดียวกันจากการศึกษาในช้างป่าประเทศเวียดนาม (Vidya et al., 2007) และ สาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว (Ahlering et al., 2011) ในช้างป่าอาฟริกาพบว่าช้างในโขลงเดียวกันจะอยู่ในกลุ่มทางพันธุกรรม (haplotype) ที่มาจากสายแม่เดียวกัน และ มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมแบบเครือญาติเช่นเดียวกัน โดยช้างต่างโขลงสามารถเข้าร่วมกลุ่มชั่วคราวได้ง่ายเมื่อช้างแม่แปรงมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้เคียงกัน หรือ ช้างในกลุ่มมีความสัมพันธ์ทางไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอในกลุ่มเดียวกัน (Archie et al., 2006) ในส่วนของการผสมพันธุ์ พบว่าช้างเพศผู้มักจะเลี้ยงการ

ผสมพันธุ์ช้างเพศเมียที่มีความสัมพันธ์ทางเครือญาติ และ มาจากสายแม่เดียวกัน (Archie et al., 2007) อย่างไรก็ตาม การศึกษาตั้งที่ยกตัวอย่างมาเป็นการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและพฤติกรรมของช้างตามธรรมชาติ แต่ในการทำงานของมูลนิธิคีนันช้างผู้ธรรมชาติเป็นการนำช้างจากต่างครอบครัว ต่างสถานที่มาอยู่รวมกัน ซึ่งยังไม่ได้มีการศึกษามาก่อน ดังนั้นถ้าเราสามารถศึกษาความสัมพันธ์ของการจับกลุ่มของช้างโดยใช้ข้อมูลทางพันธุกรรมในการศึกษา คือ กลุ่มทางพันธุกรรม (haplotype) ที่มาจากสายแม่โดยใช้ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอในการศึกษา และ ความสัมพันธ์ทางด้านพันธุกรรม (genetic relatedness) โดยใช้ nuclear microsatellite DNA ในการศึกษา เราจะสามารถเข้าใจกลไกทางพันธุกรรมที่มีส่วนเกี่ยวข้องในการแสดงพฤติกรรมของช้าง ซึ่งไม่เพียงแต่จะเป็นประโยชน์ต่อการทำงานของคีนันช้างผู้ธรรมชาติ แต่จะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการจัดการช้างบ้านและช้างป่าต่อไป

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาความเข้ากันได้ และการรวมฝูงของช้างในโครงการคีนันช้างผู้ธรรมชาติ โดยใช้ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมเป็นเครื่องมือ

ระเบียบวิธีวิจัย

การวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรม

1. ทำการเก็บตัวอย่างเลือดจำนวน 5 มิลลิลิตร จากเส้นเลือดที่ใบหูของช้างในโครงการคีนันช้างผู้ธรรมชาติ ทำการบันทึกหมายเลขไมโครชิพและตรวจสอบตัวพิมพ์รูปพรรณและบันทึกประวัติด้วยแบบสอบถาม

2. เก็บรักษาตัวอย่างเลือดในสารกันเลือดแข็งตัว Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) ทำการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3. ทำการสกัดดีเอ็นเอจากเลือดด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป Nucleospin (Qiagen) หรือด้วยวิธี Inorganic salting-out (Seielstad *et al.*, 1999)

4. ทำปฏิกิริยา polymerase chain reaction บนตำแหน่ง D-loop (630 bp) ของ mitochondrial DNA ด้วยไพรเมอร์ MDL3 (Forward: 5'-CCCACAATTAATGGGCCCGAGCG-3') และ MDL5 (Reverse: 5'-TTACATGAATTGGCAGCCAACCAG-3') (Fernando et al., 2000)

6. ทำการตรวจสอบตัวอย่างด้วย Microsatellites primers จำนวน 12 คู่: FH60, FH94 (Comstock et al., 2000) LafMS03, LafMS05, LafMS06, LafMS08 (Nyakaana and Arctander, 1998; Nyakanaa et al., 2005) ซึ่งได้รับการประเมิน และ ตรวจสอบแล้วในช้างเอเชีย (Thitaram et al., 2008) นอกจากนี้ยังเพิ่มเติมด้วยไพรเมอร์ EMU04, EMU07, EMU12, EMU14, EMU15, EMU17 (Kongrit et al., 2008)

7. ไพรเมอร์เหล่านี้ถูกนำมาใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเป้าหมายใน 25 ul reaction volumes ที่ประกอบด้วย Supertaq 10X buffer 2.5 ul, 5 mM dNTP 1 ul, 5 pmol (1 ul) ของแต่ละ primer (forward and reverse primer), 0.4 U (0.25 ul) of Supertaq DNA polymerase, 1 ul (50ng) of extracted DNA and 18.25 ul of MQ water. ขั้นตอนในปฏิกิริยาประกอบด้วย predenature ที่ 94°C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเข้าสู่รอบของการเพิ่มขึ้นส่วนของดีเอ็นเอ จำนวน 40 รอบ เริ่มจาก denature ที่ 94°C เป็นเวลา 30 วินาที annealing ตามอุณหภูมิแล้วแต่ที่ไพรเมอร์แต่ละคู่กำหนดเป็นเวลา 30 วินาที extension 72°C 30 วินาที และเมื่อครบจำนวนรอบ อุณหภูมิจะเข้าสู่ขั้นตอนของ final extension ที่ 72°C เป็นเวลา 5 นาที PCR products ที่ได้ทำการตรวจสอบด้วย 1% agarose gel electrophoresis ทำปฏิกิริยา PCRs ด้วยเครื่อง Peltier Thermal Cycler 220

7. การวิเคราะห์ Mitochondrial DNA: ตรวจสอบ polymorphism ของ PCR products ที่ได้ด้วยเทคนิค polyacrylamide gel electrophoresis PCR products จะติดสลาด้วยสารฟลูออเรสเซนต์จาก ABI Prism® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing ready Reaction Kits (Applied Biosystem; USA) โดยใช้ primer MDL3 ทำการส่งหาลำดับเบสที่หน่วยบริการชีวภาพ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ลำดับเบสที่ได้จะทำการวิเคราะห์ด้วย

โปรแกรม LaserGene biocomputing software package (DNASTAR, 1994; USA) การวิเคราะห์กลุ่มของตัวอย่าง (haplotype) จะใช้ program TCS version 1.21 (Clement et al., 2000) และทำ phylogenetic tree ด้วย program MEGA 5.0 (Tamura et al., 2011)

8. การวิเคราะห์ Microsatellite บน chromosomal DNA: PCR products จะถูกนำไปวิเคราะห์ด้วย Gene Scan or fragment analysis ด้วยเครื่อง ABI 3130 (Applied Biosystem; USA) จากนั้นทำการวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้ด้วยโปรแกรม GeneMapper® (Applied Biosystem; USA) จำนวนอัลลีลต่อตำแหน่ง (Number of alleles per locus) ขนาดของอัลลีล (allele size range) ความหลากหลายทางพันธุกรรม (observed (H_o) and expected (H_e) heterozygosity from Hardy-Weinberg equilibrium) จะถูกคำนวณด้วยโปรแกรม Excel Microsatellite Toolkit (Park, 2001) linkage disequilibrium (Fisher's method) จะถูกคำนวณด้วยโปรแกรม GenePop (Raymond and Rousset, 1995) ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของช้างแต่ละตัวจะถูกคำนวณด้วยโปรแกรม ML-Relate (Kalinowski et al., 2006)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางพฤติกรรม

1. ช้างในโครงการคินช้างสุธรรมชาติ หลังจากถูกปล่อยคืนสู่ป่าแล้วจะได้ถูกติดตามเพื่อสังเกตพฤติกรรมและการปรับตัวเข้าสู่สภาพแวดล้อม โดยความรู้อ้างและเจ้าหน้าที่ของมูลนิธิจะได้เข้าติดตามสังเกตพฤติกรรมสัปดาห์ละ 1 ครั้ง
2. การติดตามฝูงช้างในทุกๆเดือนจะสามารถสังเกตการรวมกลุ่มและการเข้ากันได้ของช้าง โดยเจ้าหน้าที่จะสังเกตพฤติกรรมของกลุ่มช้าง อย่างน้อย 1 ชั่วโมงต่อกลุ่ม โดยพบลักษณะการรวมกลุ่มดังต่อไปนี้
 - การรวมกลุ่มของช้างเป็นโขลงเดียวกัน ช้างจะมีพฤติกรรมการเดิน การหากินไปด้วยกัน โดยมีแยกกันหากินมีระยะไม่เกิน 50 เมตร โดยจะใช้เวลาอยู่ด้วยกันตลอดช่วงเวลาที่ทำการสังเกตพฤติกรรม เมื่อมีเสียงสัญญาณจากแม่แปรง (แม่ช้างที่เป็นจ่าโขลง) ก็จะกลับมารวมกัน
 - การติดตามอย่างห่างๆ ช้างจะมีพฤติกรรมตาม อีกกลุ่มหนึ่งอย่างห่างๆ เป็นระยะทางประมาณ 100 เมตร โดยที่ไม่มีการเข้ามาใกล้มากกว่านั้น แต่เมื่อช้างอีกกลุ่มเดินทางไปหากินอีกที่ ช้างกลุ่มนี้ (หรือตัวนี้) ก็จะติดตามกลุ่มไปห่างๆ โดยสามารถสังเกตได้ตลอดระยะเวลาที่ทำการติดตามพฤติกรรม
 - การแยกกลุ่มของช้าง ช้างจะมีการแยกกลุ่มจากกัน โดยมีระยะหากินห่างกันมากกว่า 1,000 เมตร และไม่มีการมารวมกลุ่มกัน ซึ่งอาจจะแยกได้เป็น 2 โขลง หรือ แยกเป็นช้างที่หากินตามลำพัง
3. ช้างแต่ละตัวจะได้ถูกบันทึกพฤติกรรมเฉพาะตัว และ การรวมกลุ่ม โดยเปรียบเทียบกับช้างตัวอื่นในโขลงหรือนอกโขลง ตามลักษณะพฤติกรรม 3 แบบที่กล่าวไปแล้วในข้างต้น
4. ข้อมูลทางพฤติกรรมการรวมกลุ่มของแต่ละตัว และ ข้อมูลทางพันธุกรรม โดยเฉพาะความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมแบบเครือญาติ (pairwise genetic relatedness) และ ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมสายแม่ (mitochondrial DNA haplotype) จะถูกนำมาเปรียบเทียบ และคำนวณโดยวิธีสถิติเชิงพรรณนา

9. ผลการศึกษา

การเก็บตัวอย่างดีเอ็นเอของช้างในโครงการ

การเก็บตัวอย่างดีเอ็นเอของช้างในโครงการสามารถแสดงได้ดังตารางที่ 1 โดยที่ช้างบางตัวไม่สามารถเก็บเลือดเพื่อสกัดดีเอ็นเอได้เนื่องจากช้างปล่อยคืนสู่ป่าไปแล้ว หรือบางตัวที่สามารถเก็บได้แต่เกิดปัญหาทางเทคนิคห้องปฏิบัติการทำให้ไม่สามารถสกัดได้ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพ

ตารางที่ 1 แสดงจำนวนตัวอย่างดีเอ็นเอของช้างในโครงการที่ใช้ในงานวิจัย

	จำนวนช้างทั้งหมด	จำนวนช้างที่ยังมีชีวิตทั้งหมด	จำนวนตัวอย่างดีเอ็นเอที่เก็บได้	จำนวนตัวอย่างดีเอ็นเอที่เก็บได้ของช้างที่ยังมีชีวิตอยู่
เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าดอยผาเมือง จังหวัดลำปาง	84	39	36	30
เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง จังหวัดอุทัยธานี	34	26	27	26
อุทยานแห่งชาติภูพาน จังหวัดสกลนคร	7	6	2	2
รวม	125	71	65	58

พฤติกรรมการรวมกลุ่มของช้าง

พฤติกรรมการรวมกลุ่มของช้างในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง และ เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าดอยผาเมืองระหว่างเดือนมิถุนายน 2554 – พฤษภาคม 2555 สามารถแสดงได้ตามตารางที่ 2 และ 3 ตามลำดับ

ตารางที่ 2 แสดงพฤติกรรมการรวมกลุ่มของช้างในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง

กลุ่มที่	มิถุนายน 2554	กรกฎาคม 2554	สิงหาคม 2554	กันยายน 2554	ตุลาคม 2554	พฤศจิกายน 2554	ธันวาคม 2554	มกราคม 2555	กุมภาพันธ์ 2555	มีนาคม 2555	เมษายน 2555	พฤษภาคม 2555
1	พังดาว สึดโตเรมอน พังนาร์ก พังหัวดี พลายฉลาด	พังดาว สึดโตเรมอน พังนาร์ก พังหัวดี พลายฉลาด	พังดาว สึดโตเรมอน พังนาร์ก พังเดือน พังโตเรมี พังทองคำ	พังดาว สึดโตเรมอน พังนาร์ก พังเดือน พังโตเรมี พังทองคำ พังป้อมแป้ม พังน้องใหม่	พังดาว สึดโตเรมอน พังนาร์ก พังเดือน พังโตเรมี พังทองคำ พังป้อมแป้ม พังน้องใหม่	พังดาว สึดโตเรมอน พังนาร์ก พังเดือน พังโตเรมี พังทองคำ พังป้อมแป้ม พังน้องใหม่	พังดาว สึดโตเรมอน พังนาร์ก พังเดือน พังโตเรมี พังจาร์ณี					
2								พังเดือน พังโตเรมี สึดโตเรมอน	พังเดือน พังโตเรมี พังจาร์ณี	พังเดือน พังโตเรมี พังจาร์ณี	พังเดือน พังโตเรมี	พังเดือน พังโตเรมี พังดอกขาว พังน้องเมย์ พังน้องเบิ้ล
3	สึดสุทิน พังแม่บุญแก้ว พังพรชิตา พังเดือน พังป้อมแป้ม	สึดสุทิน พังแม่บุญแก้ว พังพรชิตา	สึดสุทิน พังแม่คำมูล	สึดสุทิน พังแม่คำมูล	สึดสุทิน พังแม่คำมูล	สึดสุทิน พังลำปาง พังแม่คำมูล	สึดสุทิน พลายศรีสาคร พังหัวดี พลายฉลาด พังทองคำ พังป้อมแป้ม พังน้องใหม่	สึดสุทิน พลายศรีสาคร พังหัวดี พลายฉลาด พังทองคำ พังป้อมแป้ม พังน้องใหม่ สึดสุทิน พังดาว พังนาร์ก พังจาร์ณี	สึดสุทิน พังหัวดี พลายฉลาด พังทองคำ พังป้อมแป้ม พังน้องใหม่ สึดสุทิน พังดาว พังนาร์ก สึดโตเรมอน	สึดสุทิน พังหัวดี พลายฉลาด พังทองคำ พังป้อมแป้ม พังน้องใหม่ สึดสุทิน พังดาว พังนาร์ก สึดโตเรมอน	สึดสุทิน พังป้อมแป้ม พังน้องใหม่ สึดสุทิน พังดาว พังนาร์ก สึดโตเรมอน	สึดสุทิน พังป้อมแป้ม พังน้องใหม่ สึดสุทิน พังดาว พังนาร์ก สึดโตเรมอน
4			พังแม่บุญแก้ว พังจาร์ณี	พังแม่บุญแก้ว พังจาร์ณี	พังแม่บุญแก้ว พังพรชิตา พังจาร์ณี	พังแม่บุญแก้ว พังพรชิตา พังจาร์ณี	พังแม่บุญแก้ว พังพรชิตา	พังแม่บุญแก้ว พังพรชิตา	พังแม่บุญแก้ว พังพรชิตา	พังแม่บุญแก้ว พังพรชิตา	พังแม่บุญแก้ว พังพรชิตา	พังแม่บุญแก้ว พังพรชิตา
5			พังหัวดี พลายฉลาด								พังหัวดี พลายฉลาด พังทองคำ	พังหัวดี พลายฉลาด พังทองคำ

6		ฟังป้อมแป้ม ฟังน้องใหม่ สืตอสมชาย สืตอสุทัศน์์	ฟังป้อมแป้ม ฟังน้องใหม่									
7	ฟังดอกขาว ฟังน้องเมย์ ฟังน้องเปิ้ล	ฟังดอกขาว ฟังน้องเมย์	ฟังดอกขาว ฟังน้องเมย์	ฟังดอกขาว ฟังน้องเมย์ ฟังน้องเปิ้ล	ฟังดอกขาว ฟังน้องเมย์ ฟังน้องเปิ้ล	ฟังดอกขาว ฟังน้องเมย์ ฟังน้องเปิ้ล	ฟังดอกขาว ฟังน้องเมย์ ฟังน้องเปิ้ล	ฟังดอกขาว ฟังน้องเมย์ ฟังน้องเปิ้ล สืตอสมชาย	ฟังดอกขาว ฟังน้องเมย์ ฟังน้องเปิ้ล สืตอสมชาย	ฟังดอกขาว ฟังน้องเมย์ ฟังน้องเปิ้ล สืตอสมชาย	ฟังดอกขาว ฟังน้องเมย์ ฟังน้องเปิ้ล	
8	ฟังลำปาง ฟังแม่คำมูล	ฟังลำปาง ฟังเดือน	ฟังลำปาง ฟังใหญ่				ฟังลำปาง ฟังแม่คำมูล	ฟังลำปาง ฟังแม่คำมูล	ฟังลำปาง ฟังแม่คำมูล	ฟังลำปาง ฟังแม่คำมูล	ฟังลำปาง ฟังแม่คำมูล สืตอสมชาย ฟังวาสนา	ฟังลำปาง ฟังแม่คำมูล สืตอสมชาย ฟังวาสนา
9	ฟังใหญ่ ฟังจาร์ณี	ฟังใหญ่ ฟังจาร์ณี		ฟังใหญ่							ฟังจาร์ณี	ฟังจาร์ณี และ ลูก
10	สืตอสมรักษ์ ฟังน้องเปิ้ล	สืตอสมรักษ์ ฟังน้องเปิ้ล	สืตอสมรักษ์ ฟังพรชิตา	สืตอสมรักษ์ ฟังพรชิตา สืตอสมชาย	สืตอสมรักษ์	สืตอสมรักษ์	สืตอสมรักษ์					
11	พलयชุมพล	พलयชุมพล ฟังแม่คำมูล	พलयชุมพล	พलयชุมพล ฟังลำปาง	พलयชุมพล ฟังลำปาง	พलयชุมพล	พलयชุมพล	พलयชุมพล	พलयชุมพล	พलयชุมพล	พलयชุมพล	พलयชุมพล
12	พลายศรีสาคร	พลายศรีสาคร	พลายศรีสาคร	พลายศรีสาคร ฟังหัวดี พलयฉลาด	พลายศรี สาคร ฟังหัวดี พलयฉลาด	พลายศรีสาคร ฟังหัวดี พलयฉลาด			พลายศรีสาคร	พลายศรี สาคร	พลายศรี สาคร	พลายศรีสาคร
13	สืตอสมชาย	สืตอสมชาย	สืตอสมชาย		สืตอสมชาย	สืตอสมชาย	สืตอสมชาย					
14	สืตอสุทัศน์์		สืตอสุทัศน์์	สืตอสุทัศน์์	สืตอสุทัศน์์	สืตอสุทัศน์์	สืตอสุทัศน์์					
15				ฟังวาสนา	ฟังวาสนา	ฟังวาสนา	ฟังวาสนา	ฟังวาสนา	ฟังวาสนา	ฟังวาสนา		
16								ฟังนิตหนอย	ฟังนิตหนอย	ฟังนิตหนอย		

ตารางที่ 3 แสดงพฤติกรรมการรวมกลุ่มของช่างในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าดอยผาเมือง

[illegible]

ผลการวิเคราะห์ทางพันธุกรรม ณ ตำแหน่ง D-loop ของ mitochondrial DNA

จากผลการวิเคราะห์กลุ่มทางพันธุกรรม (haplotype analysis) ณ ตำแหน่ง D-loop ของ mitochondrial DNA ของช้างแต่ละตัว สามารถแสดงได้ตามตารางที่ 4 และการทำ phylogenetic tree ตามภาพที่ 1

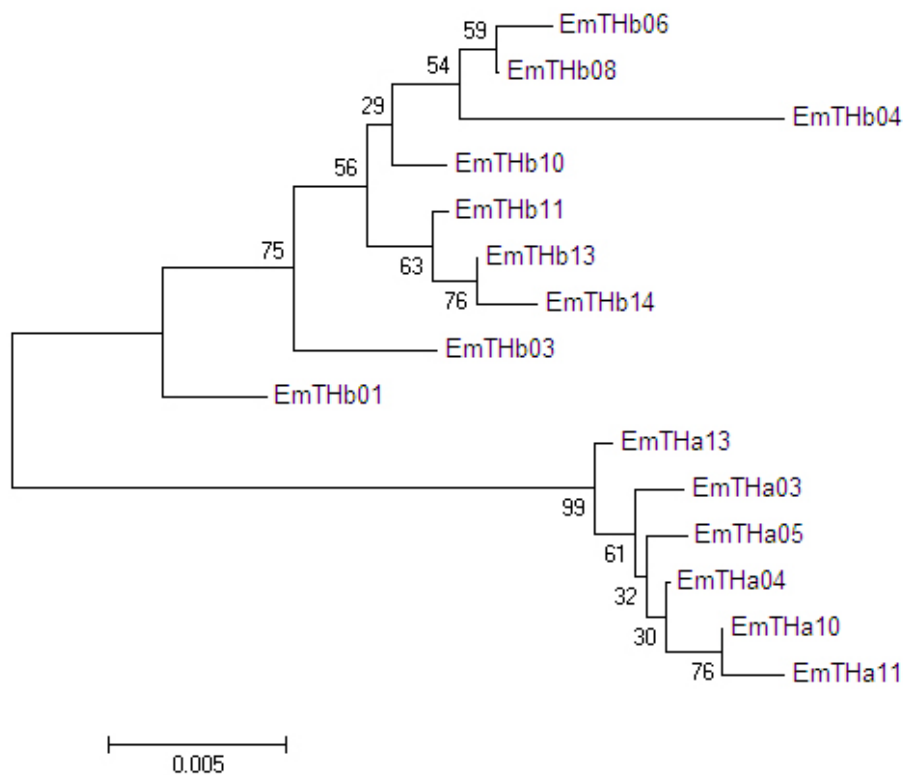
ตารางที่ 4 แสดงผลการวิเคราะห์ทางพันธุกรรม ณ ตำแหน่ง D-loop ของ mitochondrial DNA ของช้าง

No.	ชื่อ	name	Thai mtDNA D-loop Haplotype	mtDNA D-loop Haplotype (refer to Fernando et al., 2003)
1	พังลีลาศ	Pang Leelas	EmTHa03	AC
2	พังนงนารถ	Pang Nongnart	EmTHa10	AB
3	พังทีนา	Pang Tina	EmTHa13	AH
4	สีดอสมบัติ	Seedor Sombat	EmTHb13	BH
5	สีดอบุญชู	Seedor Boonchoo	EmTHb11	BB/BL
6	พังทองใบ	Pang Thongbai	EmTHa13	AH
7	พังบุญมีน่าน	Pang Boonmeenon	EmTHa10	AB
8	พังงามเนตร	Pang Ngamnate	Failed	Failed
9	พังจินตหรา	Pang Jintara	EmTHa10	AB
10	พังสว่าง	Pang Sawang	EmTHb06	BN
11	พลายสุเมธ	Plai Sumate	EmTHb06	BN
12	พลายพลัง	Plai Palang	EmTHb08	BO
13	พังสุนีย์	Pang Sunee	EmTHb14	BG
14	พังตุ๊กตา	Pang Tukta	EmTHb06	BN
15	พังดวงดาว	Pang Duangdao	EmTHb08	BO
16	พังน้ำฝน	Pang Namfon	EmTHa13	AH
17	พังน้ำโชค	Pang Namchoke	EmTHa13	AH
18	พลายสมนึก	Seedor Somnuek	EmTHa13	AH
19	พลายพัทธ์	Plai Pat	EmTHa13	AH
20	พังมรกต	Pang Morakot	EmTHa04	AD
21	พลายสุขุม	Seedor Sukhum	EmTHb10	BB/BL
22	พังสมศรี	Pang Somsee	EmTHa03	AC
23	พังสมใจ	Pang Somjai	Failed	Failed
24	พังบัวทอง	Pang Buatong	EmTHa04	AD
25	พังบัวเงิน	Pang Buangern1	EmTHb04	TH-B
26	พังดอกกรัก	Pang Dokrak	EmTHa13	AH
27	พังบัวเงิน	Pang Buangern2	EmTHb03	BP

28	สิดอภาร	Seedor Pathorn	EmTHb06	BN
29	สิดอสมรักษ์	Seedor Somrak	EmTHa10	AB
30	พลายตะวัน	Plai Tawan	EmTHb13	BH
31	สิดอดุลย์	Seedor Adul	Failed	Failed
32	พลายอุดม	Plai Udom	EmTHb14	BG
33	พังวาเลนไทน์	Pang Valentine	Failed	Failed
34	สิดอมารวย	Seedor Maruay	EmTHb13	BG
35	พังปานวาด	Pang Panwad	Failed	Failed
36	พังคำแพง	Pang Khampaeng	Failed	Failed
37	สิดอสมชาย	Seedor Somchai	EmTHb01	BQ
38	พังลำไย (พังทองคำ)	Pang Lamyai (Thongkham)	EmTHb13	BH
39	พลายชุมพล	Plai Chumpol	EmTHb13	BH
40	พังหวัดี (แม่)	Pang Huadee	EmTHb11	BB/BL
41	พลายศรีสาคร	Plai Seesakorn	EmTHb01	BQ
42	พังพรชิตา	Pang Pornchita	EmTHb13	BH
43	พังแม่บุญแก้ว	Pang MaeBoonkaew	EmTHb14	BG
44	พังแม่คำมูล	Pang MaeKhammoon	EmTHa05	New TH-A
45	พลายศิลา	Plai Sila	EmTHb13	BH
46	พังใหญ่	Pang Yai	EmTHb04	New TH-B
47	พังโดเรมี (แม่)	Pang Doremee	EmTHb06	BN
48	พังเดือน (แม่)	Pang Duen	EmTHa13	AH
49	พังลำปาง(แม่)	Pang Lampang	EmTHb08	BO
50	พังดู	Pang Du	EmTHa11	New A6
51	พลายฉลาด (ลูก)	Plai Chalard	EmTHb11	BB/BL
52	สิดอสุทัศน์	Seedor Sutas	EmTHb08	BO
53	พังจารุณี	Pang Jarunee	EmTHb11	BB/BL
54	พลายโดราเอมอน (ลูก)	Seedor Doraemon	EmTHb06	BN
55	พังดาว (ลูก)	Pang Dao	EmTHa13	AH
56	พังลูกจารุณี (ชน)	Pang Look Jarunee	EmTHb11	BB/BL
57	พังนิตนอย	Pang Nidnoi	EmTHb01	BQ
58	พังน้องเปิ้ล	Pang Nongple	EmTHb13	BH
59	พังดารา	Pang Dara	Failed	Failed

60	พังสมจิตร (ป้อมแป้ม)	Pang Somjit (Pompam)	EmTHb06	BN
61	พังน้องใหม่	Pang Nongmai	EmTHb06	BN
62	พังนารัก	Pang Narak	EmTHa04	AD
63	พังวาสนา	Pang Wassana	EmTHb10	BW
64	พังดอกขาว (ประหยัด)	Pang Dokkhao (Prayad)	EmTHb10	BW
65	พังบุญมี (น้องเมย์)	Pang Boonmee (May)	EmTHb06	BN

ภาพที่ 1 Neighbor-joining phylogenetic tree based on 600 bp แสดงความสัมพันธ์ของช้างในแต่ละกลุ่มพันธุกรรมสายแม่ (mtDNA haplotype) โดยใช้ program MEGA5. Bootstrap values are indicated at nodes.



ผลการวิเคราะห์ทางพันธุกรรม *microsatellite* 12 ตำแหน่ง

จากการวิเคราะห์ทางพันธุกรรม *microsatellite* 12 ตำแหน่ง ได้ผลตามตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แสดงผลการวิเคราะห์ทางพันธุกรรม *microsatellite* 12 ตำแหน่ง

No.	Name	FH60	FH94	LA2	LafMS03	LafMS05	LafMS06	LafMS08	EMU04	EMU07	EMU14	EMU15	EMU17
1	Pang Leelas	0507	0808	0404	0203	0507	0811	0505	0306	0512	0205	0809	0610
2	Pang Nongnart	0506	0608	0303	0103	0406	0809	0707	0306	0912	0506	0709	0708
3	Pang Tina	0608	0910	0303	0304	0507	0808	0809	0407	1112	0406	0606	0507
4	Seedor Sombat	0606	0809	0404	0404	0406	0911	0405	0305	1111	0203	0606	0205
5	Seedor Boonchoo	0507	0809	0204	0204	0707	0808	0710	0407	0812	0505	0808	0610
6	Pang Thongbai	0506	0811	0303	0304	0808	0408	0505	0104	1111	0203	0708	0205
7	Pang Boonmeen	0507	0710	0203	0505	0406	0607	0505	0104	0911	0607	0408	0406
8	Pang Ngamnate	0607	0709	0103	0404	0506	0408	0405	0202	1012	0608	0608	0405
9	Pang Jintara	0508	0810	0303	0203	0707	1314	0406	0303	0709	0508	0406	0308
10	Pang Sawang	0709	0707	0507	0404	0404	0404	0508	0405	0911	0506	0708	0607
11	Plai Sumate	0608	0608	0509	0304	0304	0304	0607	0507	1013	0607	0708	0507
12	Plai Palang	0505	0810	0708	0303	0406	0709	0708	0404	0912	0507	0405	0105
13	Pang Sunee	0607	0408	0607	0304	0203	0912	0607	0304	0808	0505	0507	0610
14	Pang Tukta	0909	0809	0407	0404	0304	1315	0508	0304	1212	0110	0808	0610
15	Pang Duangdao	0709	0910	0304	0405	0304	0811	0909	0405	0911	0507	0608	0202
16	Pang Namfon	0607	0809	0507	0505	0304	0808	0507	0507	0909	0608	0708	0412
17	Pang Namchoke	0707	0506	0203	0305	0304	1516	0506	0506	1111	0606	0708	0405
18	Pang Sommuek	0507	0508	0304	0405	0607	0213	0709	0306	0512	0506	0506	0105
19	Plai Pat	0506	0506	0509	0505	0406	1314	0608	0909	0912	0506	0306	0610
20	Pang Morakot	0608	0809	0810	0304	0506	0308	0405	0707	1112	0405	0708	0610
21	Plai Sukhum	0606	0708	0203	0405	0608	0809	0506	0304	0911	0508	0808	0205
22	Pang Somsee	0507	0508	0305	0505	0808	1213	0204	0304	1013	0607	0808	0204
23	Pang Somjai	0408	0607	0407	0204	0607	1112	0511	0405	0912	0606	0711	0508
24	Pang Buatong	0305	0708	0404	0405	0606	0811	0505	0405	1116	0506	0808	0606
25	Pang Buangern1	0607	0508	0404	0404	0506	0107	0511	0104	0912	0708	0808	0204
26	Pang Dokrak	0105	0811	0404	0609	0909	0613	0405	0612	0406	0606	0506	0105
27	Pang Buangern2	0607	0508	0404	0508	0506	0809	0511	0104	0912	0809	0909	0204
28	Seedor Pathorn	0203	0405	0304	0405	0102	1112	0405	0709	0104	0607	0105	0610
29	Seedor Somrak	0506	0508	0404	0404	0707	0411	0106	0909	0912	0506	0811	0406
30	Plai Tawan	0606	0509	0204	0505	0707	0607	0405	0406	0104	0103	0708	0912
31	Plai Adul	0507	0508	0102	0304	0506	0607	0405	0304	0305	0405	0000	0709
32	Seedor Udom	0506	0506	0102	0405	0406	0406	0307	0203	0304	0304	0000	1011
33	Pang Valentine	0607	0507	0103	0407	0405	0607	0406	0407	0607	0104	0911	1112
34	Seedor Maruay	0708	0507	0204	0000	0708	0608	0405	0306	0405	0000	0000	0809
35	Pang Panwad	0607	0508	0304	0000	0406	0406	0405	0307	0506	0000	0000	0909
36	Pang Khampaeng	0608	0809	0304	0404	0708	0000	0000	0507	0000	0000	0306	0607
37	Plai Somchai	0608	0808	0202	0405	0608	1112	0405	0505	0406	0405	0509	0306
38	Pang Lamyai (Thongkham)	0606	0508	0404	0304	0606	0607	1112	0607	0506	0508	0404	0304
39	Plai Chumpol	0607	0711	0104	0406	0505	0808	0511	0104	1011	0506	0309	0509
40	Pang Huadee	0606	0708	0104	0505	0606	0708	0511	0404	0909	0505	0909	0406
41	Plai Seesakorn	0708	0808	0406	0405	0607	0708	0404	0307	0914	0405	1010	0312
42	Pang Pornchita	0508	0707	0404	0407	0608	0711	0512	0606	0406	0405	1111	0410
43	Pang	0505	0505	0104	0405	0206	0707	0712	0506	0909	0406	0708	0406

	MaeBoonkaew												
44	Pang Mae Khammoon	0506	0507	0404	0305	0606	0711	0507	0406	0915	0407	0708	0303
45	Plai Sila	0608	0910	0104	0405	0608	0708	0511	0512	1212	0607	0808	0306
46	Pang Yai	0506	0911	0104	0505	0306	0709	1111	0606	1111	0707	0808	0105
47	Pang Doremee	0506	0507	0404	0306	0606	0708	0507	0306	0506	0809	0406	0304
48	Pang Duen	0305	0509	0104	0405	0206	0811	0511	0606	0909	0506	0811	0505
49	Pang Lampang	0508	0511	0104	0505	0606	0711	0505	0909	0812	0607	0809	0306
50	Pang Du	0608	0505	0104	0405	0606	0608	0505	0104	0204	0405	0608	0612
51	Plai Chalard	0506	0508	0404	0505	0306	0611	0505	0808	0305	0104	0105	0912
52	Seedor Sutas	0305	1011	0204	0505	0406	0809	0505	0407	0809	0507	0911	0607
53	Pang Jarunee	0507	0508	0204	0407	0809	0911	0304	0306	0404	0104	0708	1212
54	Seedor Doraemon	0506	0507	0104	0406	0206	0809	0505	0306	0305	0105	0408	0304
55	Pang Dao	0505	0507	0104	0405	0202	0811	0405	0606	0909	0203	0408	0505
56	Pang Look Jarunee	0708	0808	0404	0407	0708	0411	0506	0309	0406	0405	0808	0512
57	Pang Nidnoi	0606	0102	0304	0405	0507	1113	0506	0306	0404	0606	0909	1012
58	Pang Nongple	0305	0507	0404	0304	0404	0613	0505	1010	0404	0506	0202	0709
59	Pang Dara	0405	0309	0203	0405	0304	0213	0405	0405	0405	0406	0708	0406
60	Pang Somjit (Pompam)	0606	0608	0304	0505	0708	0510	0405	0407	0104	0406	0509	0911
61	Pang Nongmai	0508	0708	0404	0405	1010	1112	0505	0406	0406	0607	0506	1212
62	Pang Narak	0708	0811	0404	0203	0607	0411	0405	0909	0507	0204	0708	0610
63	Pang Wassana	0608	0809	0104	0506	0505	0309	0204	0204	0405	0304	0708	0910
64	Pang Dokkhao (Prayad)	0606	0708	0404	0506	0506	0207	0407	0405	0405	0405	0708	1010
65	Pang Boonmee (May)	0507	0508	0203	0708	0306	0407	0506	1011	0606	0304	0809	1212

ผลการคำนวณและวิเคราะห์คุณค่าทางพันธุกรรม (genetics value)

1) ช้างในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าซับลังกา จังหวัดลพบุรี

- ค่าความหลากหลายทางพันธุกรรม (heterozygosity) = 0.7385
- จำนวน mitochondrial DNA 12 haplotype คือ EmTHa04, EmTHa05, EmTHa11, EmTHa13, EmTHb01, EmTHb04, EmTHb06, EmTHb08, EmTHb10, EmTHb11, EmTHb13 และ EmTHb14

2) ช้างในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าดอยผาเมือง จังหวัดลำปาง

- ค่าความหลากหลายทางพันธุกรรม (heterozygosity) = 0.8083
- จำนวน mitochondrial DNA 12 haplotype คือ EmTHa03, EmTHa04, EmTHa10, EmTHa13, EmTHb03, EmTHb04, EmTHb06, EmTHb08, EmTHb10, EmTHb11, EmTHb13 และ EmTHb14

โดยที่ค่าความหลากหลายนี้เป็นตัวบ่งชี้ว่าช้างที่ปล่อยคืนสู่ธรรมชาติในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าทั้ง 2 แห่งมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง และ โอกาสที่จะเกิดภาวะเลือดชิดต่ำในกลุ่มประชากรทั้งสองนี้ (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 6 Summary statistics of genetic variation: observed and expected heterozygosities (H_o and H_e)

Locus	Dye label	Size range (alleles)	Sublanka		Doi Phamuang	
			H_o	H_e	H_o	H_e
FH60	NED	142-160 (9)	0.759	0.754	0.833	0.792
FH94	PET	196-230 (11)	0.793	0.818	0.944	0.814
LA2	VIC	223-241 (10)	0.621	0.573	0.694	0.801
LafMS03	6-FAM	134-152 (9)	0.793	0.721	0.618	0.723
LafMS05 ^a	NED	146-166 (10)	0.621	0.780	0.750	0.844
LafMS06	PET	130-162 (14)	0.931	0.865	0.886	0.896
LafMS08	6-FAM	170-192 (12)	0.689	0.707	0.829	0.814
EMU04 ^a	6-FAM	91-119 (12)	0.655	0.863	0.833	0.850
EMU07 ^a	VIC	91-125 (16)	0.655	0.865	0.829	0.873
EMU14	6-FAM	130-148 (10)	0.897	0.831	0.849	0.830
EMU15 ^a	VIC	136-156 (11)	0.690	0.840	0.719	0.800
EMU17	NED	116-138 (12)	0.759	0.882	0.917	0.900
Average (all)		(11.33)	0.739	0.792	0.808	0.828

^a The locus was not in Hardy-Weinberg equilibrium ($P < 0.05$)

ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของช้างแต่ละตัว

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของช้างแต่ละตัวในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าซับลังกา และ เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าดอยผาเมือง ด้วยโปรแกรม ML-relate สามารถแสดงได้ดังในตารางที่ 7 และ 8 นอกจากนี้ข้อมูลดังกล่าวยังสามารถพยากรณ์ความเป็นพ่อ-แม่-ลูกของช้างที่ปล่อยคืนสู่ธรรมชาติและได้รับการผสมพันธุ์ ตั้งท้อง และคลอดลูก นั่นคือ พังจาร์ณี และ ลูกที่ได้กำเนิดมาดูโลกเมื่อเดือนเมษายน 2555 โดยที่ยังไม่ทราบว่าเป็นพ่อช้างตัวใด ผลการตรวจดีเอ็นเอจากขนและสายสะดือของลูกพังจาร์ณี พบว่าเป็นลูกของสืตอสมรักษ์ที่ระดับความเชื่อมั่น 95.5% ด้วยวิธี exclusion probability

หมายเหตุ: ค่าสหสัมพันธ์ความเกี่ยวข้องทางเครือญาติ (Coefficient of relatedness, r) จะบอกความสัมพันธ์ทางเครือญาติและพันธุกรรมของช้าง 2 เชือก

ถ้า $r = 0.5$ หมายถึง ช้าง 2 เชือก มีความสัมพันธ์แบบ พ่อ-ลูก หรือ แม่-ลูก

$r = 0.25$ หมายถึง ช้าง 2 เชือก มีความสัมพันธ์แบบ พี่-น้อง (อาจพ่อแม่เดียวกัน หรือ คนละพ่อแม่)

หรือ ปู่ย่าตายาย-หลาน

$r = 0.125$ หมายถึง ช้าง 2 เชือก มีความสัมพันธ์แบบ ลูกพี่ลูกน้อง หรือ อาน้า-หลาน

$r = 0$ หมายถึง ช้าง 2 เชือก ไม่มีความสัมพันธ์ทางเครือญาติ

ตารางที่ 7 แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของช้างแต่ละตัวในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าซับลังกา

	SeedorSomchai	PangLamyaiThongkham																									
SeedorSomchai	1																										
PangLamyaiThongkham	0	1																									
PlaiChumpol	0	0	1																								
PangHuadee	0.04	0.09	0.18	1																							
PlaiSeesakorn	0.13	0	0	0	1																						
PangPornchita	0.18	0.16	0	0	0	1																					
PangMaeBoonkaew	0	0.08	0	0.19	0	0.12	1																				
PangMaeKhammoon	0	0.1	0	0.1	0	0.01	0.35	1																			
PlaiSila	0.25	0	0.01	0.14	0.04	0	0.05	0	1																		
PangYai	0	0	0.1	0	0	0	0	0.04	0.2	1																	
PangDoremee	0	0.48	0	0.06	0	0.08	0.09	0.36	0	0	1																
PangDuen	0	0	0.14	0.16	0	0.08	0.28	0	0.1	0.22	0	1															
PangLampang	0.04	0	0	0.08	0	0.07	0.12	0.19	0.35	0.12	0	0	1														
PlaiChalard	0	0.02	0	0	0	0	0	0	0	0.13	0	0	0	1													
SeedorSutas	0	0	0	0.27	0	0	0	0	0.06	0.04	0	0.13	0.27	0	1												
PangJarunee	0.1	0	0	0	0.08	0.06	0	0	0	0	0.02	0	0	0.11	0	1											
SeedorDoraemon	0	0.22	0.07	0.02	0	0	0.06	0.04	0	0	0.48	0.13	0	0.15	0.09	0.06	1										
PangDao	0	0	0	0.08	0	0	0.29	0	0	0.05	0	0.55	0	0	0	0	0.27	1									
PangLookJarunee	0.18	0	0	0	0.21	0.24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.4	0	0	1								
PangNongple	0	0.06	0	0	0	0	0	0.02	0	0	0.02	0.11	0	0.02	0.14	0.02	0.03	0	0	1							
PangDara	0.1	0	0	0.05	0	0	0.26	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.08	1						
PangSomjitPompam	0.1	0	0	0.03	0.04	0	0	0	0	0	0	0	0	0.07	0.1	0	0	0	0.07	0	0.04	1					
PangNongmai	0.18	0	0	0	0	0.13	0	0	0.07	0	0.04	0	0.16	0.07	0	0.05	0	0	0.07	0	0	0	1				
PangNarak	0	0	0	0	0.12	0	0	0.03	0	0	0	0	0.13	0	0	0	0	0	0.29	0	0.06	0	0	1			
PangWassana	0	0	0.1	0	0	0	0.05	0	0.02	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.1	0	0	0.03	1			
PangDokkhaoPrayad	0.05	0	0.04	0.1	0	0.04	0.06	0.21	0	0	0.11	0	0	0	0	0	0	0	0	0.22	0	0	0.08	0.43	1		
PangBoonmeeMay	0.03	0	0	0	0	0	0	0	0	0.03	0	0	0	0.09	0	0.19	0	0	0.29	0	0.07	0	0.05	0	0.06	0	1

ตารางที่ 8 แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของช้างแต่ละตัวในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าดอยผาเมือง

	PangLeelas	PangTina	SeedorSombat	PangJintara	PangSawang	PlaiSumate	PlaiPalang	PangSunee	PangTukta	PangDuangdao	PangNamfon	SeedorSomnuek	PlaiPat	PangMorakot	SeedorSukhum	PangBuangern1	PangDokrak	SeedorPathorn	SeedorSomrak	PlaiTawan	SeedorAdul	PlaiUdom	PangValentine	SeedorMaruay	PangPanwad	PangDu
PangLeelas	1																									
PangTina	0.04	1																								
SeedorSombat	0.07	0.06	1																							
PangJintara	0.07	0.1	0	1																						
PangSawang	0	0	0	0	1																					
PlaiSumate	0	0.19	0	0	0.2	1																				
PlaiPalang	0	0.05	0	0.09	0	0	1																			
PangSunee	0.04	0	0	0	0	0.1	0.17	1																		
PangTukta	0.04	0	0.04	0	0.19	0.04	0	0.1	1																	
PangDuangdao	0.05	0.2	0.25	0	0.22	0.04	0.02	0	0.09	1																
PangNamfon	0	0.05	0	0	0.18	0.21	0	0	0.11	0.16	1															
SeedorSomnuek	0.21	0.09	0	0.08	0	0	0.11	0	0	0.02	0	1														
PlaiPat	0.04	0	0	0.08	0.03	0.08	0.09	0.04	0.04	0	0.02	0.02	1													
PangMorakot	0.11	0.28	0.07	0	0	0.19	0.02	0.08	0.11	0	0.08	0	0.04	1												
SeedorSukhum	0	0	0.21	0.04	0.05	0	0	0	0.06	0.12	0.1	0	0	0	1											
PangBuangern1	0	0	0.02	0	0	0	0.01	0	0.02	0.09	0.07	0	0.01	0.03	0.21	1										
PangDokrak	0	0	0.05	0	0	0	0.07	0	0	0	0	0.21	0	0	0	0	1									
SeedorPathorn	0.04	0	0	0	0	0.04	0	0.14	0.04	0	0	0	0.04	0.1	0	0	0	1								
SeedorSomrak	0.15	0	0.02	0.05	0.01	0	0.01	0	0	0	0	0.03	0.28	0	0	0.23	0	0.05	1							
PlaiTawan	0	0	0.05	0.05	0	0	0	0	0	0	0.1	0	0.02	0.07	0	0	0	0.12	0.05	1						
SeedorAdul	0.14	0	0	0	0	0	0.07	0.05	0	0	0	0.08	0	0.29	0	0.1	0	0	0	0.12	1					
PlaiUdom	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.21	0	0	0	0	0	0	0.13	0.25	1				
PangValentine	0	0.01	0	0.03	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.1	0.23	0.14	1			
SeedorMaruay	0.23	0	0	0.13	0	0	0	0	0	0	0	0.07	0	0	0.15	0	0.05	0	0	0.4	0.36	0	0.07	1		
PangPanwad	0.03	0	0.12	0	0	0	0.01	0	0	0	0	0.09	0.01	0	0	0.08	0.04	0.11	0	0.1	0.36	0.17	0.34	0.33	1	
PangDu	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.1	0	0.11	0	0	0	0.24	0.16	0.19	0.08	0.14	0	1

ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและพฤติกรรม

ช้างที่มีการจับกลุ่มกันจะมีค่าสหสัมพันธ์ความเกี่ยวข้องทางเครือญาติ (Coefficient of relatedness, r) เฉลี่ยอยู่ที่ 0.075 ± 0.14 ในขณะที่ช้างที่แยกตัวอยู่โดดเดี่ยวจะมีค่าสหสัมพันธ์ความเกี่ยวข้องทางเครือญาติเฉลี่ยอยู่ที่ 0.038 ± 0.05 โดยที่ลักษณะกลุ่มทางพันธุกรรมสายแม่ (mitochondrial DNA haplotype) ไม่ได้มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมกับการจับกลุ่ม กล่าวคือ ในแต่ละกลุ่มของช้างมีความหลากหลายของกลุ่มทางพันธุกรรมสายแม่จำนวนมาก

10. สรุปผลและอภิปรายผล

การศึกษาครั้งนี้เป็นการดูความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและพฤติกรรมของช้างที่ปล่อยคืนสู่ธรรมชาติ โดยเน้นที่การจับกลุ่มของช้างที่ถูกปล่อยเป็นอิสระ และ เกิดการเลือกการจับกลุ่มด้วยตัวเอง ซึ่งคณะผู้วิจัยมีสมมติฐานว่าปัจจัยทางพันธุกรรมอาจเป็นส่วนหนึ่งในการเลือกกลุ่ม ซึ่งผลการศึกษาก็สามารถบอกได้ระดับหนึ่งโดยที่ค่าสหสัมพันธ์ความเกี่ยวข้องทางเครือญาติ (coefficient of relatedness, r) ของช้างที่จับกลุ่มกันจะมีค่าสูงกว่าช้างที่แยกตัวอยู่โดดเดี่ยว แต่เมื่อนำผลการวิเคราะห์มาเทียบกับช้างป่าที่อยู่ในโขลงเดียวกันซึ่งมีค่าสหสัมพันธ์ความเกี่ยวข้องทางเครือญาติเฉลี่ยอยู่ที่ 0.37 ± 0.159 ในช้างเอเชีย โดยใช้ microsatellite 6 ตำแหน่ง (Vidya and Sukumar, 2005) และ 0.42 ในช้างแอฟริกา microsatellite 11 ตำแหน่ง (Archie et al., 2006) ก็จะพบว่าน้อยกว่ามาก ค่าสหสัมพันธ์ความเกี่ยวข้องทางเครือญาติที่ได้จากช้างที่รวมกลุ่มกันพบว่ามีค่าแตกต่างค่อนข้างน้อยกับค่าที่ได้จากช้างแอฟริกาที่ถูกล่าและมารวมกลุ่มกันเองหลังจากที่แม่แปรงหรือผู้นำฝูงเพศเมียถูกล่าและลดน้อยลงทำให้ช้างเพศเมียที่อายุน้อยมาจัดกลุ่มกันเองโดยพบว่ามีค่าอยู่ที่ 0.13 ± 0.01 (Gobush et al., 2009) ส่วนลักษณะกลุ่มทางพันธุกรรมสายแม่ (mitochondrial DNA haplotype) ไม่ได้มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมกับการจับกลุ่ม เมื่อเทียบกับรายงานก่อนหน้านี้ในช้างเอเชียที่ช้างในโขลงจะมีพันธุกรรมสายแม่อยู่ในกลุ่มย่อยเดียวกัน (Fernando and Lande, 2000; Vidya and Sukumar, 2005; Vidya et al., 2007; Ahlering et al., 2011)

ลักษณะการจับกลุ่มของช้างที่ไม่ได้มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมสายแม่ และ ความสัมพันธ์ทางเครือญาติของการศึกษาในครั้งนี้เหมือนกับรายงานของช้างแอฟริกาในอุทยานแห่งชาติมิคูมิ ประเทศแทนซาเนีย โดยเฉพาะช้างเพศเมียอายุมากหรือแม่แปรงซึ่งเป็นจำฝูงและมีอายุยาว ที่ถูกล่าจนทำให้โขลงของช้างป่าแตกแยกเพราะไม่มีผู้นำฝูงและเกิดการกระจัดกระจายของลูกโขลง และ เมื่อเมื่อมีการจับกลุ่มกันอีกครั้งจะไม่ได้มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมทั้งทางสายแม่และความสัมพันธ์ทางเครือญาติ (Gobush et al., 2009) มีรายงานลักษณะคล้ายกันที่ช้างในอุทยานแห่งชาติควีนอลิซาเบธ ประเทศเคนยา ที่ช้างที่มาจับกลุ่มกันใหม่มาจากพันธุกรรมสายแม่คนละสายกัน (Nyakaana et al., 2001) ถึงแม้ว่าในช่วงอีกพื้นที่หนึ่งในอุทยานแห่งชาติแอมโบซาลิ ประเทศเคนยาที่ไม่เกิดปัญหาช้างถูกล่า ช้างจะมีการรวมกลุ่มกันโดยเลือกความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมทั้งทางสายแม่เป็นหลัก (Archie et al., 2006) ซึ่งในกรณีของช้างในโครงการคืนช้างสู่ธรรมชาติจะมีลักษณะคล้ายช้างแอฟริกาในกลุ่มแรกมากกว่า เนื่องจากถูกแยกมาฝึกและเลี้ยงดูโดยมนุษย์เป็นเวลานาน และไม่มีอิทธิพลทางพฤติกรรมและการเลือกกลุ่มจากช้างแม่แปรง นอกจากนี้ลักษณะการจับกลุ่มของช้างที่ถูกปล่อยคืนสู่ธรรมชาติในบางกลุ่มจะเป็นแบบหลวมๆ กล่าวคือ การที่สามารถรวมกลุ่มกันเป็นครั้งคราวและสามารถแยกหรือไปรวมกับกลุ่มอื่นได้ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของโขลงช้างแอฟริกาที่ถูกล่า (Gobush et al., 2009)

ลักษณะการจับกลุ่มในสัตว์ชนิดอื่น เช่น ปลาโลมาลาย (striped dolphin; *Stenella coeruleoalba*) ที่การจับกลุ่มกันตามธรรมชาติจะมีความความสัมพันธ์ทางเครือญาติสูงภายในกลุ่มเดียวกันมากกว่าระหว่างกลุ่ม (Gaspari et al., 2007) โดยต่างกับการจับกลุ่มของปลาโลมาธรรมดา (common dolphin; *Delphinus delphis*) ที่จะไม่มีความสัมพันธ์ทั้งทางพันธุกรรมสายแม่และพันธุกรรมทางเครือญาติ โดยจะจับกลุ่มตามลักษณะของ อายุ เพศ และ การเจริญพันธุ์มากกว่า (Viricel et al., 2008) ซึ่งทั้งสองชนิดนี้ต่างกัน ทั้งนี้อาจขึ้นอยู่กับชนิด สภาพพื้นที่ และ สิ่งแวดล้อม โดยมีรายงานว่า ปลาโลมาสามารถจับกลุ่มและจำว่าตัวใดเป็นญาติกันได้จากการส่งเสียงที่มีความถี่สูงออกไป (Moller, 2012)

ในโครงการคืนช้างสู่ธรรมชาติ มีช้างจำนวนหนึ่งที่แยกอยู่อาศัยโดดเดี่ยว โดยไม่เข้าร่วมกับฝูงอื่นซึ่งเมื่อดูความสัมพันธ์ทางเครือญาติแล้วพบว่ามีความคล้ายคลึงน้อยกว่ากลุ่มที่อยู่รวมกัน ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของช้างที่ถูกล่าในแอฟริกาที่ประชากรส่วนใหญ่จะอยู่ตัวเดียว โดยอาจเข้าร่วมโขลงบ้างเป็นครั้งคราว (Gobush and Wasser, 2009) ลักษณะพฤติกรรมที่แยกตัวโดดเดี่ยวนี้เหมือนกับในสัตว์กลุ่มไพรเมตชนิดหนึ่ง คือ ลีเมอร์หนูสีน้ำตาล (gray mouse lemur: *Microcebus murinus*) ที่ตัวเมียที่แยกนอนเดี่ยวไม่ไปรวมกับกลุ่มตัวเมียมอื่นจะมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมแบบเครือญาติต่ำกว่าพวกที่รวมตัวกัน (Radespiel et al., 2001) และ ตัวเมียที่รวมกลุ่มกันจะมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมสายแม่ร่วมกัน (Wimmer et al., 2002)

อย่างไรก็ตามการรวมกลุ่มของช้างในธรรมชาติจะมีความแปรผันตามสภาพสิ่งแวดล้อม โดยจะรวมกลุ่มกันเพื่อหากินในฤดูฝนที่มีอาหารและน้ำสมบูรณ์ และจะแยกเป็นกลุ่มย่อยในฤดูแล้งซึ่งเป็นช่วงเวลาที่หาอาหารและน้ำยาก (Gobush et al., 2009) ซึ่งเป็นการปรับสภาพพฤติกรรมของช้างโดยการรวมกลุ่มจะได้ประโยชน์มากขึ้นในการหาอาหาร อย่างไรก็ตามการรวมกลุ่มนี้ผลประโยชน์ที่ได้รับสูงสุดในช้าง คือ การช่วยกันเลี้ยงลูกช้าง (Fernando and Lande, 2000) ซึ่งพฤติกรรมการรวมกลุ่มโดยมีลูกช้างเป็นศูนย์กลางดังกล่าวพบในช้างที่คืนสู่ธรรมชาติ โดยการนำแม่ช้างและลูกช้างคืนสู่ป่าด้วยกัน การจับกลุ่มของช้างจะทำได้ง่าย หรือ การนำลูกช้างที่ย่านมาแล้วมาคืนสู่ธรรมชาติ แม่ช้างก็จะมารวมกลุ่มดูแลลูกช้างต่อไป

ผลที่ได้จากการวิเคราะห์ค่าทางพันธุกรรมในครั้งนี้ทำให้สามารถทราบค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของกลุ่มประชากรช้างที่คืนสู่ธรรมชาติ ซึ่งจะเป็นตัวบ่งชี้ว่าช้างในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าทั้ง 2 แห่งมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง และ โอกาสที่จะเกิดภาวะเลือดชิดต่ำในกลุ่มประชากรทั้งสองนี้ โดยหลักการสร้างประชากรของสัตว์ที่คืนสู่ธรรมชาติควรมีความหลากหลายสูง และสารพัดความหลากหลายทางพันธุกรรมนี้ต่อไปได้อีกอย่างน้อย 100 ปี จึงนับว่าเป็นความสำเร็จอีกอย่างหนึ่งของการคืนสัตว์สู่ธรรมชาติ

นอกจากนี้การวิเคราะห์ทางพันธุกรรม microsatellite 12 ตำแหน่ง จะเป็นข้อมูลพื้นฐานลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) ของช้างแต่ละตัวทำให้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ทางนิติวิทยาศาสตร์ได้ในอนาคตเนื่องจากช้างที่คืนสู่ธรรมชาติแล้วโอกาสเกิดดีเอ็นเออีกครั้งทำได้ยาก เช่น การพิสูจน์ช้างที่เสียชีวิตว่าเป็นช้างตัวใดของมูลนิธิคืนช้างสู่ธรรมชาติ นอกจากนี้ผลจากเก็บข้อมูลพื้นฐานลายพิมพ์ดีเอ็นเอดังกล่าวทำให้สามารถพิสูจน์ความเป็นพ่อ-แม่-ลูกของช้างที่ปล่อยคืนสู่ธรรมชาติ ซึ่งช้างผสมพันธุ์กันในป่าสามารถทราบได้ว่าพ่อของลูกช้างคือตัวใด จากการศึกษาพบว่าลูกช้างที่เกิดจากพันธุกรรม ที่ได้รับการพิสูจน์แล้วว่าเป็นลูกของสัตว์ผสมรักษ์ ช้างเพศผู้ในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง

ผลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้จะเป็นข้อเสนอแนะในการวางแผนการจัดกลุ่มของช้างที่คืนสู่ธรรมชาติ โดยสามารถนำช้างที่มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมทางสายแม่ และ ความสัมพันธ์ของเครือญาติใกล้เคียงกันมารวมกลุ่มกัน โอกาสที่ช้างตัวนั้นจะจับกลุ่มกับกันเป็นไปได้สูง โดยเป็นการสร้างกลุ่มใหม่ของช้างที่ใกล้เคียงกับธรรมชาติ และ เป็นการลดภาระในการติดตามพฤติกรรมช้างของเจ้าหน้าที่อีกด้วย

ในส่วนข้อจำกัดของการทำงาน คือไม่สามารถเก็บตัวอย่างดีเอ็นเอของช้างได้ทุกตัวอย่าง เนื่องจากปล่อยคืนสู่ป่าไปแล้ว เมื่อความดันเดินเข้าใกล้ ช้างจะหนีไป นอกจากนี้เลือดที่เก็บมาได้ เมื่อสกัดดีเอ็นเอได้คุณภาพไม่ดี ไม่สามารถนำมาวิเคราะห์ต่อได้ จึงต้องมีการเก็บเลือดเพิ่มในช้างบางตัวแต่อาจจะลำบากเนื่องจากได้ปล่อยคืนป่าไปแล้ว การตามเก็บจึงยากและไม่มีข้อมูลในส่วนของช้างตัวดังกล่าว

โดยสรุปช้างที่ปล่อยคืนสู่ธรรมชาติโดยการจับกลุ่มโดยจะไม่มีความสัมพันธ์ทางเครือญาติหรือความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมสายแม่มาเกี่ยวข้อง แต่จะมีการจับกลุ่มกันโดยมีลูกช้างเป็นศูนย์กลาง ซึ่งข้อมูลเหล่านี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการจัดการกลุ่มประชากรของช้างได้เพื่อที่สร้างกลุ่มประชากรของช้างที่คืนสู่ธรรมชาติที่ยั่งยืน ซึ่งเป็นอีกวิธีการหนึ่งในการอนุรักษ์ช้างไทย

11. กิตติกรรมประกาศ

ทางคณะผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนงานวิจัย และ มูลนิธิคีนันช้างสู่ธรรมชาติ ที่ให้งบประมาณในการศึกษาในครั้งนี้ ขอขอบคุณคุณรุฐภากร พุ่มเฟื่อย และ คุณพัลลพ ต้นแก้ว นักวิทยาศาสตร์ในการวิเคราะห์ตัวอย่างทางห้องปฏิบัติการ ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่มูลนิธิคีนันช้างสู่ธรรมชาติในเรื่องการเก็บข้อมูลทางพฤติกรรมและตัวอย่าง

12. เอกสารอ้างอิง

- Ahlering, M.A., Hedges, S., Johnson, A., Tyson, M., Schuttler, S.G., Eggert, L.S., 2011, Genetic diversity, social structure, and conservation value of the elephants of the Nakai Plateau, Lao PDR, based on non-invasive sampling. *Conservation Genetics* 12, 413-422.
- Archie EA, Hollister-Smith JA, Poole JH, Lee PC, Moss CJ, Maldonado JE, Fleischer RC, Alberts SC. 2007. Behavioural inbreeding avoidance in wild African elephants. *Mol Ecol* 16(19):4138-4148.
- Archie EA, Moss CJ, Alberts SC. 2006. The ties that bind: genetic relatedness predicts the fission and fusion of social groups in wild African elephants. *Proc Biol Sci* 273(1586):513-522.
- Clement, M., Posada, D., Crandall, K., 2000, TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9, 1657-1659.
- Comstock KE, Wasser SK, Ostrander EA. 2000. Polymorphic microsatellite DNA loci identified in the African elephant (*Loxodonta africana*). *Mol Ecol* 9(7):1004-1006.
- Fernando P, Lande R. 2000. Molecular genetic and behavioral analysis of social organization in the Asian elephant (*Elephas maximus*). *Behavioral Ecology and Sociobiology* 48:84–91.
- Fernando P, Pfrender ME, Encalada SE, Lande R. 2000. Mitochondrial DNA variation, phylogeography and population structure of the Asian elephant. *Heredity* 84 (Pt 3):362-372.
- Gaspari, S., Azzellino, A., Airoidi, S., Hoelzel, A.R., 2007, Social kin associations and genetic structuring of striped dolphin populations (*Stenella coeruleoalba*) in the Mediterranean Sea. *Mol Ecol* 16, 2922-2933.
- Gobush, K., Kerr, B., Wasser, S., 2009, Genetic relatedness and disrupted social structure in a poached population of African elephants. *Mol Ecol* 18, 722-734.
- Gobush, K., Wasser, S., 2009, Behavioural correlates of low relatedness in African elephant core groups of a poached population. *Animal Behaviour* 78, 1079–1086.
- Kalinowski S, AP Wagner A, Taper M. 2006. ML-Relate: a computer program for maximum likelihood estimation of relatedness and relationship. *Molecular Ecology Notes* 6:576-579.
- Kongrit C, Siripunkaw C, Brockelman W, Akkarapatumwong V, Wright T, Eggert L. 2008. Isolation and characterization of dinucleotide microsatellite loci in the Asian elephant (*Elephas maximus*). *Molecular Ecology Resource* 8(1):175-177.
- Moller, L.M., 2012, Sociogenetic structure, kin associations and bonding in delphinids. *Mol Ecol* 21, 745-764.
- Nyakaana, S., Abe, E., Arctander, P., Siegismund, H., 2001, DNA evidence for elephant social behaviour breakdown in Queen Elizabeth National Park, Uganda. *Animal Conservation* 4, 231–237.
- Nyakaana S, Arctander P. 1998. Isolation and characterization of microsatellite loci in the African elephant, *Loxodonta africana*. *Mol Ecol* 7(10):1436-1437.

- Nyakanaa S, Okello JBA, Muwanika V, Siegismund HR. 2005. Six new polymorphic microsatellite loci isolated and characterized from the African savannah elephant genome. *Molecular Ecology Notes* 5:223–225.
- Park, S.D.E., 2001, Trypanotolerance in West African cattle and the population genetic effects of selection. Ph.D. thesis, University of Dublin.
- Radespiel, U., Sarikaya, Z., Zimmermann, E., Bruford, M., 2001, Sociogenetic structure in a free-living nocturnal primate population: sex-specific differences in the grey mouse lemur (*Microcebus murinus*). *Behavioral Ecology and Sociobiology* 50, 493–502.
- Raymond, M., Rousset, F., 1995, GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* 86, 248-249.
- Thitaram C, Thongtip N, Somgird C, Colenbrander B, Boxtel DCJv, Steenbeek Fv, Lenstra JA. 2008. Evaluation and selection of microsatellite markers for an identification and parentage test of Asian elephants (*Elephas maximus*). *Conservation Genetics* 9(4):921-925.
- Vidya TNC, Sukumar R. 2005. Social organization of the Asian elephant (*Elephas maximus*) in southern India inferred from microsatellite DNA. *Journal of Ethology* 23:205–210.
- Vidya, T.N.C., Varma, S., Dang, N.X., Sukumar, T.V.T., 2007, Minimum population size, genetic diversity, and social structure of the Asian elephant in Cat Tien National Park and its adjoining areas, Vietnam, based on molecular genetic analyses. *Conservation Genetics* 8, 1471-1478.
- Vidya, T.N.C., Varma, S., Dang, N.X., Sukumar, T.V.T., 2007, Minimum population size, genetic diversity, and social structure of the Asian elephant in Cat Tien National Park and its adjoining areas, Vietnam, based on molecular genetic analyses. *Conservation Genetics* 8, 1471-1478.
- Seielstad, M., Bekele, E., Lbrahim, M., Toure, A. and Traore, M. 1999. A view of human origins from Y chromosome microsatellite variation. *Genome Research* 9: 58-567
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., and Kumar, S., 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739.
- Viricel, A., Strand, A., Rosel, P., Ridoux, V., Garcia, P., 2008, Insights on common dolphin (*Delphinus delphis*) social organization from genetic analysis of a mass-stranded pod. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 63, 173–185.
- Wimmer, B., Tautz, D., Kappeler, P., 2002, The genetic population structure of the gray mouse lemur (*Microcebus murinus*), a basal primate from Madagascar. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 52, 166–175.

ลงชื่อ.....

(ผศ.น.สพ.ดร. นัตรโชติ ทิตาราม)

คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Genetic relatedness and behaviors of releasing Asian elephants (*Elephas maximus*) in the elephant reintroduction project

Abstract

Elephants in the reintroduction project were recruited from several parts of Thailand, and their behaviors, i.e. social organization, differed individually. Previous reports illustrated that wild elephants with the matriarch in the herd contained the same matrilineal line and had close genetic relatedness. We, therefore, hypothesized that the reintroduced elephants would set up the social structure based on maternal inherited DNA and genetic relatedness. The objective of this study was to investigate the genetic relatedness and behavioral relationship of the elephants in the reintroduction project. Blood samples were collected from 65 elephants before releasing them to the Sublanka and Doiphamuang Wildlife Sanctuary, and DNA was extracted for microsatellite and mitochondrial DNA analysis. Information of social bonding behaviors was collected weekly and data analyzed for 12 months. The results showed the average pairing relatedness of the elephants in the same group was 0.075, while that of isolated elephants was 0.038. Several mitochondrial haplotypes were found in the same elephant group. Furthermore, the observed heterozygosity in the Sublanka and Doiphamuang wildlife sanctuaries were 0.7385 (n = 29) and 0.8083 (n = 36) respectively, and 12 mitochondrial haplotypes were found in each location. In conclusion, it appears that social bonding of the reintroduced elephants was not influenced by genetic relatedness and mitochondrial DNA haplotype, but was impacted more by the elephant calf, which was at the center of gatherings. Additionally, many elephants occasionally preferred isolation. However, the management of reintroduction procedure should be performed by introducing the elephants, which carry closed pairwise relatedness and same mitochondrial haplotype, as this

would increase the chance of group formation and lead to the establishment of naturally-linked elephant herds.

Keywords

Asian elephant, reintroduction, microsatellite, mitochondrial DNA, group forming behavior

Introduction

Asian elephant are currently threatened, which results in rapid populations declining by habitat destruction, poaching for ivory, human-elephant conflicts (Sukumar, 2006) and capture of wild baby elephants to be trained for tourism or export (Shepherd, 2002). In addition, the isolation of small populations in habitat fragments in South and South-East Asia (Leimgruber et al., 2003) may very well lead to inbreeding and loss of genetic diversity (Amos and Harwood, 1998).

Reintroduction is the process to re-establish the keystone species in order to maintain and restore natural biodiversity, elephants who play an important role in shaping ecology, were reintroduced to the wild in many parts of the world, mainly with African elephants (McKnight, 1995). In Asian species, only reports with orphaned wild elephants, raised in captivity for a period time, were released to the wild in Sri Lanka (Miththapala, 2009). Since 1957, the population of both wild and domestic elephants in Thailand has dramatically declined from 100,000 to 5,000. This has caused an increased attention of public and private organizations. One of the alternative ways to preserve and increase the elephant populations is to reintroduce the domestic elephants to their natural habitat. The unique project was officially initiated in January 1997 when the HRH Queen Sirikit of Thailand released three female elephants to the wild. Until now, 124 elephants have been released in the Doi Phamuang wildlife sanctuary (Lampang, northern Thailand), Sublanka wildlife sanctuary (Lopburi, central Thailand), Phuphan national park (north east Thailand).

Microsatellites have been widely used for population-genetic studies, linkage mapping, paternity test, forensic analysis (Ellegren 2004) and as a tool for breeding strategies in various endangered species such as the black footed ferret (Wisely et al. 2002), African elephants (Nyakaana & Arctander 1998; Archie et al. 2003 and Comstock et al. 2000; 2002; Eggert et al. 2000; 2002) and Asian elephant (Fernando et al. 2001; 2003a; 2003b). The highly variable maternal inheritance of mitochondrial DNA (mtDNA) is suitable for genetic study in the population to observe lineage tracing of matriarchal social group, were studied in Asian elephants (Fernando et al., 2000; Fleischer et al., 2001). However, the reintroduction of large mega-herbivore, elephants, is unique with the long life span and generation length. No genetic study has been conducted in this reintroduced species.

Behavior in combination with genetics analysis was studied in wild elephants from Sri Lanka and indicated that the social organization coincides with the maternal lineage as revealed by mtDNA (Fernando and Lande, 2000). Moreover, relatedness analysis by microsatellites loci revealed a close relationships (mother-daughter, full sisters) between adult females with the genetic relatedness varied from 0.16 to 0.37, but no significant relatedness between adult cows and sub-adult or adult bulls. (Vidya and Sukumar, 2005). The same maternal lineage and close pairwise genetic relatedness in the elephant herd were observed in wild elephants of Vietnam (Vidya et al., 2007) and Lao PDR (Ahlering et al., 2011). In African elephants, the herd members, kin group, were in the same mtDNA haplotype with high genetic relatedness. The different groups tended to join another group when the old cows of each group were genetic relatives, particular with the group which shared mtDNA haplotype (Archie et al., 2006).

In the reintroduced elephant social organization, where came from several groups and originated areas, and particularly were influenced by human, it is interested to see how they freely formed the herd to stay in the forest, after a long term under human care. We

hypothesized that the reintroduced elephants would set up the social structure based on maternal inherited DNA and nuclear genetic relatedness, as indicated by Archie et al. (2006). Our objective was to evaluate genetic relatedness and social structure of the released Asian elephant populations under the reintroduction project. The results would be benefit for the captive elephant management to form the group in both elephant camp or zoo facilities.

Methods

Samples collection and DNA isolation

Due to the sustainable plan of reintroduction, genetic analysis had started several years after the beginning of the project, and could be conducted in the elephants before releasing or during the rehabilitation process. Therefore, blood (n=61) and hair follicle (n=4) samples were collected from 65 Asian elephants from 2 areas: the Doi Phamuang wildlife sanctuary (n=36), Sublanka wildlife sanctuary (n=29). DNA was isolated from whole-blood samples using the salt-extraction method (Miller et al. 1988) and the DNA Blood Mini Kit (Gentra) and from hair follicles by phenol-chloroform-isoamylalcohol extraction.

Measuring association pattern

The reintroduced elephants were recruited from the tourist elephant camps, street wandering, logging industry or other captive elephant facilities in Thailand, and performed the behavioral adaptation process in the reserved forest for at least 3 months, and then freely released in the 2 areas; 1) Doi Phamuang wildlife sanctuary located within latitude 18° 7' – 18° 27' north and longitude 98° 58' – 99 ° 15' east, which covered 580 squares kilometers in Lampang-Lampune province (Northern Thailand) 2) Sublangka Wildlife Sanctuary located within latitude 15° 35' – 15° 44' north and longitude 101° 19' – 101° 23' east, which covered

155 square kilometers in Lopburi province (central Thailand). The reintroduced period of each elephant varied from 10 years to 3 months since the behavioral collection process.

Association pattern was collected via scan sampling method (Altman, 1974) in every particular elephant for one hour, once a week due to the routine work of the field staff. The same group or family is the association of one or more adult female elephants moving and behaving in a coordinated manner with no single individual at a distance greater than 50 meters. Each elephant was assigned membership to the family that she associated with for the majority (>50%) of her sightings. If any particular elephant or group was separated in a distance greater than 1,000 meters without gathering, it was assigned to be an isolated elephant or separated group.

Mitochondrial and microsatellite DNA amplification and genotyping

Samples were amplified in 25 µl reactions containing 2.5U HelixAmp™ Hot-Taq Polymerase (Nanohelix, Korea), 2.5 µl 10xPCR Buffer (Nanohelix, Korea), 0.5 µl of fluorescently labeled forward primer (each 10mM), 0.5 µl unlabeled reverse primer (each 10mM), 0.5 µl of dNTPs (each 10 mM), 2 µl of 50ng/µl the DNA extract, and sterile deionized water to give a final volume. The PCR cycling condition followed the company instruction, i.e. 15 min at 95°C for an initial denaturation step, followed by cycles of 20 sec at 94°C, 40sec of annealing at different temperature, LafMS03 and LafMS05 (Nyakaana and Arctander, 1998) at 50°C, LA2 (Eggert et al., 2000), LafMS06, LafMS08 (Nyakanaa et al., 2005), EMU04, EMU07, EMU14, EMU15, and EMU17 (Kongrit et al., 2008) at 58°C, FH60 and FH94 (Comstock et al., 2000) at 60°C, 1min at 72°C, and a final extension step for 7 min at 72°C. PCR products were visualized in a 3% agarose gel. Fragment analysis was performed in an ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems), and genotypes were scored using GeneMapper v4.0 (Applied Biosystems).

A 600-bp fragment of the control region was amplified and sequenced using the primers MDL5 and MDL3, as described by Fernando et al. (2000)(Fernando et al., 2000).

Data analysis

Number of alleles per locus, allele size range, expected frequency of multilocus genotype, observed (H_o) and expected (H_e) heterozygosity from Hardy-Weinberg equilibrium, linkage disequilibrium (Fisher's method) were calculated with the Excel Microsatellite Toolkit (Park, 2001) and the program GenePop (Raymond and Rousset, 1995). The pairwise genetic relatedness of two individual elephants was calculated by program ML-Relate (Kalinowski et al., 2006). The sequence of each haplotype was created for a haplotype network using TCS v. 1.13 (Clement et al., 2000), and for phylogenetic tree using MEGA5 (Tamura et al., 2011).

Results

Genetic diversity of these two populations, indicated by 12 microsatellite loci, was high with an average of 0.7385 in the Sublanka wildlife sanctuary, and 0.8083 in the Doi Phamuang wildlife sanctuary (Table 1). Markers LafMS05, EMU04, EMU07 and EMU15 were not in Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) ($P < 0.05$), while linkage disequilibrium could not be rejected ($p < 0.05$) for the marker pairs FH60 and FH94, LA2 and LafMS08, and FH94 and EMU14 respectively.

Table 1 Summary statistics of genetic variation: observed and expected heterozygosities (H_o and H_e)

Locus	Dye label	Size range (alleles)	Sublanka		Doi Phamuang	
			H_o	H_e	H_o	H_e
FH60	NED	142-160 (9)	0.759	0.754	0.833	0.792
FH94	PET	196-230 (11)	0.793	0.818	0.944	0.814
LA2	VIC	223-241 (10)	0.621	0.573	0.694	0.801
LafMS03	6-FAM	134-152 (9)	0.793	0.721	0.618	0.723
LafMS05 ^a	NED	146-166 (10)	0.621	0.780	0.750	0.844
LafMS06	PET	130-162 (14)	0.931	0.865	0.886	0.896
LafMS08	6-FAM	170-192 (12)	0.689	0.707	0.829	0.814
EMU04 ^a	6-FAM	91-119 (12)	0.655	0.863	0.833	0.850
EMU07 ^a	VIC	91-125 (16)	0.655	0.865	0.829	0.873
EMU14	6-FAM	130-148 (10)	0.897	0.831	0.849	0.830
EMU15 ^a	VIC	136-156 (11)	0.690	0.840	0.719	0.800
EMU17	NED	116-138 (12)	0.759	0.882	0.917	0.900
Average (all)		(11.33)	0.739	0.792	0.808	0.828

^a The locus was not in Hardy-Weinberg equilibrium ($P < 0.05$)

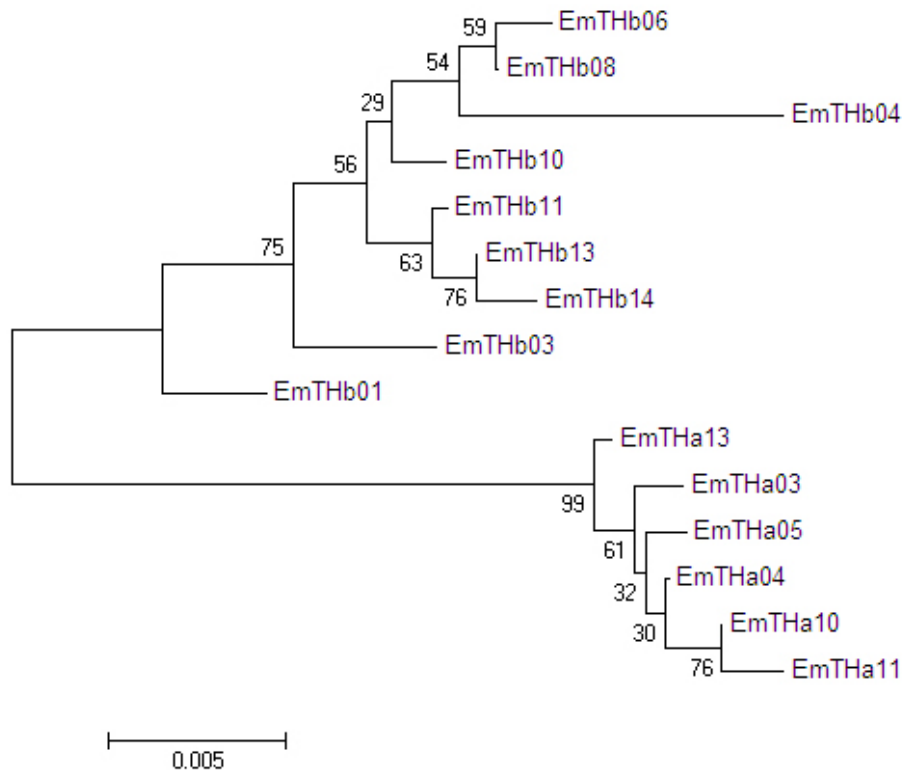
Among 65 samples tested, we detected a total of 15 different haplotypes; 13 haplotypes that had been described previously by (Fernando et al., 2003) and the other two were previously undescribed haplotype groups. Each wildlife sanctuary had 12 haplotypes (Table 2). All of these haplotypes could, however, be categorized into two major clades, A and B, as previous reports. The phylogenetic tree of these haplotypes was shown in Fig 1. The average pairwise genetic relatedness of the elephants in the same group was 0.075 ± 0.14 , while that of isolated elephants was 0.038 ± 0.05 . Several mitochondrial haplotypes were found in the same elephant group.

Table 2 Mitochondrial DNA Haplotype in the Sublanka and Doi Phamuang wildlife

sanctuary

Mitochondrial DNA Haplotype	Number in Sublanka WS	Number in Doi Phamuang WS	Accession number	Haplotype in Fernando et al. (2003)
EmTHa03	-	2		AC
EmTHa04	1	2		AD
EmTHa05	1	-		New A -haplotype
EmTHa10	-	4		AB
EmTHa11	1	-		New A -haplotype
EmTHa13	2	7		AH
EmTHb01	3	-		BQ
EmTHb03	-	1		BP
EmTHb04	1	1		New B -haplotype
EmTHb06	5	4		BN
EmTHb08	2	2		BO
EmTHb10	2	1		BB/BL
EmTHb11	4	1		BW
EmTHb13	5	3		BH
EmTHb14	1	2		BG
Failed	6	1		

Figure 1 Neighbor-joining phylogenetic tree based on 600 bp showed the genetic relationship (mtDNA haplotype) using program MEGA5. Bootstrap values are indicated at nodes.



Discussion

This study investigated the genetic relatedness and behavior of the reintroduced elephants, focusing on the free releasing elephants and self group forming, which we hypothesized the elephant selected kin group based on mtDNA haplotype and pairwise genetic relatedness. Our results also showed that the pairwise relatedness of elephants in the same groups was higher than those of isolated elephants. However, comparing our data of reintroduced elephants in the same group ($r=0.075 \pm 0.14$; 12 microsatellite loci) to those of the wild Asian elephant herd ($r=0.37 \pm 0.159$; 6 microsatellite loci) (Vidya and Sukumar, 2005) and wild African elephant herd ($r=0.42$; 11 microsatellite loci) (Archie et al., 2006), the average pairwise genetic relatedness of reintroduced elephants was much lower.

Nevertheless, this data was slightly different from those of the poached African elephant group ($r=0.13 \pm 0.01$), which lost the matriarch, and the young female gathered later (Gobush et al., 2009). Moreover, the mitochondrial haplotypes were not associated with the social bonding, comparing the previous reports which wild Asian elephants in the same herd were belong to the same matrilineal line (Ahlering et al., 2011; Fernando and Lande, 2000; Vidya and Sukumar, 2005; Vidya et al., 2007).

The genetic unrelated social organization from our study was the same as the report in heavily poached African populations in the Mikumi National Park, Tanzania by Gobush et al. (2009), which the long tusk old females or matriarchs were poached, and resulted in disrupting of the herd. The dispersed herd members; i.e. younger males and females, later formed a group without genetic relationship. In the Doi Phamuang wildlife sanctuary population, one of the core groups contained 5 elephants which were all together, never separated or joined with other groups during our 12 months observations. These elephants were completely unrelated and carried different mitochondrial haplotypes. Gobush et al. (2009) mentioned that the bonding between non-relatives would be from solitary females, and could be the opportunity for strong bonds. These findings were the similar to the report from the elephants in the Queen Elizabeth National Park, Uganda, where elephant poaching was high, and the re-grouped elephants were from various mitochondrial haplotypes (Nyakaana et al., 2001), while the un-poached population in the Ambosali National Park, Kenya contained the same matrilineal haplotype (Archie et al., 2006). The reintroduced population differed from the poached population in several reasons. First, the poached herds still contained subset of core groups i.e. female kin (Gobush and Wasser, 2009), and gathering together, while the reintroduced groups came from different area, only mother-offspring might consist in the group. The elephants in the reintroduction project were separated from the cow since young, and raised by human, and no behaviorally influenced in

social organization by the matriarch, as in poached elephants. Furthermore, loosed bonding as joining the group or isolation was observed in the reintroduced elephants, which was reported in poached African species (Gobush et al., 2009)

Social organization in other species, e.g. a striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*) which showed the high genetic relatedness intra-group than that inter-group (Gaspari et al., 2007); while no pairwise genetic relatedness and maternal line influence in was observed a common dolphin (*Delphinus delphis*). However, they preferred grouping by age, sex and maturity (Viricel et al., 2008). The different behavior of these two species based on location and environment. The report showed that delphinids bonded and recognized their kin by high frequent whistles (Moller, 2012).

In the reintroduction project, a number of elephants were isolated, of which pairwise relatedness was lower than those of grouped elephants. This finding was similar to poached African elephants, which most of them was isolated, and periodically joined the group (Gobush et al., 2009). The isolated behavior also was found in a gray mouse lemur (*Microcebus murinus*), of which the pairwise relatedness of isolated females was less than that of grouped females (Radespiel et al., 2001), and females in the same group carried the same maternal inherited DNA (Wimmer et al., 2002). In nature, environment played an important role of elephant social organization. Elephants gathered for foraging in wet season when vegetation was abundant, and separated when food and water were scarce (Gobush et al., 2009). This behavior was benefit in the daily life, but maximum benefit in protecting and rearing the elephant calf (Fernando and Lande, 2000). This calf-centered gathering behavior also was observed in reintroduced elephants, which calf-cow or weaned calf were released, and resulted in bonding formation which the calf was a center of grouping.

The genetic diversity of the released elephants in these two wildlife sanctuaries was high, which indicated the low inbreeding in these 2 populations, and could be maintained for

long time. These genetic value was high compared to the elephant facilities i.e. the Thai Elephant Conservation Center (0.579), the Maesa elephant camp (0.580) as previous study (Thitaram et al., 2008), even higher in the same area of the reintroduction foundation at the Sublanka wildlife sanctuary (0.548). These results were higher probably due to the different microsatellite primers set, which was more polymorphic, and was utilized for the national elephant identification and genetic diversity program.

In our study, blood samples could not be collected from every particular elephants because the genetic program had started later than the beginning of the project; thus, these released elephants could not be accessed.

In conclusion, it appears that social bonding of the reintroduced elephants was not influenced by genetic relatedness and mitochondrial DNA haplotype, but was impacted more by the elephant calf, which was at the center of gatherings. Additionally, many elephants occasionally preferred isolation. However, the management of reintroduction procedure should be performed by introducing the elephants, which carry closed pairwise relatedness and same mitochondrial haplotype, as this would increase the chance of group formation and lead to the establishment of long term naturally-linked elephant herds.

Acknowledgement

The authors thank the Thailand Research Fund and the Elephant Reintroduction Foundation for the grant no. MRG5480260. We also thank Ms. Ratchadakorn Phumphuay for technical assistant, staff of the elephant reintroduction foundation for sample and behavior collection.

267 **References**

- 268 Ahlering, M.A., Hedges, S., Johnson, A., Tyson, M., Schuttler, S.G., Eggert, L.S., 2011, Genetic
269 diversity, social structure, and conservation value of the elephants of the Nakai Plateau, Lao
270 PDR, based on non-invasive sampling. *Conservation Genetics* 12, 413-422.
- 271 Amos, W., Harwood, J., 1998, Factors affecting levels of genetic diversity in natural populations.
272 *Philosophical Transaction of the Royal Society B* 353, 177-186.
- 273 Archie, E.A., Moss, C.J., Alberts, S.C., 2006, The ties that bind: genetic relatedness predicts the fission
274 and fusion of social groups in wild African elephants. *Proc Biol Sci* 273, 513-522.
- 275 Clement, M., Posada, D., Crandall, K., 2000, TCS: a computer program to estimate gene genealogies.
276 *Molecular Ecology* 9, 1657-1659.
- 277 Comstock, K.E., Wasser, S.K., Ostrander, E.A., 2000, Polymorphic microsatellite DNA loci identified in
278 the African elephant (*Loxodonta africana*). *Mol Ecol* 9, 1004-1006.
- 279 Eggert, L.S., Ramakrishnan, U., Mundy, N.I., Woodruff, D.S., 2000, Polymorphic microsatellite DNA
280 markers in the African elephant (*Loxodonta africana*) and their use in the Asian elephant
281 (*Elephas maximus*). *Mol Ecol* 9, 2223-2226.
- 282 Fernando, P., Lande, R., 2000, Molecular genetic and behavioral analysis of social organization in the
283 Asian elephant (*Elephas maximus*). *Behavioral Ecology and Sociobiology* 48, 84-91.
- 284 Fernando, P., Pfrender, M.E., Encalada, S.E., Lande, R., 2000, Mitochondrial DNA variation,
285 phylogeography and population structure of the Asian elephant. *Heredity* 84 (Pt 3), 362-
286 372.
- 287 Fernando, P., Vidya, T.N.C., Payne, J., Stuewe, M., Davison, G., Alfred, R.J., Andau, P., Bosi, E.,
288 Kilbourn, A., Melnick, D.J., 2003, DNA analysis indicates that Asian elephants are native to
289 Borneo and are therefore a high priority for conservation. *PLoS biology* 1, 110-115.
- 290 Fleischer, R.C., Perry, E.A., Muralidharan, K., Stevens, E.E., Wemmer, C.M., 2001, Phylogeography of
291 the Asian elephant (*Elephas maximus*) based on mitochondrial DNA. *Evolution* 55, 1882-
292 1892.
- 293 Gaspari, S., Azzellino, A., Airoidi, S., Hoelzel, A.R., 2007, Social kin associations and genetic
294 structuring of striped dolphin populations (*Stenella coeruleoalba*) in the Mediterranean Sea.
295 *Mol Ecol* 16, 2922-2933.
- 296 Gobush, K., Kerr, B., Wasser, S., 2009, Genetic relatedness and disrupted social structure in a
297 poached population of African elephants. *Mol Ecol* 18, 722-734.
- 298 Gobush, K., Wasser, S., 2009, Behavioural correlates of low relatedness in African elephant core
299 groups of a poached population. *Animal Behaviour* 78, 1079-1086.
- 300 Kalinowski, S., AP Wagner, A., Taper, M., 2006, ML-Relate: a computer program for maximum
301 likelihood estimation of relatedness and relationship. *Molecular Ecology Notes* 6, 576-579.
- 302 Kongrit, C., Siripunkaw, C., Brockelman, W., Akkarapatumwong, V., Wright, T., Eggert, L., 2008,
303 Isolation and characterization of dinucleotide microsatellite loci in the Asian elephant
304 (*Elephas maximus*). *Molecular Ecology Resource* 8, 175-177.
- 305 Leimgruber, P., Gagnon, J.B., Wemmer, C., Kelly, D.S., Songer, M.A., Selig, E.R., 2003, Fragmentation
306 of Asia's remaining wildlands: implications for Asian elephant conservation. *Animal*
307 *Conservation* 6, 347-359.
- 308 McKnight, B., 1995, Behavioural ecology of 'hand-reared' African elephants (*Loxodonta africana*
309 (Blumenbach)) in Tsavo East National Park, Kenya. *African Journal of Ecology* 33, 242-256.
- 310 Miththapala, S., 2009, The Uda Walawe Elephant Transit Home - another opportunity missed? *Gajah*
311 30, 24-28.
- 312 Moller, L.M., 2012, Sociogenetic structure, kin associations and bonding in delphinids. *Mol Ecol* 21,
313 745-764.
- 314 Nyakaana, S., Abe, E., Arctander, P., Siegismund, H., 2001, DNA evidence for elephant social
315 behaviour breakdown in Queen Elizabeth National Park, Uganda. *Animal Conservation* 4,
316 231-237.

- Nyakaana, S., Arctander, P., 1998, Isolation and characterization of microsatellite loci in the African elephant, *Loxodonta africana*. *Mol Ecol* 7, 1436-1437.
- Nyakanaa, S., Okello, J.B.A., Muwanika, V., Siegismund, H.R., 2005, Six new polymorphic microsatellite loci isolated and characterized from the African savannah elephant genome. *Molecular Ecology Notes* 5, 223–225.
- Park, S.D.E., 2001, Trypanotolerance in West African cattle and the population genetic effects of selection. Ph.D. thesis, University of Dublin.
- Radespiel, U., Sarikaya, Z., Zimmermann, E., Bruford, M., 2001, Sociogenetic structure in a free-living nocturnal primate population: sex-specific differences in the grey mouse lemur (*Microcebus murinus*). *Behavioral Ecology and Sociobiology* 50, 493–502.
- Raymond, M., Rousset, F., 1995, GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism
- Journal of Heredity* 86, 248-249.
- Shepherd, C.R., 2002, The Trade of Elephants and Elephant Parts in Myanmar . TRAFFIC International.
- Sukumar, R., 2006, A brief review of the status, distribution and biology of wild Asian elephants *Elephas maximus*. *International Zoo Yearbook* 40, 1-8.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., 2011, MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 28, 2731-2739.
- Thitaram, C., Thongtip, N., Somgird, C., Colenbrander, B., Boxtel, D.C.J.v., Steenbeek, F.v., Lenstra, J.A., 2008, Evaluation and selection of microsatellite markers for an identification and parentage test of Asian elephants (*Elephas maximus*). *Conservation Genetics* 9, 921-925.
- Vidya, T.N.C., Sukumar, R., 2005, Social organization of the Asian elephant (*Elephas maximus*) in southern India inferred from microsatellite DNA. *Journal of Ethology* 23, 205–210.
- Vidya, T.N.C., Varma, S., Dang, N.X., Sukumar, T.V.T., 2007, Minimum population size, genetic diversity, and social structure of the Asian elephant in Cat Tien National Park and its adjoining areas, Vietnam, based on molecular genetic analyses. *Conservation Genetics* 8, 1471-1478.
- Viricel, A., Strand, A., Rosel, P., Ridoux, V., Garcia, P., 2008, Insights on common dolphin (*Delphinus delphis*) social organization from genetic analysis of a mass-stranded pod. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 63, 173–185.
- Wimmer, B., Tautz, D., Kappeler, P., 2002, The genetic population structure of the gray mouse lemur (*Microcebus murinus*), a basal primate from Madagascar. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 52, 166–175.