



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการและสถานภาพทางอนุกรมวิธานของ
สปีชีส์ย่อยของไก่อไฟหลังขาว (*Lophura nycthemera*) และไก่อไฟหลังเทา
(*L. leucomelana*) ในประเทศไทยโดยลำดับดีลูบในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ

โดย อาจารย์ ดร.อัมพร วิเวกแว่ว

มิถุนายน 2558

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการและสถานภาพทางอนุกรมวิธานของ
สปีชีส์ย่อยของไก่อไฟหลังขาว (*Lophura nycthemera*) และไก่อไฟหลังเทา
(*L. leucomelana*) ในประเทศไทยโดยลำดับดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ

ผู้วิจัย อาจารย์ ดร.อัมพร วิเวกแว่ว และคณะ
สังกัด ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย
สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ (ภาษาไทย)

รหัสโครงการ : MRG5680142

ชื่อโครงการ : ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการและสถานภาพทางอนุกรมวิธานของสปีชีส์ย่อยของไ้ฟ้าหลังขาว (*Lophura nycthemera*) และไ้ฟ้าหลังเทา (*L. leucomelana*) ในประเทศไทยโดยลำดับดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ

ชื่อนักวิจัย : อัมพร วิเวกแวว, วิภา เมฆวิชัย, ฉัตรพร ชัยวนนท์

สถาบัน : ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

E-mail Address : amporn.w@chula.ac.th, ampornwiwegweaw@yahoo.com

ระยะเวลาโครงการ : 2 ปี (3 มิถุนายน 2556 - 2 มิถุนายน 2558)

เนื้อหาทางวิจัย : ไ้ฟ้าหลังขาวและไ้ฟ้าหลังเทามีความแตกต่างกันในลักษณะของขน สีของแข้งและตีน ในอดีต ไ้ฟ้าหลังขาวถูกแบ่งออกเป็น 2 ชนิดย่อย ได้แก่ ไ้ฟ้าหลังขาวโจนส์และไ้ฟ้าหลังขาวจันทบูร และไ้ฟ้าหลังเทาถูกแบ่งออกเป็น 2 ชนิดย่อย ได้แก่ ไ้ฟ้าหลังเทาเข้มเทาและไ้ฟ้าหลังเทาเข้มแดง แต่ในปัจจุบันได้มีการจัดให้ไ้ฟ้าหลังเทาเป็นชนิดย่อยของไ้ฟ้าหลังขาว ส่งผลให้การจัดลำดับอนุกรมวิธานของไ้ฟ้าทั้งสองชนิดนี้ในประเทศไทยยังมีความสับสนและไม่ชัดเจน วัตถุประสงค์ของการวิจัยครั้งนี้เพื่อศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมและความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระหว่างชนิดย่อยของไ้ฟ้าหลังขาวและไ้ฟ้าหลังเทา จากกรงเลี้ยงในพื้นที่ต่างๆ ของประเทศไทย โดยวิเคราะห์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ ทำการเก็บขนของไ้ฟ้าหลังขาวโจนส์ จากสถานีเพาะเลี้ยงสัตว์ป่าเขาซอยดาว จังหวัดจันทบุรี จำนวน 25 ตัวอย่าง และจากเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง จังหวัดอุทัยธานี จำนวน 18 ตัวอย่าง, ไ้ฟ้าหลังขาวจันทบูร จากสถานีเพาะเลี้ยงสัตว์ป่าเขาซอยดาว จำนวน 21 ตัวอย่าง, ไ้ฟ้าหลังเทาเข้มแดง จากสถานีเพาะเลี้ยงสัตว์ป่าเขาสน จังหวัดราชบุรี จำนวน 20 ตัวอย่าง และ ไ้ฟ้าหลังเทาเข้มเทา จากเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง จำนวน 38 ตัวอย่าง, จากสถานีเพาะเลี้ยงสัตว์ป่าเขาสน จำนวน 20 ตัวอย่าง และจากสวนสัตว์เชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่ จำนวน 2 ตัวอย่าง รวมทั้งสิ้น 154 ตัวอย่าง จากนั้นนำตัวอย่างขนไ้ฟ้าที่เก็บมาได้ทั้งหมดมาสกัดดีเอ็นเอ เพิ่มปริมาณยีนดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์และหาลำดับเบสโดยการทำให้ DNA sequencing ผลการวิจัยพบว่า มี 152 ตัวอย่าง ที่ให้ลำดับนิวคลีโอไทด์ชัดเจนและน่าเชื่อถือ โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มีความยาว 1,113 คู่เบส มีความแปรผันทางพันธุกรรมจำนวน 54 (4.85%) ตำแหน่ง และมีจำนวนแฮพโลไทป์ที่แตกต่างกัน 15 แฮพโลไทป์ โดยมีค่าความหลากหลายของแฮพโลไทป์เฉลี่ยเท่ากับ 0.898 ± 0.009 และค่าความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์เฉลี่ยเท่ากับ 0.01807 ± 0.00067 นอกจากนี้ จากการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยการสร้าง neighbor-joining tree และ maximum likelihood tree พบว่า tree ที่ได้สามารถแบ่งไ้ฟ้าหลังขาวและไ้ฟ้าหลังเทาออกเป็น 2 clade ใหญ่ๆ อย่างชัดเจน ด้วยค่า bootstrap probability ที่สนับสนุนถึง 100% ผลการวิจัยครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าไ้ฟ้าหลังขาวและไ้ฟ้าหลังเทามีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมอย่างชัดเจน นอกจากนี้ยังพบว่าไ้ฟ้าทั้ง 4 ชนิดย่อยมีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมของยีนดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ และแยกออกเป็นกลุ่มย่อยๆ 4 กลุ่มตามลักษณะสัณฐานภายนอกของชนิดย่อย จากผลการศึกษาที่ได้แสดงว่าไ้ฟ้าหลังขาวและไ้ฟ้าหลังเทามีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการเป็นแบบ monophyletic group อีกทั้งยังแสดงให้เห็นว่าไ้ฟ้าหลังเทาเข้มเทาและไ้ฟ้าหลังเทาเข้มแดงมีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้ชิดกับไ้ฟ้าหลังเทามากกว่าไ้ฟ้าหลังขาว ดังนั้นจึงควรจัดให้เป็นชนิดย่อยของไ้ฟ้าหลังเทา การตรวจพบการเกิดยีนโพลีระหว่างประชากรไ้ฟ้าหลังเทาเข้มเทาและไ้ฟ้าหลังเทาเข้มแดงที่สถานเพาะเลี้ยงสัตว์ป่าเขาสน แสดงว่าไ้ฟ้าทั้งสองชนิดย่อยนี้สามารถผสมข้ามสายพันธุ์กันได้ในสภาพกรงเลี้ยง

คำหลัก: ไ้ฟ้าหลังขาว, ไ้ฟ้าหลังเทา, การแปรผันทางพันธุกรรม, ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ, ยีนดีเอ็นเอ

บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)

Project Code : MRG5680142

Project Title : Phylogenetic relationships and taxonomic status of the subspecies of the Silver and Kalij pheasants, *Lophura nycthemera* and *L. leucomelana* in Thailand based on mitochondrial D-loop sequences

Investigator : Amporn Wiwegweaw, Wina Meckvichai, Chatraporn Chaiwanon

Affiliation : Department of Biology, Faculty of Science, Chulalongkorn University

E-mail Address : amporn.w@chula.ac.th, ampornwiwegweaw@yahoo.com

Project Period : 2 years (3 June 2013- 2 June 2015)

Abstract : The Silver pheasant (*Lophura nycthemera* Linnaeus, 1758) and the Kalij pheasant (*L. leucomelana* Latham, 1790) are closely related species of gallopheasants. They differ from each other by patterns of feathers and the color of legs. *Lophura nycthemera* in Thailand is composed of two subspecies: *L. n. jonesi* and *L. n. lewisi*, and *L. leucomelana* consists of two subspecies as well; they are *L. l. lineata* and *L. l. crawfordii*. In the past, the taxa *lineata* and *crawfordii* were treated as the subspecies of *L. leucomelana*. However, their taxonomic status is currently unclear because some authors treat them as the subspecies of *L. nycthemera*. Thus, this study aimed to assess genetic variation and investigate evolutionary relationships of the subspecies of the Silver and Kalij pheasants in captive breeding in Thailand by using polymerase chain reaction and DNA sequencing strategies. The feathers of *L. n. jonesi* were collected from Khao Soi Diao Wildlife Sanctuary, Chanthaburi province (n=25) and Huai Kha Khaeng Wildlife Sanctuary, Uthai Thani province (n=18); those of *L. n. lewisi* were collected from Khao Soi Diao Wildlife Sanctuary (n=21); those of *L. l. crawfordii* were collected from Khao Zon Wildlife Breeding Center, Ratchaburi province (n=20); and those of *L. l. lineata* were collected from Khao Zon Wildlife Breeding Center (n=20), Huai Kha Khaeng Wildlife Sanctuary (n=38) and Chiang Mai Zoo, Chiang Mai province (n=2). About 20-30 feather samples of each subspecies were subjected to DNA extraction, amplification of mtDNA D-loop region and DNA sequencing. A total of 1,113 bps were successfully sequenced from 152 pheasant individuals. There were 54 (4.85%) variable sites, defining 15 unique haplotypes. On average, the haplotype diversity (0.898 ± 0.009) and the nucleotide diversity (0.01807 ± 0.00067) were high. In addition, the phylogenetic analyses of the mtDNA haplotypes revealed that both neighbor-joining and maximum likelihood trees showed similar tree topology in which *L. nycthemera* and *L. leucomelana* can be divided into 2 major clades with a bootstrap value of 100% indicating that their evolutionary relationship is monophyly. Moreover, the four pheasant subspecies exhibited genetic differences as they can be divided into 4 subgroups, regarding to their morphological traits. Furthermore, the data also revealed that the taxa *crawfordii* and *lineata* are more closely related to *L. leucomelana* than to *L. nycthemera* suggesting that these two taxa should be classified as the subspecies of *L. leucomelana*. Furthermore, the detections of gene flows between *L. l. lineata* and *L. l. crawfordii* in Khao Zon Wildlife Breeding Center may indicate the occurrence of historical hybridization between these two subspecies in the captivity.

Keywords: Silver pheasant, Kalij pheasant, genetic variation, phylogeny, D-loop gene

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจ

ไก่ฟ้าเป็นสัตว์ปีกกลุ่มหนึ่งที่มีสีสันสวยงามและมีประโยชน์ทั้งทางด้านเศรษฐกิจ สังคมและวัฒนธรรม มีชื่อภาษาอังกฤษว่า gallopheasant จัดอยู่ในวงศ์ Phasianidae ซึ่งสัตว์ปีกในวงศ์นี้ทั่วโลกประกอบด้วย 45 สกุล (genus) และ 177 ชนิด (species) สำหรับไก่ฟ้าที่มีถิ่นกำเนิดในประเทศไทยนั้นมีทั้งหมด 6 สกุล เมื่อแยกเป็นชนิดจะมีถึง 10 ชนิด และถ้านับรวมชนิดย่อยแล้วจะมีถึง 14 ชนิดย่อย (โอภาส ขอบเขตต์, 2541; วิณา เมฆวิชัยและสุทธิพงศ์ อาศิรพจน์, 2552) ในธรรมชาติมีโอกาสมพบเห็นตัวได้ยาก ดังนั้นร่องรอยที่พบ เช่น รอยเท้า มูล หรือขน จึงเป็นสิ่งจำเป็นที่จะช่วยในการติดตามว่าเป็นชนิดใด เนื่องจากไก่ฟ้ามีลักษณะที่สวยงาม จึงเป็นที่สนใจของมนุษย์ที่จะนำมาเลี้ยงหรือล่าเพื่อเอาขนมาทำเป็นเครื่องประดับ อีกทั้งเนื้อยังสามารถนำมาทำเป็นอาหาร ทำให้ปัจจุบันไก่ฟ้าหาได้ยาก มีจำนวนลดลงและแยกเป็นหย่อมป่า (วิณา เมฆวิชัยและสุทธิพงศ์ อาศิรพจน์, 2552) ส่งผลให้จำนวนประชากรของไก่ฟ้าในธรรมชาติลดน้อยลงเป็นอย่างมาก ทำให้ไก่ฟ้าถูกจัดเป็นสัตว์ป่าคุ้มครอง (พระราชบัญญัติสงวนและคุ้มครองสัตว์ป่า, 2535) การเพาะเลี้ยงในสถานเพาะเลี้ยงสัตว์ป่าเพื่อเพิ่มจำนวนและอัตราการอยู่รอดของประชากรไก่ฟ้าเพื่อคืนสู่ธรรมชาติเป็นวิธีการจัดการเพื่อการอนุรักษ์อย่างหนึ่งเพื่อไม่ให้ไก่ฟ้าสูญพันธุ์ไปจากธรรมชาติ แต่ก่อนที่จะทำโครงการไก่ฟ้าคืนสู่ถิ่นจะต้องมีการศึกษาอย่างรอบคอบ การตรวจสอบพันธุกรรมเป็นสิ่งจำเป็นเบื้องต้นเพื่อตรวจสอบว่าไก่ฟ้าจากกรงเลี้ยงที่ปล่อยออกไปมีพันธุกรรมเหมือนหรือแตกต่างจากประชากรที่อยู่ในพื้นที่ธรรมชาตินั้นๆ มากน้อยเพียงใด ทั้งนี้เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดการปนเปื้อนของยีน (genetic contamination) จากประชากรไก่ฟ้าในกรงเลี้ยงสู่ประชากรไก่ฟ้าในธรรมชาติ นอกจากนี้การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมทั้งระดับภายในและระหว่างประชากรไก่ฟ้าในสภาพกรงเลี้ยงยังมีความจำเป็นอย่างมากเพื่อใช้เป็นแนวทางในการคัดเลือกพ่อพันธุ์แม่พันธุ์ในสภาพกรงเลี้ยง และยังสามารถนำไปต่อยอดในการวางแผนการขยายพันธุ์และอนุรักษ์ไก่ฟ้าในสภาพกรงเลี้ยงก่อนปล่อยสู่ธรรมชาติต่อไปในอนาคตได้

การจำแนกทางอนุกรมวิธานของไก่ฟ้าในประเทศไทย (Gallopheasant)

อาณาจักร (Kingdom)	Animalia
ไฟลัม (Phylum)	Chordata
ชั้น (Class)	Aves
อันดับ (Order)	Galliformes
วงศ์ (Family)	Phasianidae
วงศ์ย่อย (Subfamily)	Phasianinae
สกุล (Genus)	<i>Lophura</i>

ไก่ฟ้าหลังขาว (silver pheasant) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Lophura nycthemera* Linnaeus, 1758 เป็นไก่ฟ้าที่มีรูปร่างเพรียวยาว เป็นสัตว์ปีกที่แสดงลักษณะ sexual dimorphism อย่างชัดเจน กล่าวคือ เพศผู้และเพศเมียมีลักษณะที่แตกต่างกันอย่างชัดเจน ดังนี้: เพศผู้มีขนาด 120-127 เซนติเมตร มีรูปร่างเพรียวยาว มีขนหางคู่กลางสีขาวมีความยาวกว่าขนหางคู่อื่นๆ ซึ่งมีลายขาวดำ และขนาดสั้นกว่าลดหลั่นลงมา บริเวณหลังมีสีขาวเด่นชัด มีลวดลายเป็นแถบลายสีขาวรูปจั่วเรียงซ้อนกัน บริเวณด้านล่างของลำตัวตั้งแต่อก ท้อง และก้น มีสีดำเหลือบน้ำเงิน ขนคลุมหางมีสีขาวและมีลวดลายเป็นแถบสีขาวรูปจั่วเช่นเดียวกัน ปีกมีปลายมน แข็งและตีนมีสีแดง มีเดือยข้างละ 1 อัน ใบหน้ามีแผ่นหนังสีแดงเข้มคล้ายกำมะหยี่ บนหัวมีขนสีดำยาวโค้งลงมาถึงท้ายทอย คอ ส่วนหลังและด้านข้างมีสีขาว จะงอยปากสีเหลืองอมเขียว ขนาดสั้น หนาและโค้งลงเล็กน้อย (วิณา เมฆวิชัยและสุทธิพงศ์ อาศิรพจน์,

2552; Lekagul & Round, 1991; Robson, 2000) (รูปที่ 1) ไก่ฟ้าหลังขาวที่พบในประเทศไทยมี 2 ชนิดย่อย ได้แก่ ไก่ฟ้าหลังขาวโจนส์ (*L. n. jonesi*) และไก่ฟ้าหลังขาวจันทบูร (*L. n. lewisi*) (Lekagul & Round, 1991) ซึ่งเพศผู้มีลักษณะพื้นฐานภายนอกแตกต่างกันอย่างชัดเจน กล่าวคือ ไก่ฟ้าหลังขาวจันทบรูลำตัวด้านบนสีดำ ลายเกล็ดและลายบั้งสีขาวรูปจั่วเรียงเป็นชั้นถี่ๆ มองโดยรวมเป็นสีเทา ไม่ขาวเหมือนไก่ฟ้าหลังขาวโจนส์ รวมถึงมีความยาวหางสั้นกว่า แข็งและตีสีแดง (วิภา เมฆวิชัยและสุทธิพงศ์ อาศิรพจน์, 2552; Lekagul & Round, 1991) (รูปที่ 2) ส่วนเพศเมียมีขนาดเล็กกว่าเพศผู้ (มีขนาดประมาณ 56-71 เซนติเมตร) มีสีและลวดลายแตกต่างจากเพศผู้ ดังนี้: ไก่ฟ้าหลังขาวโจนส์เพศเมียมีหลังสีน้ำตาลเข้ม บริเวณด้านล่างของลำตัวตั้งแต่คอ ออก ท้อง จนถึงก้น มีลวดลายสีดำทรงแหลมโดยปลายแหลมชี้ลงด้านล่างสลับกับสีขาว ขนคลุมหางและขนหางคู่กลางมีสีน้ำตาลเข้ม ขณะที่ขนหางบริเวณขอบหางมีลายดำสลับขาว แข็งและตีสีแดง ไม่มีเดือย ใบหน้ามีแผ่นหนังสีแดงแต่สีไม่สดเท่าเพศผู้ มีขนที่หัวสีน้ำตาลเข้มและขนาดไม่ยาวเท่าเพศผู้ (รูปที่ 1) ส่วนไก่ฟ้าหลังขาวจันทบูรเพศเมีย ลำตัวด้านล่างสีน้ำตาล มีลายเกล็ดจากขอบขนสีน้ำตาลอ่อน ส่วนหางเป็นสีน้ำตาลเข้มล้วน ไม่มีลาย จะอวบปากสีเหลืองอมเขียวจางๆ (วิภา เมฆวิชัยและสุทธิพงศ์ อาศิรพจน์, 2552; Lekagul & Round, 1991) (รูปที่ 2) สำหรับการกระจายตัวของไก่ฟ้าหลังขาวในประเทศไทย พบว่าไก่ฟ้าหลังขาวโจนส์พบกระจายตัวอยู่ในภาคเหนือลงมาถึงภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคตะวันออก บริเวณจังหวัดฉะเชิงเทรา ส่วนไก่ฟ้าหลังขาวจันทบูร พบกระจายตัวเฉพาะในภาคตะวันออก โดยเฉพาะที่จังหวัดจันทบุรีและตราด (วิภา เมฆวิชัยและสุทธิพงศ์ อาศิรพจน์, 2552; Lekagul & Round, 1991) (รูปที่ 5) จากการศึกษาโดยใช้ลักษณะพื้นฐานภายนอกและดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรียพบว่าไก่ฟ้าหลังขาวมีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้ชิดกับไก่ฟ้าหลังเทามากที่สุด (Moulin et al., 2003; Penchart et al., 2012)



http://pet.kapook.com/photo/pet_4718.html



http://www.oknation.net/blog/home/user_data/file_data/201305/12/531650c17.jpg

รูปที่ 1 แสดงลักษณะพื้นฐานภายนอกของไก่ฟ้าหลังขาวโจนส์ ทั้งเพศผู้ (รูปซ้ายมือ) และเพศเมีย (รูปขวามือ)



http://www.plakard.com/img/3c712f3c712f73026d05c93b2ceb1c1c0910ad_1.jpg



http://www.oknation.net/blog/home/user_data/file_data/201305/12/531651620.jpg

รูปที่ 2 แสดงลักษณะพื้นฐานภายนอกของไก่ฟ้าหลังขาวจันทบูร ทั้งเพศผู้ (รูปซ้ายมือ) และเพศเมีย (รูปขวามือ)

ไก่ฟ้าหลังเทา (kalij pheasant) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *L. leucomelana* Latham, 1790 เพศผู้มีขนาด 74-80 เซนติเมตร ส่วนหลังมีลายแถบขาวเส้นเล็กๆ สลับดำเรียงซ้อนกัน ทำให้มองเห็นโดยรวมเป็นสีเทา สำหรับส่วนล่างของลำตัวตั้งแต่คอ ออก ท้อง และก้นมีสีดำ ส่วนข้างอกและข้างลำตัวจะเห็นลายขีดสีขาวปลายแหลมต่างจากไก่ฟ้าหลังขาว ไก่ฟ้าหลังเทาในประเทศไทยมี 2 ชนิดย่อย ได้แก่ ไก่ฟ้าหลังเทาแข้งแดง (*L. l. crawfordii*) และไก่ฟ้าหลังเทาแข้งเทา (*L. l. lineata*) (Lekagul & Round, 1991) ไก่ฟ้าหลังเทาแข้งแดงเพศผู้ แข่งแต่ละข้างมีเดือย 1 อัน ใบหน้ามีแผ่นหนังสีแดง และบนหัวมีขนสีดำตั้งชันขึ้น ลำตัวด้านบนมีลายบั้งละเอียดมากสีขาวสลับดำ ทำให้มองเห็นเป็นสีเทา ลำตัวด้านล่างสีดำ จะงอยปากมีสีเหลืองอมเขียวจางๆ ขนาดสั้น แต่เรียกว่าไก่ฟ้าหลังขาวเล็กน้อย มีแข้งและตีนสีแดง (รูปที่ 3) ส่วนไก่ฟ้าหลังเทาแข้งเทาเพศผู้มีลักษณะคล้ายไก่ฟ้าหลังเทาแข้งแดง แต่แข้งและตีนมีสีเทา (รูปที่ 4) ส่วนเพศเมียมีขนาด 56-71 เซนติเมตร: ไก่ฟ้าหลังเทาแข้งแดง มีขนส่วนหลังสีน้ำตาลคล้ำ ส่วนท้องสีดำและมีแถบลายรูปจั่วสีขาวขนาดใหญ่กว่าเพศเมียของไก่ฟ้าหลังขาว หางมีลายบั้งขาวดำ แข็งและตีนสีแดง ไม่มีเดือย มีแผ่นหนังสีแดงที่ใบหน้า และมีขนสีน้ำตาลบนหัว (รูปที่ 3) ส่วนไก่ฟ้าหลังเทาแข้งเทา มีลายเกล็ดสีขาวที่ลำตัวด้านล่างแคบกว่า แข็งและตีนสีเทา (วิณา เมฆวิชัยและสุทธิพงศ์ อาศิรพจน์, 2552; Lekagul & Round, 1991) (รูปที่ 4) สำหรับการกระจายตัวของไก่ฟ้าหลังเทาในประเทศไทย พบว่าไก่ฟ้าหลังเทาแข้งแดงจะพบทางทิศใต้ของจังหวัดตากลงมาถึงจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ส่วนไก่ฟ้าหลังเทาแข้งเทาพบกระจายอยู่ทางทิศตะวันตกเฉียงเหนือจากจังหวัดแม่ฮ่องสอนลงมาถึงทางเหนือของจังหวัดตาก (Lekagul & Round, 1991) แต่จากการศึกษาของวิณา และคณะ ในปี พ. ศ. 2552 พบว่าการกระจายตัวของไก่ฟ้าหลังเทาแข้งเทามีขอบเขตแพร่กระจายซ้อนทับกับไก่ฟ้าหลังเทาแข้งแดงลงมาถึงจังหวัดอุทัยธานีและกาญจนบุรี (วิณา เมฆวิชัยและสุทธิพงศ์ อาศิรพจน์, 2552) (รูปที่ 5)



http://www.smileforestgroup.com/bbs/attachment/Mon_1011/14_10_3b6e9cd572312fa.jpg



<http://upic.me/show/22189816>

รูปที่ 3 แสดงลักษณะสัณฐานภายนอกของไก่ฟ้าหลังเทาแข้งแดง ทั้งเพศผู้ (รูปซ้ายมือ) และเพศเมีย (รูปขวามือ)



<http://sv6-w2.postjung.com/picpost/data/144/144037-11-9875.jpg>



http://www.oknation.net/blog/home/blog_data/519/30519/images/Pitta/pheasant3.jpg

รูปที่ 4 แสดงลักษณะสัณฐานภายนอกของไก่ฟ้าหลังเทาแข้งเทา ทั้งเพศผู้ (รูปซ้ายมือ) และเพศเมีย (รูปขวามือ)



รูปที่ 5 แสดงการกระจายตัวของไก่ฟ้าหลังขาวและไก่ฟ้าหลังเทาในประเทศไทย

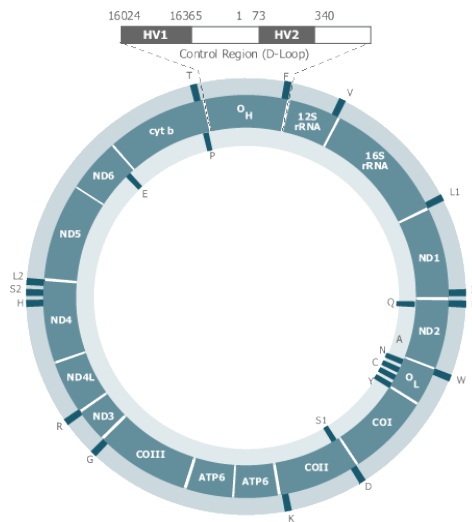
ในประเทศไทยการศึกษาทางด้านชีววิทยาของไก่ฟ้าถูกจำกัดในวงแคบ โดยเฉพาะการศึกษาข้อมูลพื้นฐานของพันธุ์ไก่ฟ้าของไทย เนื่องจากการจัดลำดับอนุกรมวิธานของไก่ฟ้าในประเทศไทยก่อนหน้านี้ ซึ่งจำแนกตามลักษณะสัณฐานของขนและข้อมูลทั่วไปของไก่ฟ้าในประเทศไทย จากหนังสือคู่มือนกของนายแพทย์บุญส่ง เลขะกุล นกเมืองไทย ได้จำแนกไก่ฟ้าหลังขาวเป็น 2 ชนิดย่อย ได้แก่ ไก่ฟ้าหลังขาวโจนส์ (*L. n. jonesi*) และไก่ฟ้าหลังขาวจันทบูร (*L. n. lewisii*) และได้จำแนกไก่ฟ้าหลังเทาเป็น 2 ชนิดย่อยเช่นกัน ได้แก่ ไก่ฟ้าหลังเทาเข้มเทา (*L. l. lineata*) และไก่ฟ้าหลังเทาเข้มแดง (*L. l. crawfordii*) (บุญส่ง เลขะกุล, 2534) ดังที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น แต่ในปัจจุบันตามหนังสือคู่มือนกของนายแพทย์บุญส่ง เลขะกุล ที่ได้มีการปรับปรุงใหม่ ได้จัดไก่ฟ้าหลังเทาเข้มเทาและไก่ฟ้าหลังเทาเข้มแดงเป็นชนิดย่อยของไก่ฟ้าหลังขาว *Lophura nycthemera* กล่าวคือ ไก่ฟ้าหลังเทาเข้มเทา มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *L. n. lineata* และ ไก่ฟ้าหลังเทาเข้มแดง มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *L. n. crawfordii* (จารุจินต์ นฤตะภักดิ์ และคณะ, 2550) ส่งผลให้สถานภาพทางอนุกรมวิธานของไก่ฟ้าหลังขาวและไก่ฟ้าหลังเทาในประเทศไทยยังมีความไม่ชัดเจน จึงมีความสนใจที่จะศึกษาทางด้านอนุชีววิทยา เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของไก่ฟ้าหลังขาวและไก่ฟ้าหลังเทาทั้ง 4 ชนิดย่อยในประเทศไทยว่ามีความเหมือนหรือแตกต่างกันทางพันธุกรรมมากน้อยเพียงใด และอย่างไร

นอกจากนี้ ยังมีการศึกษาพบว่าไก่ฟ้าในสกุล *Lophura* หากนำมาอยู่รวมกันในการเลี้ยง หรือแม้แต่ในธรรมชาติหากมีพื้นที่การกระจายตัวทับซ้อนกันจะสามารถผสมข้ามสายพันธุ์กันได้หรือที่เรียกว่า hybridization (Hennache, 2003; Moulin et al., 2003) ซึ่งการตรวจพบการเกิดการผสมข้ามสายพันธุ์ในกลุ่มไก่ฟ้าสกุล *Lophura* โดยใช้เทคนิคด้านอนุชีววิทยาและ mtDNA marker ในการตรวจสอบนั้นเคยมีรายงานพบใน *L. imperialis* ซึ่งคาดว่าน่าจะเป็นไก่ฟ้าลูกผสมระหว่างไก่ฟ้าชนิด *L. edwardsi*, *L. hatinhensis* และ *L. nycthemera* (Hennache et al., 2003) นอกจากนี้การศึกษาของ Dong และคณะในปี ค.ศ. 2010 ซึ่งศึกษายีนจากไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอและจากลักษณะสัณฐานของขนรายงานไว้ว่าไก่ฟ้าหลังขาวชนิดย่อย *L. n. rufipes* เป็นไก่ฟ้าลูกผสมที่เกิดจากการผสมพันธุ์ระหว่างไก่ฟ้าหลังขาวชนิดย่อย *L. n. occidentalis* และไก่ฟ้าหลังเทาชนิดย่อย *L. l. lathamii* (Dong et al., 2010) เนื่องจากการสำรวจเบื้องต้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง จังหวัดอุทัยธานี พบไก่ฟ้าหลังเทาที่มีลักษณะ

สัณฐานภายนอกก้ำกึ่ง (intermediate) ระหว่างไก่ฟ้าหลังขาวและไก่ฟ้าหลังเทา คือมีลักษณะขนสีเทาอ่อนกว่าปกติ และมีแข้งสีชมพูอมแดง จึงเกิดความสงสัยว่าไก่ฟ้าหลังเทาที่พบในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้งนี้จะเป็นลูกผสมของไก่ฟ้าทั้งสองชนิดนี้หรือไม่ จากที่กล่าวมาทั้งหมดนี้จะเห็นว่าสถานภาพทางอนุกรมวิธานของชนิดย่อยของไก่ฟ้าหลังขาวและไก่ฟ้าหลังเทายังมีความสับสนและมีความไม่แน่นอนอยู่มาก จึงมีความสนใจที่จะศึกษาเกี่ยวกับความหลากหลายทางพันธุกรรมและความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของชนิดย่อยของไก่ฟ้าหลังขาวและไก่ฟ้าหลังเทาในกรงเลี้ยงในประเทศไทย ทั้งนี้เพื่อนำข้อมูลที่ได้มาใช้ร่วมกับข้อมูลทางสัณฐานวิทยาในการพิจารณาเกี่ยวกับการจัดสถานภาพทางอนุกรมวิธานของชนิดย่อยของไก่ฟ้าหลังขาวและไก่ฟ้าหลังเทาในประเทศไทย และเพื่อนำข้อมูลที่ได้มาใช้เป็นฐานข้อมูลเพื่อการศึกษาและพัฒนาการวางแผนการจัดการในกรงเลี้ยง เพื่อการอนุรักษ์ไก่ฟ้าในประเทศไทยต่อไปในอนาคต นอกจากนี้ยังสามารถนำข้อมูลที่ได้มาใช้กับงานวิจัยในอนาคต เช่น การเปรียบเทียบความแปรผันทางพันธุกรรมระหว่างไก่ฟ้าในกรงเลี้ยงและไก่ฟ้าในแหล่งธรรมชาติในพื้นที่ต่างๆ ในการทำโครงการไก่ฟ้าคืนสู่ถิ่น อันจะนำไปสู่การอนุรักษ์พันธุ์ไก่ฟ้าอย่างยั่งยืนในอนาคตต่อไป

1.2 ยีนดีลูปในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ

ไมโทคอนเดรียเป็นออร์แกเนลล์ที่อยู่ภายในไซโทพลาสซึม ที่สามารถถ่ายทอดจากแม่สู่ลูกได้ และมีดีเอ็นเอของตัวเอง เรียกว่า ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ (mtDNA) โดยมีบริเวณที่เรียกว่าดีลูป (D-loop หรือ Displacement loop) ซึ่งเป็นบริเวณที่แสดงความแปรผันทางพันธุกรรมสูง เพราะเป็น noncoding และ control region (Brown et al., 1979; Randi & Lucchini, 1998) จึงเป็นบริเวณที่นิยมนำมาใช้เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระดับโมเลกุลของสิ่งมีชีวิตหลายชนิด รวมถึงสัตว์ปีกจำพวกนกน้ำและเป็ดด้วย โดยมีรายงานว่า การจัดจำแนกสัตว์ปีกด้วยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอบริเวณ D-loop ให้ผลที่มีประสิทธิภาพดีกว่าไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอบริเวณอื่น โดย D-loop gene แบ่งออกเป็น 3 region ได้แก่ hypervariable region I เป็นบริเวณที่เกิดความแปรผันค่อนข้างสูง ในขณะที่ central conserved region II เป็นบริเวณที่มีโอกาสเกิดความแปรผันต่ำ เนื่องจากเป็นบริเวณที่ conserve และ hypervariable region II เป็นบริเวณที่เกิดความแปรผันสูงที่สุด (Desjardins and Morais, 1990; Quinn and Wilson, 1993; Randi et al., 2001) (รูปที่ 6) นอกจากนี้ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอยังมีข้อดีหลายประการ เพื่อใช้ในการประยุกต์ในการสืบค้นความสัมพันธ์ในแง่ของวิวัฒนาการการสืบสายพันธุ์ได้ เนื่องจาก 1) ในสัตว์หลายๆ ชนิด รวมทั้งสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ขึ้นส่วนบางส่วนของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ นั้นมีวิวัฒนาการค่อนข้างเร็วเมื่อเปรียบเทียบกับ nuclear gene 2) การที่ในแต่ละเซลล์มีจำนวนไมโทคอนเดรียลมากภายในเซลล์ ทำให้สามารถสกัดไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ ออกจากตัวอย่างที่มีอายุเก่าแก่มากวิเคราะห์ได้ 3) ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอไม่เกิด genetic recombination และการถ่ายทอดทางพันธุกรรมจากแม่สู่ลูก ทำให้แปลผลได้โดยไม่ซับซ้อนเหมือน nuclear genome 4) ลำดับ sequence ของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ จะยังคงเดิมทุกประการ เมื่อมีการถ่ายทอดจากแม่ไปสู่ลูก ยกเว้นเมื่อเกิด mutation (สำหรับในบางบริเวณที่มีวิวัฒนาการค่อนข้างเร็ว) และ 5) เป็นวิธีการเริ่มแรกที่ง่ายที่สุดในการศึกษาการเกิด gene flow และใช้ระยะเวลาในการทำน้อยกว่า nuclear gene



รูปที่ 6 แสดงบริเวณยีนดีลูบในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างชนิดย่อยของไก่อไฟหลังขาว (*Lophura nycthemera*) และไก่อไฟหลังเทา (*L. leucomelana*) จากกรงเลี้ยงในพื้นที่ต่างๆ ของประเทศไทยทั้งภายในและระหว่างประชากร โดยวิเคราะห์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนดีลูบในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ
2. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการและสถานภาพทางอนุกรมวิธานของชนิดย่อยของไก่อไฟหลังขาวและไก่อไฟหลังเทาในกรงเลี้ยงจากพื้นที่ต่างๆ ของประเทศไทย
3. เพื่อประเมินความเป็นไปได้ในการเกิดการผสมข้ามสายพันธุ์ระหว่างชนิดย่อยของไก่อไฟหลังขาวและไก่อไฟหลังเทาโดยใช้เทคนิคทางด้านอณูชีววิทยา

วิธีการทดลอง

2.1 วัสดุ อุปกรณ์และสารเคมี

2.1.1 วัสดุและอุปกรณ์

- กรรไกรผ่าตัด
- ตู้เย็น รุ่น MR-F41X (Mitsubishi, Japan)
- ขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร (Schott Duran, Germany)
- บีกเกอร์ ขนาด 50 มิลลิลิตร (Pyrex[®], USA)
- หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ (microcentrifuge tube) ขนาด 0.2, 0.5 และ 1.5 ml (Treff[®] Switzerland)
- ถังมือยาง
- กล้องดิจิทัล รุ่น IXUS 255 HS (Canon Co., Ltd, Japan)
- กระดาษทิชชู
- ปากกาเคมี
- ไฟแช็ค
- Forceps
- Petri dish
- Spatula
- Aluminum foil
- Automatic micropipette P2, P10, P20, P200 และ P1000 (Harikul Science Co., Ltd., Thailand)
- Electronic clock timer model CT-30 (Canon Co., Ltd., Japan)
- Centrifuge model 5418 (Eppendorf, Germany)
- Cubee mini-centrifuge (GeneReach Biotechnology Corp., Taiwan)
- Vortex mixture model VM-300 (Germany Industrial Corp., Taiwan)
- AccuBlock[™] Digital Dry Bath model D1100 (Labnet International, Inc., USA)
- -20°C Freezer (Sharp, Japan)
- DNA thermal cycle model T100[™] (Bio-Rad, Laboratories, Inc., USA)
- Autoclave รุ่น SX-700 (Tomy Kogyo Co., Ltd., Japan)
- Autoclave tape (3M[™], USA)
- Safe Image Transilluminator (Invitrogen[™])
- Ice-box (Eppendorf, Germany)
- Microwave (Samsung, Korea)
- Pioneer[™] electronic balance model PA413 (Ohaus Instruments Co., Ltd., USA)
- Electrophoresis chamber และ power supply (Cosmo Bio Co., Ltd., USA)
- Whatman[®] laboratory sealing film (Fisher Scientific Co., Ltd., UK)

2.1.2 สารเคมี

- FavorPrep[™] Tissue Genomic DNA Extraction Mini Kit (Favorgen Biotech corp., Taiwan)
- SeaKem[®] LE agarose powder
- 10 μ M PHDL primer (forward primer)

- 10 μ M PHDH primer (reverse primer)
- 10,000X SYBR[®] Safe DNA gel stain
- 100 μ g/ml 100 bp DNA ladder
- PrimeSTAR GXL DNA Polymerase (Takara, Japan)
- 100% ethanol
- 0.5XTBE buffer
- Sterile distilled water
- MilliQ

2.2 วิธีการดำเนินงาน

2.2.1 สถานที่ทำการวิจัยและเก็บตัวอย่าง

ทำการเก็บขนของไก่ฟ้าทั้ง 4 ชนิดย่อยจากกรงเลี้ยงในพื้นที่ต่างๆ ของประเทศไทย ได้แก่ สถานีเพาะเลี้ยงสัตว์ป่าเขาซอยดาว อำเภอโป่งน้ำร้อน จังหวัดจันทบุรี, เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง อำเภอลานสัก จังหวัดอุทัยธานี, สถานีเพาะเลี้ยงสัตว์ป่าเขาสน อำเภोजอมบึง จังหวัดราชบุรี และ สวนสัตว์เชียงใหม่ อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ ชนิดย่อยละประมาณ 20-30 ตัวอย่างต่อ 1 พื้นที่ที่ศึกษา (ตารางที่ 1) โดยเก็บขนของแต่ละตัวอย่างจาก 2 ตำแหน่ง คือขนปลายปีก (primary feather) หรือขนกลางปีก (secondary feather) เนื่องจากมีขนาดใหญ่กว่าขนประเภทอื่นหรือเก็บขนที่ร่วงแล้วในช่วงที่มีการผลัดขนหลังฤดูผสมพันธุ์ นำตัวอย่างขนนกที่เก็บได้กลับมายังห้องปฏิบัติการ ใช้กรรไกรที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ตัดเฉพาะบริเวณโคนขนและเก็บโคนขนแต่ละอันใส่ถุงซิปล็อคที่ติดฉลากข้อมูล โดยถุงซิปล็อคต้องผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากเชื้อราและแบคทีเรีย จากนั้นเก็บรักษาตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิห้องในห้องปฏิบัติการ

2.2.2 ขั้นตอนการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลองในห้องปฏิบัติการ ประกอบด้วย 5 ขั้นตอน ดังนี้

- 2.2.2.1 การสกัดดีเอ็นเอ
- 2.2.2.2 การเพิ่มปริมาณยีนเป้าหมายในหลอดทดลองด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction: PCR)
- 2.2.2.3 การตรวจสอบขนาดของ PCR product ด้วยวิธีการ agarose gel electrophoresis
- 2.2.2.4 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์
- 2.2.2.5 การวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรม

ตารางที่ 1 แสดงสถานที่เก็บตัวอย่างและจำนวนไก่ฟ้าแต่ละชนิดย่อยที่ใช้ในการศึกษา

ชนิดย่อยของไก่ฟ้า	ชื่อย่อ	สถานที่เก็บตัวอย่าง (จังหวัด)	จำนวนตัวอย่างที่เก็บได้
ไก่ฟ้าหลังขาวโจนส์	LNJ	สถานีเพาะเลี้ยงสัตว์ป่าเขาสอยดาว (จันทบุรี)	25
		เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง (อุทัยธานี)	18
ไก่ฟ้าหลังขาวจันทบูร	LNL	สถานีเพาะเลี้ยงสัตว์ป่าเขาสอยดาว (จันทบุรี)	21
ไก่ฟ้าหลังเทาเข้มแดง	LLC	สถานีเพาะเลี้ยงสัตว์ป่าเขาสน (ราชบุรี)	20
ไก่ฟ้าหลังเทาเข้มเทา	LLL	สถานีเพาะเลี้ยงสัตว์ป่าเขาสน (ราชบุรี)	20
		เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง (อุทัยธานี)	48
		สวนสัตว์เชียงใหม่ (เชียงใหม่)	2
รวมทั้งสิ้น			154

2.2.2.1 การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากโคนขนของไก่ฟ้าทั้ง 4 ชนิดย่อย ได้แก่ ไก่ฟ้าหลังขาวโจนส์, ไก่ฟ้าหลังขาวจันทบูร, ไก่ฟ้าหลังเทาเข้มแดงและไก่ฟ้าหลังเทาเข้มเทา โดยตำแหน่งขนที่นำมาใช้มักเป็นขน primary หรือ secondary โดยใช้สารเคมีสำเร็จรูปสำหรับสกัดดีเอ็นเอ คือ FavorPrep™ Tissue Genomic DNA Extraction Mini Kit (Favorgen Biotech Corporation, Taiwan) โดยมีวิธีสกัดดังนี้

- 1) ทำความสะอาดขนไก่ฟ้าด้วยน้ำกลั่น จากนั้นใช้กรรไกรตัดบริเวณปลายโคนขนเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดประมาณ 0.3-0.5 เซนติเมตร ใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
- 2) เติม FATG1 Buffer 200 ไมโครลิตรและสารละลายเอนไซม์ 11 mg/ml Proteinase K ปริมาณ 9 ไมโครลิตร จากนั้นผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องวอร์เทก (vortex mixer) นำไปบ่ม (incubate) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3-4 ชั่วโมง ระหว่างการบ่มให้นำไปวอร์เทกทุกๆ 30 นาที
- 3) เติม FATG2 Buffer 200 ไมโครลิตร นำไปวอร์เทกเพื่อให้ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
- 4) เติม 100% Ethanol 200 ไมโครลิตร แล้วนำไปวอร์เทก จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ด้วยเครื่องเซนตริฟิวส์ที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที
- 5) ประกอบมินิคอลัมน์ (mini column) ลงในหลอดคอลเลกชัน (collection tube) จากนั้นนำตัวอย่างเฉพาะส่วนที่เป็นสารละลายสีปริมาณ 540 ไมโครลิตร ลงในมินิคอลัมน์ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนตริฟิวส์ที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอในสารละลายจับตัวกับเมมเบรนในหลอดมินิคอลัมน์

- 6) ทิ้งส่วนที่เป็นน้ำออกจากหลอดคอลเลคชัน แล้วนำมินิคอลัมน์สวมลงในหลอดคอลเลคชันดังเดิมจากนั้นเติม W1 Buffer 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนตริฟิวส์ที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอมีความบริสุทธิ์มากยิ่งขึ้น
- 7) ทิ้งส่วนที่เป็นน้ำออกจากหลอดคอลเลคชัน แล้วเติม WASH Buffer 750 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนตริฟิวส์ที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที
- 8) เทส่วนที่เป็นน้ำทิ้ง นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนตริฟิวส์ที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที เพื่อให้ของเหลวทั้งหมดตกลงในหลอดคอลเลคชัน
- 9) นำเฉพาะมินิคอลัมน์สวมลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวส์หลอดใหม่ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติม Elution Buffer 55 ไมโครลิตร ลงบริเวณตรงกลางของมินิคอลัมน์ ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที เพื่อให้มินิคอลัมน์ดูดซับ Elution Buffer แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนตริฟิวส์ที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอตกลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวส์
- 10) เก็บดีเอ็นเอที่สกัดได้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปใช้ในส่วนต่อไป

2.2.2.2 การเพิ่มปริมาณยีนเป้าหมายในหลอดทดลองด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

เทคนิคพีซีอาร์ (PCR) มีชื่อเต็มว่าเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction) เป็นเทคนิคเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมดีเอ็นเอ ให้มีปริมาณมากมายหลายเท่าในระยะเวลาอันรวดเร็ว โดยอาศัยหลักการจำลองตัวของสายดีเอ็นเอ (DNA replication) เปลี่ยนแบบกระบวนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในสิ่งมีชีวิตตามธรรมชาติ ที่มีการสร้างสายดีเอ็นเอสายใหม่อีกหนึ่งสายจากดีเอ็นเอเดิม โดยใช้เครื่อง PCR machine หรือ Thermal cycler เป็นตัวช่วยให้เกิดปฏิกิริยา โดยการวิจัยครั้งนี้ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์จากดีเอ็นเอต้นแบบบริเวณยีนดีลูบในไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ ซึ่งใช้ไพรเมอร์ไปจับกับบริเวณดังกล่าว จากนั้นทำการสังเคราะห์ดีเอ็นเอต่อไป

ตารางที่ 2 แสดงชื่อและลำดับโอลิโกนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ดีลูบไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอที่ใช้ในการศึกษา

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับโอลิโกนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ (5' - 3')
PHDL (forward primer)	AGGACTACGGCTTGAAAAGC
PHDH (reverse primer)	CATCTTGGCATCTTCAGTGCC (Moulin et al., 2003)

วิธีการเตรียม PCR mixture

เตรียมส่วนผสมในการทำพีซีอาร์ในหลอดไมโครเซนตริฟิวส์ขนาด 0.2 มิลลิลิตร โดยในแต่ละหลอดมีส่วนผสมดังนี้

Total DNA	3.0	μl	
10 μM PHDL primer	1.5	μl	
10 μM PHDH primer	1.5	μl	
2.5 mM dNTP mixture	2.4	μl	
5XPrimeSTAR GXL buffer (5 mM Mg ²⁺ plus)	6.0	μl	6
PrimeSTAR GXL DNA Polymerase (1.25 units/μl)	0.3	μl	
Milli-Q Water	15.3	μl	
Total volumn	30	μl	

สังเคราะห์ยีนเป้าหมายโดยใช้เครื่อง DNA Thermal Cycle โดยกำหนดเวลาและอุณหภูมิดังนี้

ขั้นตอนที่ 1	Initial denaturation	95°C	เป็นเวลา 4 นาที
ขั้นตอนที่ 2	Denaturation	95°C	เป็นเวลา 40 วินาที
	Annealing	58°C	เป็นเวลา 1 นาที 15 วินาที
	Extension	72°C	เป็นเวลา 2 นาที 30 วินาที
	ตั้งโปรแกรมให้ทำซ้ำทั้งหมด 35 รอบ (35 cycles)		
ขั้นตอนที่ 3	Final extension	72°C	เป็นเวลา 10 นาที

นำหลอดไมโครเซนตริฟิวส์ที่มีส่วนผสมของสารที่ใช้ในการทำพีซีอาร์ใส่ลงใน DNA Thermal Cycle และเปิดเครื่อง

2.2.2.3 การตรวจสอบขนาดของ PCR product ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis

วิธี agarose gel electrophoresis ทำเพื่อตรวจสอบขนาดของ PCR product ที่สังเคราะห์ได้ เริ่มจากการเตรียม 0.8% agarose gel โดยชั่งผง agarose หนัก 0.4 กรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ จากนั้นเติม 0.5XTBE buffer ปริมาตร 50 ml ลงไป เขย่าเบาๆ ให้ผสมกันแล้วนำไปเข้าไมโครเวฟที่อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส พอ buffer เริ่มเดือดเล็กน้อยให้หยุดการทำงานของไมโครเวฟแล้วนำขวดรูปชมพู่ออกมาสังเกต หากผง agarose ยังไม่ละลายเข้ากับ buffer ให้ต้มต่อไปจนกว่าจะละลายเป็นเนื้อเดียวกัน หากละลายเข้ากันแล้วให้นำออกมาพักไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาประมาณ 5-10 นาที หรือให้มีอุณหภูมิอุ่นพอที่จะสามารถนำขวดรูปชมพู่มาสัมผัสกับผิวหนังได้ ใส่ 10,000XSYBR® Safe DNA gel stain ลงไป 2.5 µl ใน 50 ml ของ agarose gel solution ซึ่ง SYBR® Safe DNA gel stain เป็นสีย้อมที่มีคุณสมบัติคล้ายกับ ethidium bromide ที่สามารถแทรกตัวจับกับคู่เบสที่อยู่ภายในสายของดีเอ็นเอได้ เมื่อกระตุ้นด้วยแสงอัลตราไวโอเลตจะปรากฏแถบดีเอ็นเอขึ้น เท agarose gel solution ลงใน tray ที่ประกอบด้วยถาดเจลและ comb ให้ได้ความสูงประมาณ 5 มิลลิเมตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจน agarose gel แข็งตัว ประมาณ 20 นาที จากนั้นดึง comb ออก เช็ดเศษ gel ที่เกาะอยู่บน tray ออกให้หมด นำ tray ไปใส่ลงใน electrophoresis chamber แล้วเท 0.5XTBE buffer ให้ท่วม gel ให้ได้ปริมาณที่สูงกว่าผิวหน้า agarose gel เล็กน้อยประมาณ 1-2 เซนติเมตรจากนั้นใช้ micropipette ดูด PCR product ครั้งละ 1 ตัวอย่าง 5 µl และดูด 100 bp + 1.5 kb DNA ladder ปริมาตร 1 µl เพื่อใช้เป็น DNA marker ในการบอกขนาดของ DNA ลงใน well เริ่มการทำงานของเครื่อง electrophoresis โดยใช้ความต่างศักย์ที่ 135 โวลต์ เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นอ่านผลของ PCR product ภายใต้แสง UV โดยใช้ Safe Imager transilluminator และถ่ายภาพเจลด้วยกล้องดิจิทัลเพื่อเป็นการบันทึกผล

2.2.2.4 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์

ส่ง PCR product ปริมาณ 60 µl ไปยังบริษัท Bioneer Inc. ประเทศเกาหลีใต้ เพื่อทำ PCR product ให้มีความบริสุทธิ์มากยิ่งขึ้นและหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยวิธี automated DNA sequencing ด้วยเครื่อง 3730XL DNA sequencer โดย primer ที่ใช้ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ได้แก่ PHDL และ PHDH โดยทางบริษัทจะส่งผลของ DNA sequence กลับมาในรูปแบบของไฟล์ข้อมูลและนำข้อมูลทั้งหมดมาทำการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมทางคอมพิวเตอร์ต่อไป

2.2.2.5 การวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรม

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาตรวจสอบความถูกต้องของ peak ด้วยตาเปล่า (visual correction) จากนั้นนำลำดับเบสที่ตรวจสอบแล้วไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) โดยใช้โปรแกรม BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) เพื่อตรวจสอบว่าข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้นั้นตรงกับลำดับนิวคลีโอ

ไทด์ของยีนดีลูปของไก่ฟ้าหลังขาวและไก่ฟ้าหลังเทาหรือไม่ เมื่อตรวจสอบเรียบร้อยแล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาทำ multiple sequences alignment ด้วยโปรแกรม Clustal W version 1.81 (Thompson et al., 1994) เพื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ทั้งหมดเพื่อหาตำแหน่งที่มีนิวคลีโอไทด์แตกต่างกัน จากนั้นหาค่าระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) ทั้งภายในประชากรและระหว่างประชากรชนิดย่อยของไก่ฟ้าหลังขาวและไก่ฟ้าหลังเทาโดยใช้โปรแกรม Mega version 6.06 (www.megasoftware.net) (Tamura et al., 2011) ซึ่งค่าระยะห่างทางพันธุกรรมนี้จะแสดงถึงความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมในประชากร โดยหากค่าระยะห่างทางพันธุกรรมมีค่าน้อย จะแสดงให้เห็นว่าแต่ละประชากรมีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมมาก แต่หากค่าระยะห่างทางพันธุกรรมมีค่ามาก ก็แสดงว่าแต่ละประชากรมีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมมาก นอกจากนี้ยังทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยการสร้าง phylogenetic tree ด้วยวิธี maximum likelihood และ neighbor-joining (Saitou & Nei, 1987) โดย neighbor-joining tree สร้างโดยใช้ Kimura 2-parameter model ด้วยโปรแกรม Mega version 6.06 โดยคำนวณค่า bootstrap probability ทั้งหมด 1,000 ครั้งเพื่อสนับสนุน tree ที่ได้ สำหรับการศึกษาในครั้งนี้ใช้ outgroup คือ ไก่ฟ้าหน้าเขียว *Lophura ignita* (Genbank accession number: AJ300151) และไก่ฟ้าพญาลอ *L. diardi* (AJ300147) นอกจากนี้ยังใช้โปรแกรม DnaSP version 5.10.1 (www.ub.edu/dnasp) (Rozas et al., 2010) สำหรับคำนวณค่าความหลากหลายของแฮพโลไทป์ (haplotype diversity) (Nei, 1987) และค่าความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์ (nucleotide diversity) (Tajima, 1983) อีกด้วย

ผลการทดลอง

3.1 ผลการเก็บตัวอย่าง

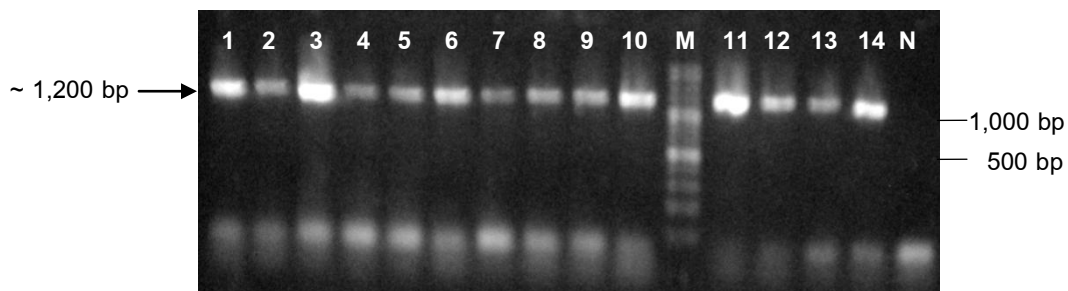
ได้เก็บขนของไก่ฟ้าทั้ง 4 ชนิดย่อยในกรงเลี้ยงจากพื้นที่ต่างๆ ในประเทศไทย ดังนี้ ไก่ฟ้าหลังขาวโจนส์ จากสถานีเพาะเลี้ยงสัตว์ป่าเขาซอยดาว อำเภอโป่งน้ำร้อน จังหวัดจันทบุรี จำนวน 25 ตัวอย่าง และ จากเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง อำเภอลานสัก จังหวัดอุทัยธานี จำนวน 18 ตัวอย่าง, ไก่ฟ้าหลังขาวจันทบุรี จากสถานีเพาะเลี้ยงสัตว์ป่าเขาซอยดาว อำเภอโป่งน้ำร้อน จังหวัดจันทบุรี จำนวน 21 ตัวอย่าง, ไก่ฟ้าหลังเทาเข้มแดง จากสถานีเพาะเลี้ยงสัตว์ป่าเขาสน อำเภोजอมบึง จังหวัดราชบุรี จำนวน 20 ตัวอย่าง และ ไก่ฟ้าหลังเทาเข้มเทา จากเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง อำเภอลานสัก จังหวัดอุทัยธานี จำนวน 48 ตัวอย่าง, จากสถานีเพาะเลี้ยงสัตว์ป่าเขาสน อำเภोजอมบึง จังหวัดราชบุรี จำนวน 20 ตัวอย่าง และจากสวนสัตว์เชียงใหม่ อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ จำนวน 2 ตัวอย่าง รวมทั้งสิ้น 154 ตัวอย่าง (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 แสดงผลการเก็บตัวอย่าง การสกัดดีเอ็นเอ การเพิ่มจำนวนยีนดีลูบด้วยเทคนิคพีซีอาร์ และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของไก่ฟ้าหลังขาวและไก่ฟ้าหลังเทาในกรงเลี้ยงจากพื้นที่ต่างๆ ในประเทศไทย

ชนิดย่อยของไก่ฟ้า	สถานที่เก็บตัวอย่าง (จังหวัด)	จำนวนตัวอย่างที่เก็บได้	จำนวนตัวอย่างที่สกัดดีเอ็นเอได้	จำนวนตัวอย่างที่ให้แถบ PCR product เข้มชัดเจน	จำนวนตัวอย่างที่ให้ลำดับนิวคลีโอไทด์น่าเชื่อถือ
ไก่ฟ้าหลังขาวโจนส์	สถานีเพาะเลี้ยงสัตว์ป่าเขาซอยดาว (จันทบุรี)	25	25	25	25
	เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง (อุทัยธานี)	18	18	18	16
ไก่ฟ้าหลังขาวจันทบุรี	สถานีเพาะเลี้ยงสัตว์ป่าเขาซอยดาว (จันทบุรี)	21	21	21	21
ไก่ฟ้าหลังเทาเข้มแดง	สถานีเพาะเลี้ยงสัตว์ป่าเขาสน (ราชบุรี)	20	20	20	20
ไก่ฟ้าหลังเทาเข้มเทา	สถานีเพาะเลี้ยงสัตว์ป่าเขาสน (ราชบุรี)	20	20	20	20
	เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง (อุทัยธานี)	48	48	48	48
	สวนสัตว์เชียงใหม่ (เชียงใหม่)	2	2	2	2
รวมทั้งสิ้น		154	154	154	152

3.2 ผลการสกัดดีเอ็นเอ การเพิ่มปริมาณยีนเป้าหมายด้วยเทคนิคพีซีอาร์ การตรวจสอบขนาดของ PCR product และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนดีลูปในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ

จากตัวอย่างเส้นขนของไก่ฟ้าทั้ง 4 ชนิดย่อย ได้แก่ ไก่ฟ้าหลังขาวโจนส์, ไก่ฟ้าหลังขาวจันทบุรี, ไก่ฟ้าหลังเทาเข้มแดง และไก่ฟ้าหลังเทาเข้มเทา จากกรงเลี้ยงในพื้นที่ต่างๆ ของประเทศไทยทั้ง 154 ตัวอย่าง นำมาสกัดดีเอ็นเอ เพิ่มปริมาณยีนเป้าหมายด้วยเทคนิคพีซีอาร์ แล้วนำไปตรวจสอบขนาดด้วยวิธี gel electrophoresis โดยใช้ agarose gel พบว่าทั้ง 154 ตัวอย่างให้ PCR product เป็นแถบสีเข้มแบนเดี่ยวชัดเจน โดยขนาดของ PCR product ที่ต้องการมีขนาดประมาณ 1,200 คู่เบส (รูปที่ 7-15) จากนั้นส่ง PCR product ที่ได้ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่ามี 152 ตัวอย่างเท่านั้นที่ให้ลำดับนิวคลีโอไทด์ชัดเจนและน่าเชื่อถือ (ตารางที่ 3)

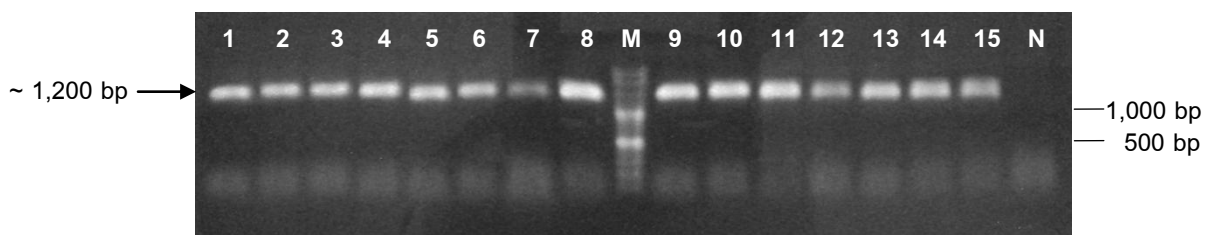


รูปที่ 7 แสดง PCR product ของยีนดีลูปในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของไก่ฟ้าหลังขาวโจนส์ (*L. n. jonesi*) ด้วยการทำ 0.8% agarose gel electrophoresis โดยใช้ความต่างศักย์ที่ 135 โวลต์ เป็นเวลา 20 นาที

แถบที่ 1-14 : PCR product ของไก่ฟ้าหลังขาวโจนส์ จากสถานีเพาะเลี้ยงสัตว์ป่าเขาสอยดาว จ. จันทบุรี (LNJ1, LNJ2, LNJ3, LNJ5, LNJ8, LNJ9, LNJ10, LNJ11, LNJ12, LNJ13, LNJ4, LNJ6, LNJ7 และ LNJ16 ตามลำดับ)

แถบ M : 100 bp + 1.5 kb DNA ladder

แถบ N : Negative control

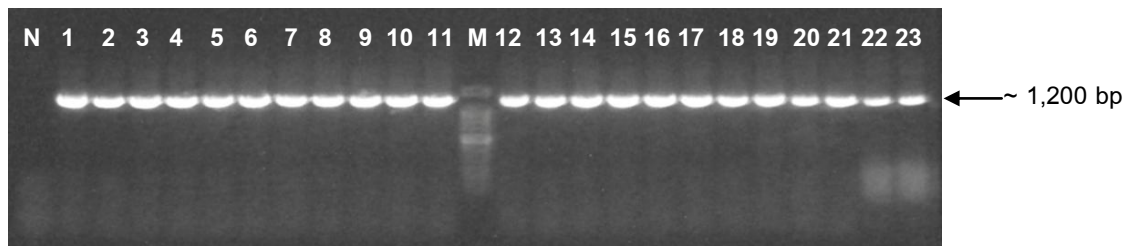


รูปที่ 8 แสดง PCR product ของยีนดีลูปในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของไก่ฟ้าหลังขาวโจนส์ (*L. n. jonesi*) ด้วยการทำ 0.8% agarose gel electrophoresis โดยใช้ความต่างศักย์ที่ 135 โวลต์ เป็นเวลา 20 นาที

แถบที่ 1-15 : PCR product ของไก่ฟ้าหลังขาวโจนส์ จากสถานีเพาะเลี้ยงสัตว์ป่าเขาสอยดาว จ. จันทบุรี (LNJ2, LNJ5, LNJ7, LNJ10, LNJ14, LNJ15, LNJ17, LNJ18, LNJ19, LNJ20, LNJ21, LNJ22, LNJ23, LNJ24, และ LNJ25 ตามลำดับ)

แถบ M : 100 bp + 1.5 kb DNA ladder

แถบ N : Negative control



รูปที่ 9 แสดง PCR product ของยีนดีลูปในไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอของไก่ฟ้าหลังขาวโจนส์ (*L. n. jonesi*) ด้วยการทำ 0.8% agarose gel electrophoresis โดยใช้ความต่างศักย์ที่ 135 โวลต์ เป็นเวลา 20 นาที

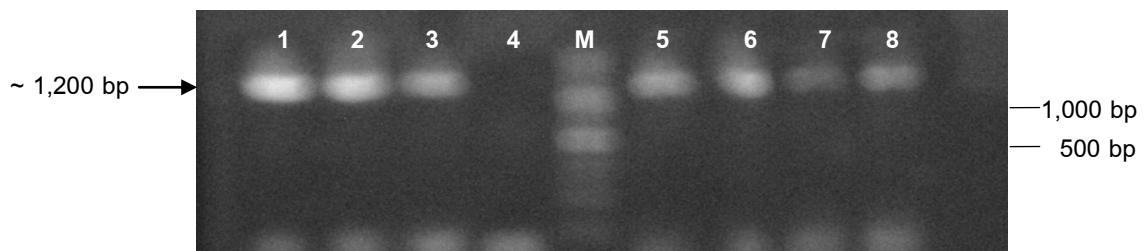
แถบที่ 1-18 : PCR product ของไก่ฟ้าหลังขาวโจนส์ จากเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง จ. อุทัยธานี (LNJ1, LNJ2, LNJ3, LNJ4, LNJ5, LNJ6, LNJ7, LNJ8, LNJ15, LNJ16, LNJ17, LNJ18, LNJ19, LNJ20, LNJ21, LNJ22, LNJ23 และ LNJ24 ตามลำดับ)

แถบที่ 19-20 : PCR product ของไก่ฟ้าหลังเทาเข้มเทา จากเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง จ. อุทัยธานี (LLL38 และ LLL40 ตามลำดับ)

แถบที่ 21-23 : PCR product ของไก่ฟ้าหลังเทาเข้มเทา จากสถานีเพาะเลี้ยงสัตว์ป่าเขาสน จ. ราชบุรี (LLL32, LLL37 และ LLL39 ตามลำดับ)

แถบ M : 100 bp + 1.5 kb DNA ladder

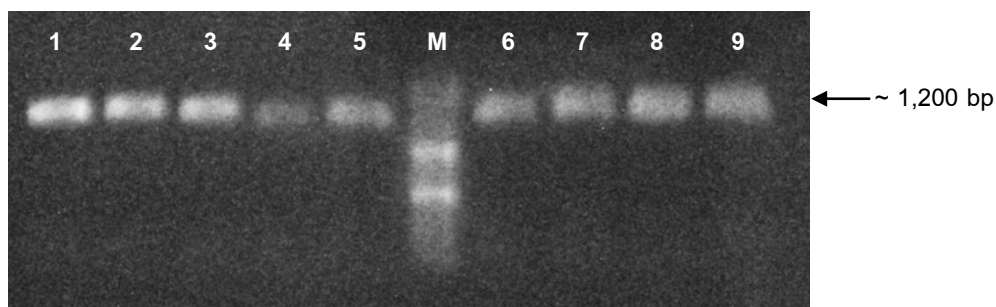
แถบ N : Negative control



รูปที่ 10 แสดง PCR product ของยีนดีลูปในไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอของไก่ฟ้าหลังขาวจันทบุรี (*L. n. lewisii*) ด้วยการทำ 0.8% agarose gel electrophoresis โดยใช้ความต่างศักย์ที่ 135 โวลต์ เป็นเวลา 20 นาที

แถบที่ 1-8 : PCR product ของไก่ฟ้าหลังขาวจันทบุรี จากสถานีเพาะเลี้ยงสัตว์ป่าเขาสอยดาว จ. จันทบุรี (LNL3, LNL4, LNL5, LNL6, LNL7, LNL8, LNL9 และ LNL10 ตามลำดับ)

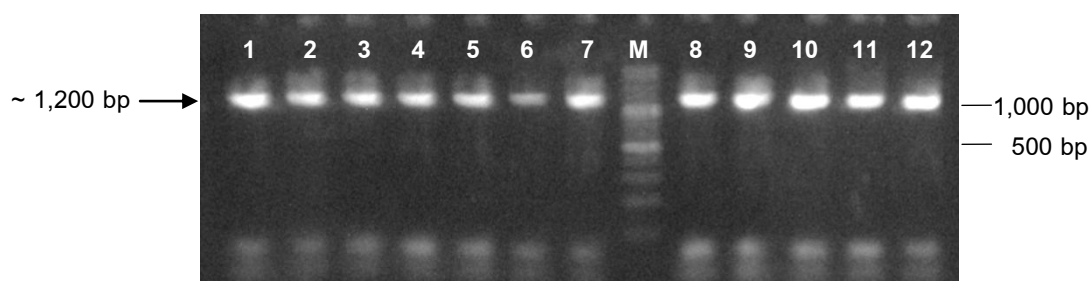
แถบ M : 100 bp + 1.5 kb DNA ladder



รูปที่ 11 แสดง PCR product ของยีนดีลูปในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของไก่ฟ้าหลังขาวจันทบุรี (*L. n. lewisi*) ด้วยการทำ 0.8% agarose gel electrophoresis โดยใช้ความต่างศักย์ที่ 135 โวลต์ เป็นเวลา 20 นาที

แถบที่ 1-9 : PCR product ของไก่ฟ้าหลังขาวจันทบุรี จากสถานีเพาะเลี้ยงสัตว์ป่าเขาซอยดาว จ. จันทบุรี (LNL1, LNL2, LNL5, LNL12, LNL13, LNL14, LNL15, LNL17 และ LNL18 ตามลำดับ)

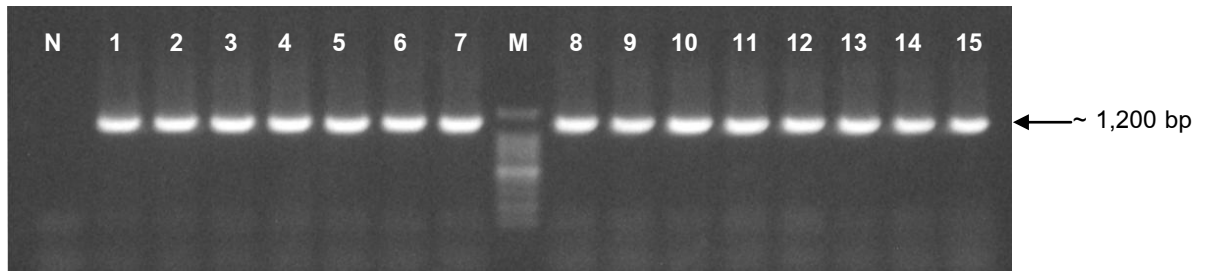
แถบ M : 100 bp + 1.5 kb DNA ladder



รูปที่ 12 แสดง PCR product ของยีนดีลูปในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของไก่ฟ้าหลังเทาเข้มเทา (*L. l. lineata*) ด้วยการทำ 0.8% agarose gel electrophoresis โดยใช้ความต่างศักย์ที่ 135 โวลต์ เป็นเวลา 20 นาที

แถบที่ 1-12 : PCR product ของไก่ฟ้าหลังเทาเข้มเทา จากเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง จ. อุทัยธานี (LLL24, LLL25, LLL26, LLL27, LLL28, LLL29, LLL30, LLL31, LLL32, LLL33, LLL34 และ LLL35 ตามลำดับ)

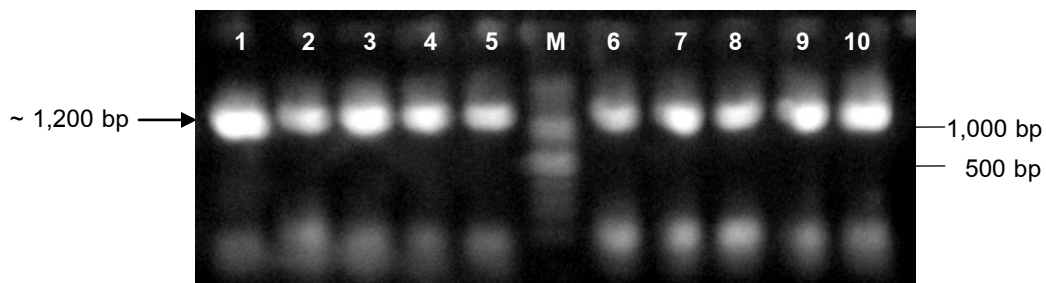
แถบ M : 100 bp + 1.5 kb DNA ladder



รูปที่ 13 แสดง PCR product ของยีนดีลูปในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของไก่ฟ้าหลังเทาเข้มเทา (*L. l. lineata*) ด้วยการทำ 0.8% agarose gel electrophoresis โดยใช้ความต่างศักย์ที่ 135 โวลต์ เป็นเวลา 20 นาที

แถบที่ 1-15 : PCR product ของไก่ฟ้าหลังเทาเข้มเทา จากเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง จ. อุทัยธานี (LLL17, LLL18, LLL19, LLL20, LLL21, LLL22, LLL23, LLL28, LLL39, LLL43, LLL44, LLL45, LLL46, LLL47 และ LLL48 ตามลำดับ)

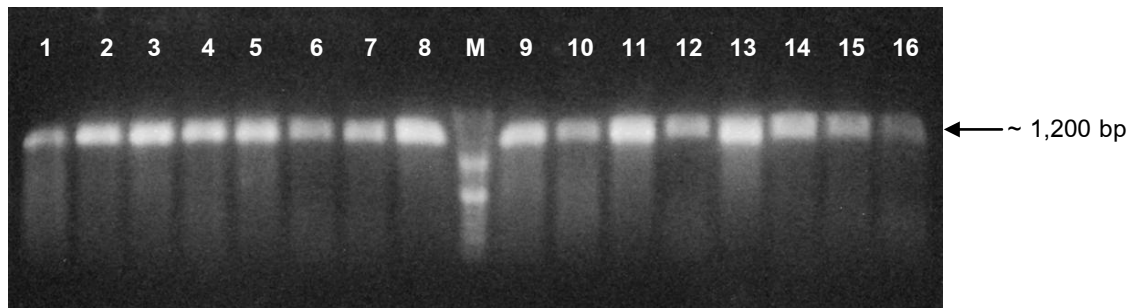
แถบ M : 100 bp + 1.5 kb DNA ladder



รูปที่ 14 แสดง PCR product ของยีนดีลูปในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของไก่ฟ้าหลังเทาเข้มแดง (*L. l. crawfordii*) ด้วยการทำให้ 0.8% agarose gel electrophoresis โดยใช้ความต่างศักย์ที่ 135 โวลต์ เป็นเวลา 20 นาที

แถบที่ 1-10 : PCR product ของไก่ฟ้าหลังเทาเข้มแดง จากสถานีเพาะเลี้ยงสัตว์ป่าเขาสน จ. ราชบุรี (LLC1, LLC3, LLC5, LLC7, LLC9, LLC11, LLC13, LLC15, LLC17 และ LLC19 ตามลำดับ)

แถบ M : 100 bp + 1.5 kb DNA ladder



รูปที่ 15 แสดง PCR product ของยีนดีลูบในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของไก่อฟ้าหลังเทาเข้มแดง (*L. l. crawfordii*) ด้วยการทำให้ 0.8% agarose gel electrophoresis โดยใช้ความต่างศักย์ที่ 135 โวลต์ เป็นเวลา 20 นาที

แถบที่ 1-16 : PCR product ของไก่อฟ้าหลังเทาเข้มแดง จากสถานีเพาะเลี้ยงสัตว์ป่าเขาสน จ. ราชบุรี (LLC2, LLC4, LLC6, LLC8, LLC10, LLC12, LLC16, LLC18, LLC20, LLC22, LLC24, LLC26, LLC28, LLC30, LLC32 และ LLC34 ตามลำดับ)

แถบ M : 100 bp + 1.5 kb DNA ladder

3.3 ข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) ของไก่อฟ้าหลังขาวและไก่อฟ้าหลังเทา จากกรงเลี้ยงในพื้นที่ต่าง ๆ ของประเทศไทย

จากผล PCR product ของยีนดีลูบในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของไก่อฟ้าทั้ง 4 ชนิดย่อย ได้แก่ ไก่อฟ้าหลังขาวโจนส์, ไก่อฟ้าหลังขาวจันทบุรี, ไก่อฟ้าหลังเทาเข้มแดง และไก่อฟ้าหลังเทาเข้มเทา จากกรงเลี้ยงในพื้นที่ต่างๆ ของประเทศไทยได้ PCR product ที่สำเร็จทั้งหมด 154 ตัวอย่างจากทั้ง 5 พื้นที่ที่ทำการศึกษา ผลการศึกษาพบว่า 152 ตัวอย่าง ให้ผล sequencing ที่ชัดเจนน่าเชื่อถือและไม่เกิดการซ้อนทับกันของลำดับเบส (ตารางที่ 3) โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มีความยาวประมาณ 1,113 คู่เบส (ภาคผนวก) เป็นเบสที่มีเปอร์เซ็นต์ A+T เฉลี่ยเท่ากับ 58.9 มี nucleotide composition คือ T(32.1%), C(26.3%), A(26.8%) และ G(14.8%) จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม Dnasp พบจำนวน haplotype ที่แตกต่างกันจำนวน 15 haplotype ที่มีความแปรผันทางพันธุกรรมจำนวน 54 (4.85%) ตำแหน่ง (ภาคผนวก) นอกจากนี้ในการหาค่าระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) โดยวิธี Kimura two parameter พบว่าระหว่างประชากรของไก่อฟ้าหลังขาวและไก่อฟ้าหลังเทา มีค่า genetic distance อยู่ระหว่าง 0.030 ถึง 0.039 แสดงว่าไก่อฟ้าหลังขาวและไก่อฟ้าหลังเทามีความแตกต่างกันทางพันธุกรรม ส่วนค่า genetic distance ภายในกลุ่มประชากรไก่อฟ้าแต่ละชนิดย่อย มีค่าดังนี้: ไก่อฟ้าหลังขาวโจนส์ (0.000-0.002), ไก่อฟ้าหลังขาวจันทบุรี (0.000-0.001), ไก่อฟ้าหลังเทาเข้มแดง (0.000-0.004) และไก่อฟ้าหลังเทาเข้มเทา (0.000-0.004) (รูปที่ 16-19 ตามลำดับ) จากข้อมูลดังกล่าวจะเห็นได้ว่าค่า genetic distance ภายในกลุ่มประชากรไก่อฟ้าแต่ละชนิดย่อยมีค่าน้อยมาก และมีค่าไม่แตกต่างกันระหว่างไก่อฟ้าทั้งสี่ชนิดย่อย

นอกจากนี้ จากการวิเคราะห์ข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรมอื่นๆ เช่น จำนวน mutation, จำนวนของ haplotype, ค่าความหลากหลายของแฮพโลไทป์ (haplotype diversity) และค่าความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์ (nucleotide diversity) ด้วยโปรแกรม DnaSP ของไก่อฟ้าแต่ละชนิดย่อย พบว่าไก่อฟ้าหลังเทาเข้มเทามีจำนวน haplotype มากที่สุดคือ 8 haplotype จากจำนวนตัวอย่างที่เก็บ 68 ตัวอย่าง รองลงมาคือ ไก่อฟ้าหลังเทาเข้มแดง, ไก่อฟ้าหลังขาวโจนส์ และ ไก่อฟ้าหลังขาวจันทบุรี โดยพบ haplotype จำนวน 5 (n=20), 3 (n=41) และ 2 (n=21)

ตามลำดับ (ตารางที่ 4) ซึ่งจำนวน haplotype ที่พบในไผ่แต่ละชนิดย่อยนี้สอดคล้องกับค่า haplotype diversity ที่คำนวณได้ กล่าวคือ ค่า haplotype diversity ของไผ่หลังขาวโจนส์, ไผ่หลังขาวจันทบูร, ไผ่หลังเทาเข้มแดงและไผ่หลังเทาเข้มเทามีค่าเท่ากับ 0.571, 0.467, 0.679 และ 0.805 ตามลำดับ และค่า nucleotide diversity มีค่าเท่ากับ 0.00058, 0.00042, 0.00151 และ 0.00143 ตามลำดับ โดยเฉลี่ยของทุกประชากร haplotype diversity มีค่าเท่ากับ 0.898 และ nucleotide diversity มีค่าเท่ากับ 0.01807 (ตารางที่ 4) จากผลการศึกษาที่ได้พบว่าไผ่หลังเทาเข้มเทามีค่า haplotype diversity สูงสุด และไผ่หลังเทาเข้มแดงมีค่า nucleotide diversity สูงสุด นอกจากนี้ยังพบว่าไผ่หลังขาวโจนส์มีค่า haplotype diversity และ nucleotide diversity สูงกว่าไผ่หลังขาวจันทบูร และไผ่หลังเทาเข้มเทามีค่า haplotype diversity สูงกว่าไผ่หลังเทาเข้มแดง แต่มีค่า nucleotide diversity ต่ำกว่าไผ่หลังเทาเข้มแดง (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 แสดงค่าความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) ของไผ่หลังขาวและไผ่หลังเทาแต่ละชนิดย่อยจากกรงเลี้ยงในพื้นที่ต่างๆ ของประเทศไทย ตัวอักษรย่อในตาราง: n = จำนวนตัวอย่าง, m = จำนวนของ mutation, h = จำนวนของ haplotype, hd = haplotype diversity และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($\pm$ S.D) และ π = nucleotide diversity และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($\pm$ S.D)

Subspecies	n	m	h	$hd \pm S.D$	$\pi \pm S.D$
ไผ่หลังขาวโจนส์	41	2	3	0.571 ± 0.057	0.00058 ± 0.00008
ไผ่หลังขาวจันทบูร	21	1	2	0.467 ± 0.075	0.00042 ± 0.00007
ไผ่หลังเทาเข้มแดง	20	5	5	0.679 ± 0.080	0.00151 ± 0.00019
ไผ่หลังเทาเข้มเทา	70	10	8	0.805 ± 0.022	0.00143 ± 0.00010
All subspecies	152	55	15	0.898 ± 0.009	0.01807 ± 0.00067

หมายเหตุ

Haplotype diversity (hd) หมายถึง จำนวนและความถี่ของ haplotype ที่แตกต่างกันที่พบในตัวอย่าง โดยคำนวณจาก $hd = (1 - \sum x_i^2) / (n - 1)$ (Nei and Tajima, 1981) เมื่อ x_i คือ ความถี่ของ haplotype และ n คือ จำนวนตัวอย่าง

Nucleotide diversity (π) หมายถึง ค่าเฉลี่ยของจำนวน nucleotide ที่แตกต่างกันต่อ 1 ตำแหน่ง เมื่อเทียบกับ sequence อื่นๆ แบบสุ่ม โดยคำนวณจาก

$$\pi = n / (n - 1) \sum x_i x_j \pi_{ij} \quad (\text{Nei 1978, equation 10.5}) \text{ หรือ}$$

$$\pi = \sum x_{ij} / n_c \quad (\text{Nei 1978, equation 10.6})$$

เมื่อ n คือ จำนวน sequence ที่ทำการวิเคราะห์ผล, x_i คือ ความถี่ของรูปแบบ i^{th} ใน sequence ของดีเอ็นเอตัวอย่าง และ n_c คือ จำนวน sequence ทั้งหมดที่ทำการเปรียบเทียบ

รูปที่ 16 แสดงค่า genetic distance ภายในประชากรของไก่ฟ้าหลังขาวโจนส์จำนวน 41 ตัวอย่าง คำนวณโดยใช้ Kimura 2-parameter model โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใช้ในการคำนวณ มีความยาวเท่ากับ 1,113 คู่เบส หมายถึง LNJ คือ ไก่ฟ้าหลังขาวโจนส์, SD คือ สถานีเพาะเลี้ยงสัตว์ป่าเขาสอยดาว และ HK คือ เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง

	LNLS1M	LNLS2F	LNLS3M	LNLS4F	LNLS5M	LNLS6F	LNLS7M	LNLS8F	LNLS9M	LNLS10F	LNLS11M	LNLS12F	LNLS13M	LNLS14F	LNLS15M	LNLS16F	LNLS17M	LNLS18F	LNLS19M	LNLS20F	LNLS21M
LNLS1M																					
LNLS2F	0.001																				
LNLS3M	0.000	0.001																			
LNLS4F	0.001	0.000	0.001																		
LNLS5M	0.001	0.000	0.001	0.000																	
LNLS6F	0.000	0.001	0.000	0.001	0.001																
LNLS7M	0.000	0.001	0.000	0.001	0.001	0.000															
LNLS8F	0.001	0.000	0.001	0.000	0.000	0.001	0.001														
LNLS9M	0.001	0.000	0.001	0.000	0.000	0.001	0.001	0.000													
LNLS10F	0.001	0.000	0.001	0.000	0.000	0.001	0.001	0.000	0.000												
LNLS11M	0.000	0.001	0.000	0.001	0.001	0.000	0.000	0.001	0.001	0.001											
LNLS12F	0.001	0.000	0.001	0.000	0.000	0.001	0.001	0.000	0.000	0.000	0.001										
LNLS13M	0.001	0.000	0.001	0.000	0.000	0.001	0.001	0.000	0.000	0.000	0.001	0.000									
LNLS14F	0.001	0.000	0.001	0.000	0.000	0.001	0.001	0.000	0.000	0.000	0.001	0.000	0.000								
LNLS15M	0.001	0.000	0.001	0.000	0.000	0.001	0.001	0.000	0.000	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000							
LNLS16F	0.000	0.001	0.000	0.001	0.001	0.000	0.000	0.001	0.001	0.001	0.000	0.001	0.001	0.001	0.001						
LNLS17M	0.001	0.000	0.001	0.000	0.000	0.001	0.001	0.000	0.000	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001					
LNLS18F	0.000	0.001	0.000	0.001	0.001	0.000	0.000	0.001	0.001	0.001	0.000	0.001	0.001	0.001	0.001	0.000	0.001				
LNLS19M	0.001	0.000	0.001	0.000	0.000	0.001	0.001	0.000	0.000	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.000	0.001			
LNLS20F	0.001	0.000	0.001	0.000	0.000	0.001	0.001	0.000	0.000	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.000	0.001	0.000		
LNLS21M	0.001	0.000	0.001	0.000	0.000	0.001	0.001	0.000	0.000	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.000	0.001	0.000	0.000	

รูปที่ 17 แสดงค่า genetic distance ภายในประชากรของไก่ฟ้าหลังขาวจันทบูร จำนวน 21 ตัวอย่าง คำนวณโดยใช้ Kimura 2-parameter model โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใช้ในการคำนวณมีความยาวเท่ากับ 1,113 คู่เบส หมายถึง LNL คือ ไก่ฟ้าหลังขาวจันทบูร และ SD คือ สถานที่เพาะเลี้ยงสัตว์ป่าเขาสอยดาว

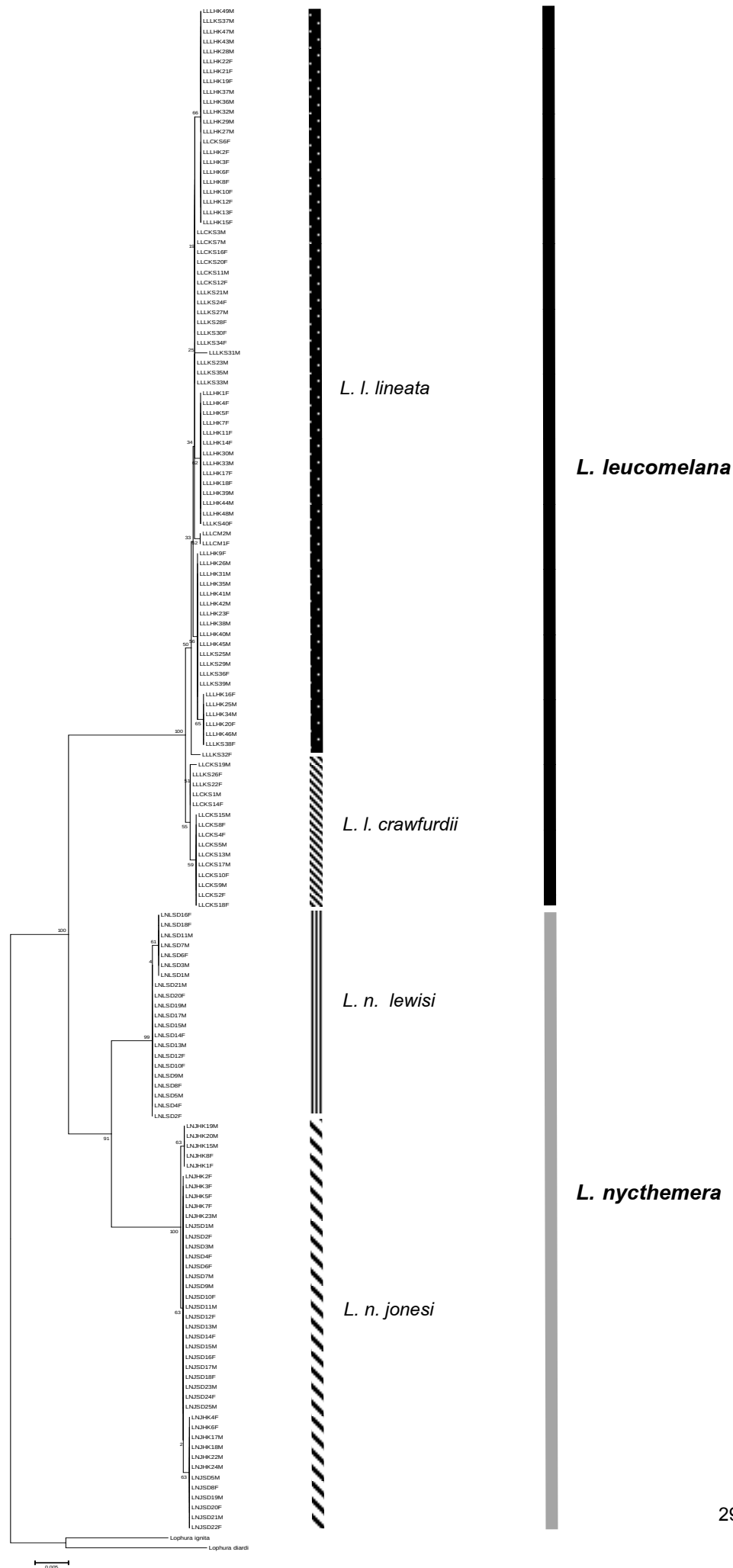
	LLCKS3M	LLCKS6F	LLCKS7M	LLCKS16F	LLCKS20F	LLCKS11M	LLCKS14F	LLCKS1M	LLCKS19M	LLCKS15M	LLCKS8F	LLCKS4F	LLCKS5M	LLCKS13M	LLCKS17M	LLCKS12F	LLCKS10F	LLCKS9M	LLCKS2F	LLCKS18F
LLCKS3M																				
LLCKS6F	0.001																			
LLCKS7M	0.000	0.001																		
LLCKS16F	0.000	0.001	0.000																	
LLCKS20F	0.000	0.001	0.000	0.000																
LLCKS11M	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000															
LLCKS14F	0.002	0.003	0.002	0.002	0.002	0.002														
LLCKS1M	0.002	0.003	0.002	0.002	0.002	0.002	0.000													
LLCKS19M	0.003	0.004	0.003	0.003	0.003	0.003	0.001	0.001												
LLCKS15M	0.003	0.004	0.003	0.003	0.003	0.003	0.001	0.001	0.002											
LLCKS8F	0.003	0.004	0.003	0.003	0.003	0.003	0.001	0.001	0.002	0.000										
LLCKS4F	0.003	0.004	0.003	0.003	0.003	0.003	0.001	0.001	0.002	0.000	0.000									
LLCKS5M	0.003	0.004	0.003	0.003	0.003	0.003	0.001	0.001	0.002	0.000	0.000	0.000								
LLCKS13M	0.003	0.004	0.003	0.003	0.003	0.003	0.001	0.001	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000							
LLCKS17M	0.003	0.004	0.003	0.003	0.003	0.003	0.001	0.001	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000						
LLCKS12F	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.002	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003					
LLCKS10F	0.003	0.004	0.003	0.003	0.003	0.003	0.001	0.001	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.003				
LLCKS9M	0.003	0.004	0.003	0.003	0.003	0.003	0.001	0.001	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.003	0.000			
LLCKS2F	0.003	0.004	0.003	0.003	0.003	0.003	0.001	0.001	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.003	0.000	0.000		
LLCKS18F	0.003	0.004	0.003	0.003	0.003	0.003	0.001	0.001	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.003	0.000	0.000	0.000	

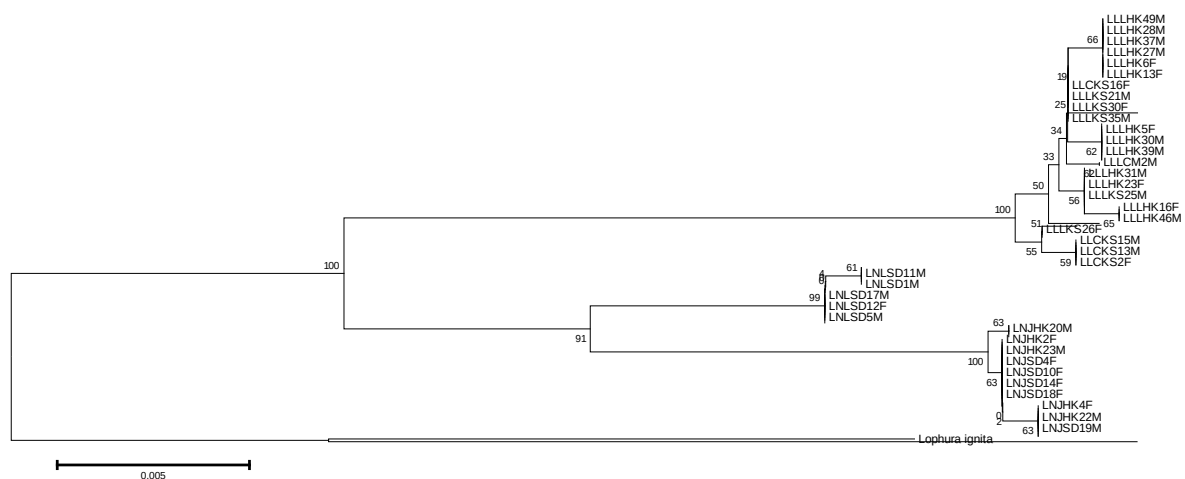
รูปที่ 18 แสดงค่า genetic distance ภายในประชากรไก่ฟ้าหลังเทาเข้มแดง จำนวน 20 ตัวอย่าง คำนวณโดยใช้ Kimura 2-parameter model โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใช้ในการคำนวณ มีความยาวเท่ากับ 1,113 คู่เบส หมายถึง LLC คือ ไก่ฟ้าหลังเทาเข้มแดง และ KS คือ สถานีเพาะเลี้ยงสัตว์ป่าเขาสน

รูปที่ 19 แสดงค่า genetic distance ภายในประชากรไก่ฟ้าหลังเทาเข้มเทา จำนวน 70 ตัวอย่าง คำนวณโดยใช้ Kimura 2-parameter model โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใช้ในการคำนวณมีความยาวเท่ากับ 1,113 คู่เบส หมายถึง LLL คือ ไก่ฟ้าหลังเทาเข้มเทา, KS คือ สถานที่เพาะเลี้ยงสัตว์ป่าเขาสน, HK คือ เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง และ CM คือ สวนสัตว์เชียงใหม่

3.3 ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระหว่างไก่อ้าหลังขาวและไก่อ้าหลังเทา จากกรงเลี้ยงในพื้นที่ต่าง ๆ ของประเทศไทย

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระหว่างชนิดย่อยของไก่อ้าหลังขาวและไก่อ้าหลังเทา จากกรงเลี้ยงในพื้นที่ต่าง ๆ ของประเทศไทยโดยการสร้าง phylogenetic tree ด้วยวิธี Maximum likelihood และ Neighbor-joining (โดยใช้ Kimura 2-parameter โดย estimate transition/transversion ratio พบว่าค่า transition:transversion มีค่าเท่ากับ 6.92 ซึ่งมากกว่า 2 ดังนั้นจึงสามารถใช้ Kimura 2-parameter model ได้) ที่ bootstrap probability ทั้งหมด 1,000 ครั้งสำหรับทั้งสองวิธี ผลการศึกษาที่ได้พบว่า phylogenetic tree ที่สร้างโดย Neighbor-joining และ Maximum likelihood แสดง tree topology ที่สอดคล้องกัน (รูปที่ 20 และ 21) กล่าวคือ พบว่า tree ที่ได้สามารถแบ่งไก่อ้าออกเป็น 2 clade ใหญ่ๆ อย่างชัดเจนตามลักษณะสัณฐานภายนอก ได้แก่ clade ของไก่อ้าหลังขาว (*L. nycthemera*) และ clade ของไก่อ้าหลังเทา (*L. leucomelana*) ด้วยค่า bootstrap probability ที่สนับสนุนถึง 100% โดยใน clade ของไก่อ้าหลังขาวประกอบด้วยไก่อ้าหลังขาวโจนส์และไก่อ้าหลังขาวจันทบูร โดยไก่อ้าทั้งสองชนิดย่อยถูกจัดแยกกลุ่มกันอย่างชัดเจน (จัดอยู่คนละ clade ย่อยกัน) ด้วยค่า bootstrap probability เท่ากับ 83% และ 91% สำหรับ Maximum likelihood tree และ Neighbor-joining tree ตามลำดับ แสดงว่าไก่อ้าหลังขาวโจนส์และไก่อ้าหลังขาวจันทบูรมีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมอย่างชัดเจน (ค่า genetic distance ระหว่างไก่อ้าทั้งสองชนิดย่อยมีค่าอยู่ระหว่าง 0.016-0.018) ส่วนใน clade ของไก่อ้าหลังเทาก็คประกอบด้วยไก่อ้าหลังเทาแข่งเทาและไก่อ้าหลังเทาแข่งแดงที่ถูกจัดแยกออกเป็นสองกลุ่มย่อยชัดเจน (รูปที่ 20 และ 21) แสดงว่าไก่อ้าหลังเทาแข่งเทาและไก่อ้าหลังเทาแข่งแดงก็มีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมอย่างชัดเจน โดย genetic distance ระหว่างไก่อ้าทั้งสองชนิดย่อยมีค่าอยู่ระหว่าง 0.003-0.005 จากผลที่ได้แสดงว่าไก่อ้าทั้งสองชนิดย่อยมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาและพันธุกรรมที่แตกต่างกัน นอกจากนี้ยังพบไก่อ้าที่มีลักษณะสัณฐานภายนอกเหมือนกับไก่อ้าหลังเทาแข่งแดง แต่ไม่มีโทคอนเดรียลดีเอ็นเอแฮฟโพลไทป์ของไก่อ้าหลังเทาแข่งเทา จำนวน 10 ตัวอย่าง (ได้แก่ LLCKS1M, LLCKS3M, LLCKS6F, LLCKS7M, LLCKS11M, LLCKS12F, LLCKS14F, LLCKS16F, LLCKS19M และ LLCKS20F) ใน clade *L. l. lineata* อีกด้วย (รูปที่ 21)

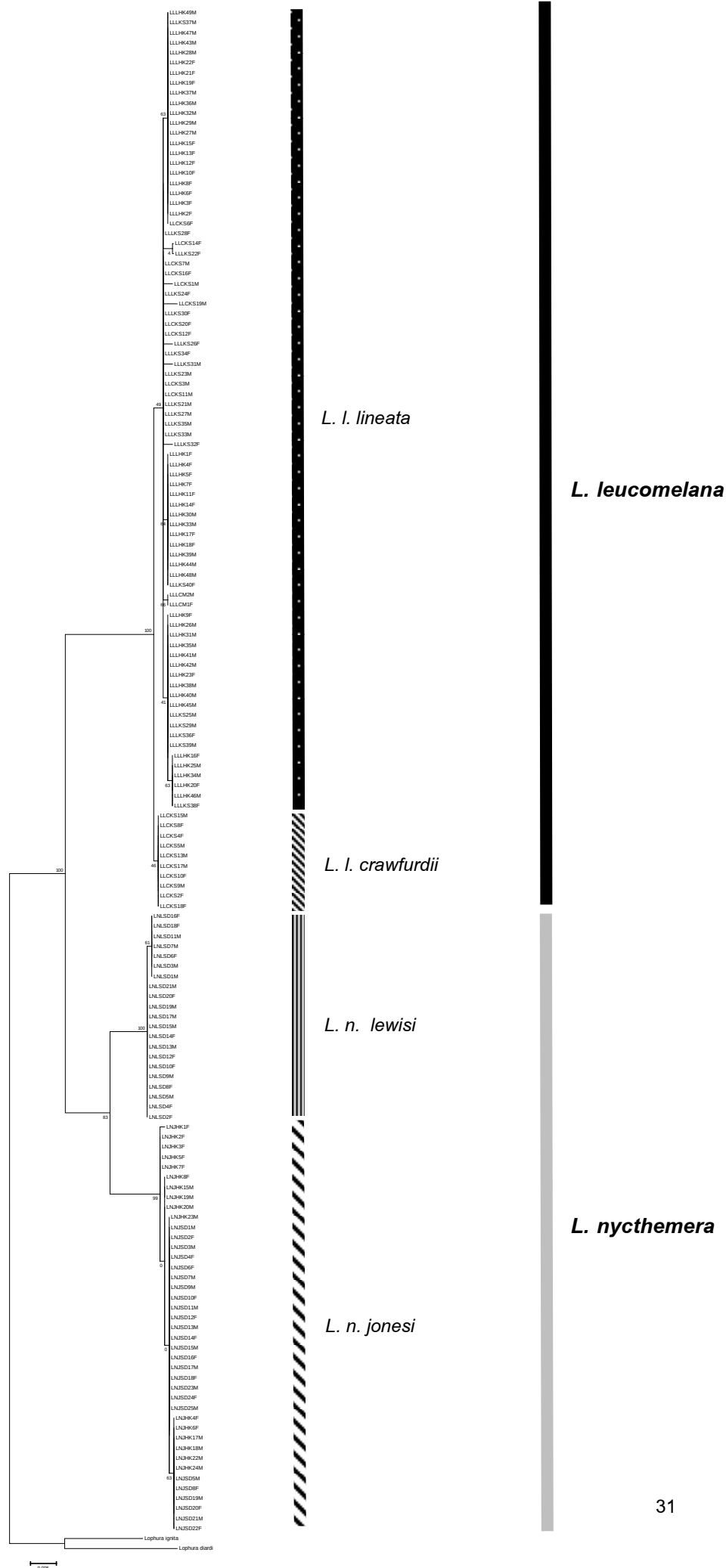


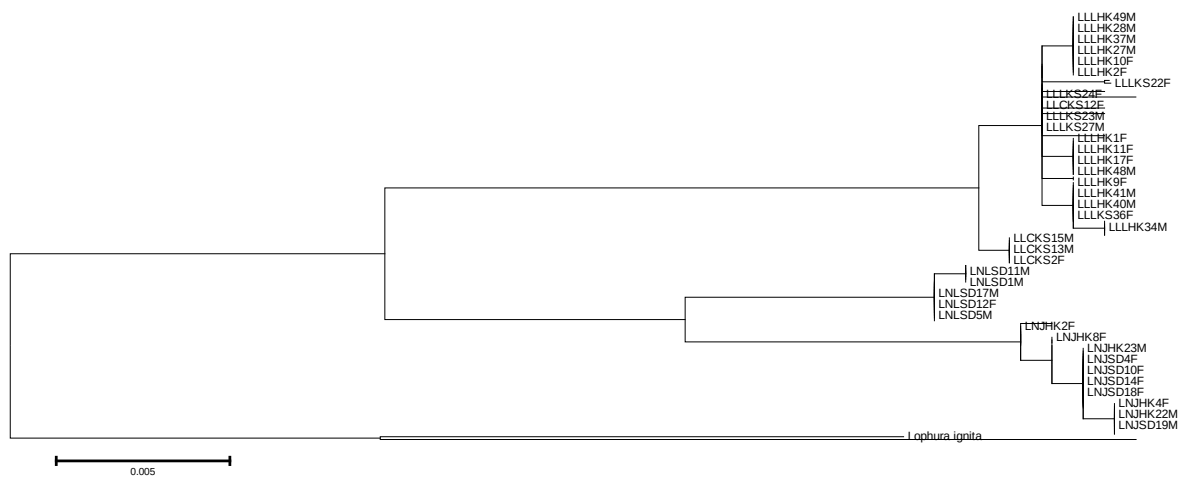


รูปที่ 20 แสดง phylogenetic tree ของยีนดีลูบในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของไก่อฟ้าหลังขาวและไก่อฟ้าหลังเทาจากกรงเลี้ยงในพื้นที่ต่างๆ ของประเทศไทยที่สร้างโดยวิธี Neighbor-joining โดยใช้ Kimura 2-parameter model ตัวเลขที่กำกับแสดงค่า bootstrap probability จากการทำ 1,000 ซ้ำ โดยใช้ไก่อฟ้าหน้าเขียว (*Lophura ignita*) และไก่อฟ้าพญาลอ (*L. diardi*) เป็น outgroup

หมายเหตุ

- LNJ = ไก่อฟ้าหลังขาวโจนส์
- LNL = ไก่อฟ้าหลังขาวจันทบุรี
- LLC = ไก่อฟ้าหลังเทาเข้มแดง
- LLL = ไก่อฟ้าหลังเทาเข้มเทา
- SD = สถานีเพาะเลี้ยงสัตว์ป่าเขาซอยดาว จังหวัดจันทบุรี
- HK = เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง จังหวัดอุทัยธานี
- KS = สถานีเพาะเลี้ยงสัตว์ป่าเขาสน จังหวัดราชบุรี
- CM = สวนสัตว์เชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่
- F = เพศเมีย
- M = เพศผู้





รูปที่ 21 แสดง phylogenetic tree ของยีนดีลูบในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของไก่อฟ้าหลังขาวและไก่อฟ้าหลังเทา จากกรงเลี้ยงในพื้นที่ต่างๆ ของประเทศไทยที่สร้างโดยวิธี Maximum Likelihood ตัวเลขที่กำกับแสดงค่า bootstrap probability จากการทำ 1,000 ซ้ำ โดยใช้ไก่อฟ้าหน้าเขียว (*Lophura ignita*) และไก่อฟ้าพญาล่อ (*L. diardi*) เป็น outgroup

หมายเหตุ

- LNJ = ไก่อฟ้าหลังขาวโจนส์
- LNL = ไก่อฟ้าหลังขาวจันทบูร
- LLC = ไก่อฟ้าหลังเทาเข้มแดง
- LLL = ไก่อฟ้าหลังเทาเข้มเทา
- SD = สถานีเพาะเลี้ยงสัตว์ป่าเขาซอยดาว จังหวัดจันทบุรี
- HK = เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง จังหวัดอุทัยธานี
- KS = สถานีเพาะเลี้ยงสัตว์ป่าเขาสน จังหวัดราชบุรี
- CM = สวนสัตว์เชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่
- F = เพศเมีย
- M = เพศผู้

วิจารณ์ผลการทดลอง

ผลการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของไก่ฟ้าหลังขาวและไก่ฟ้าหลังเทา จากกรงเลี้ยงในพื้นที่ต่างๆ ของประเทศไทยทั้งหมด 154 ตัวอย่าง พบว่ามี 152 ตัวอย่างให้ผล sequencing ที่ชัดเจนและไม่มีการซ้อนทับกันของลำดับเบส ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มีความยาวเท่ากับ 1,113 คู่เบส ค่า genetic distance ระหว่างไก่ฟ้าหลังขาวและไก่ฟ้าหลังเทา มีค่าระหว่าง 0.030 ถึง 0.039 แสดงว่าไก่ฟ้าหลังขาวและไก่ฟ้าหลังเทามีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมอย่างชัดเจน ส่วนค่า genetic distance ภายในประชากรของไก่ฟ้าแต่ละชนิดย่อย มีค่าดังนี้: ไก่ฟ้าหลังขาวโจนส์ (0.000-0.002), ไก่ฟ้าหลังขาวจันทบุรี (0.000-0.001), ไก่ฟ้าหลังเทาแข้งแดง (0.000-0.004) และไก่ฟ้าหลังเทาแข้งเทา (0.000-0.004) จะเห็นได้ว่าภายในกลุ่มประชากรไก่ฟ้าแต่ละชนิดย่อยมีความแตกต่างทางพันธุกรรมน้อยมาก และมีค่าไม่แตกต่างกันระหว่างไก่ฟ้าทั้งสี่ชนิดย่อย ผลการศึกษาพบว่าภายในกลุ่มประชากรไก่ฟ้าหลังขาวมีค่า genetic distance น้อยกว่าภายในประชากรไก่ฟ้าหลังเทา นอกจากนี้ จากจำนวน sequence ทั้งหมด 152 sequence พบจำนวน haplotype ที่แตกต่างกันจำนวน 15 haplotype ที่มีความแปรผันทางพันธุกรรมจำนวน 54 ตำแหน่ง ค่า haplotype diversity (0.898) และค่า nucleotide diversity (0.01807) โดยเฉลี่ยมีค่าค่อนข้างสูง ไก่ฟ้าหลังเทาแข้งเทามีค่า haplotype diversity สูงสุด และไก่ฟ้าหลังเทาแข้งแดงมีค่า nucleotide diversity สูงสุด การที่พบว่าไก่ฟ้าหลังเทาแข้งเทามีค่า haplotype diversity สูงที่สุดอาจเป็นเพราะมีจำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษามากที่สุด ($n=70$) เมื่อเปรียบเทียบกับไก่ฟ้าชนิดย่อยอื่นๆ แต่จากผลการศึกษาที่ได้ในไก่ฟ้าชนิดย่อยอื่นๆ จะเห็นได้ว่าจำนวน haplotype และค่า haplotype diversity ที่ได้ไม่ได้สอดคล้องกับจำนวนตัวอย่างที่เก็บได้ กล่าวคือ ไก่ฟ้าหลังขาวโจนส์มีจำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาเท่ากับ 41 ตัวอย่าง มีจำนวน haplotype เท่ากับ 3 และมีค่า haplotype diversity เท่ากับ 0.571 ในขณะที่ไก่ฟ้าหลังเทาแข้งแดงมีจำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาเท่ากับ 20 ตัวอย่าง มีจำนวน haplotype เท่ากับ 5 และมีค่า haplotype diversity เท่ากับ 0.679 ซึ่งผลการศึกษาที่ได้ครั้งนี้คล้ายกับผลการศึกษาของ Penchart และคณะในปี ค.ศ. 2012 ที่ทำการศึกษาเกี่ยวกับความหลากหลายทางพันธุกรรมของไก่ฟ้าในสภาพกรงเลี้ยง (Penchart et al., 2012)

เมื่อพิจารณาค่า nucleotide diversity พบว่าโดยรวมค่าดังกล่าวมีความสอดคล้องกับพื้นที่การกระจายตัวของไก่ฟ้าแต่ละชนิดย่อยในธรรมชาติ ยกตัวอย่างเช่น ไก่ฟ้าหลังขาวจันทบุรี พบกระจายตัวเฉพาะบางจังหวัดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือถึงทางภาคใต้ของประเทศ ดังนั้นจึงมีค่า nucleotide diversity (0.00042) ต่ำสุดเมื่อเปรียบเทียบกับไก่ฟ้าชนิดย่อยอื่นๆ ในขณะที่ไก่ฟ้าหลังเทาแข้งแดงและไก่ฟ้าหลังเทาแข้งเทามีการกระจายตัวค่อนข้างกว้าง พบได้ตั้งแต่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือถึงทางภาคใต้ของประเทศ ดังนั้นจึงมีค่า nucleotide diversity สูง (0.00151 และ 0.00143 ตามลำดับ) ซึ่งผลการศึกษาที่ได้นี้ก็สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Penchart และคณะเช่นเดียวกัน (Penchart et al., 2012) นอกจากนี้ ยังพบว่าไก่ฟ้าหลังขาวโจนส์ มีค่า haplotype diversity และ nucleotide diversity สูงกว่าไก่ฟ้าหลังขาวจันทบุรี และไก่ฟ้าหลังเทาแข้งเทามีค่า haplotype diversity สูงกว่าไก่ฟ้าหลังเทาแข้งแดง แต่ nucleotide diversity มีค่าต่ำกว่าไก่ฟ้าหลังเทาแข้งแดง จากผลการศึกษาที่ได้พบความแปรผันทางพันธุกรรมระหว่างไก่ฟ้าหลังขาวและไก่ฟ้าหลังเทาค่อนข้างสูง เนื่องจากในการศึกษานี้ได้ทำการศึกษาในดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ ซึ่งเป็น noncoding และ control region กล่าวคือ เป็นบริเวณที่มีโอกาสพบความแปรผันทางพันธุกรรมระหว่างชนิดหรือระหว่างชนิดย่อยสูง โดยในการศึกษานี้ได้ทำการเพิ่มปริมาณยีนดีเอ็นเอแบบ full length ครอบคลุมทั้ง 3 regions ได้แก่ 1) hypervariable region I เป็นบริเวณที่มีโอกาสเจอ mutation ค่อนข้างสูง 2) central conserved region II เป็นบริเวณที่ไม่ค่อยเกิด mutation เนื่องจากเป็นบริเวณที่ conserve และ 3) hypervariable region III เป็นบริเวณที่มีโอกาสเจอ mutation สูง แต่ต่ำกว่า hypervariable region I (Desjardins and Morais, 1990; Quinn and Wilson, 1993)

เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลทางด้าน phylogenetic tree ที่สร้างโดยวิธี Neighbor-joining และ Maximum likelihood ที่ bootstrap probability ทั้งหมด 1,000 ครั้ง พบว่า tree ที่ได้สามารถแบ่งไก่ฟ้าหลังขาวและไก่ฟ้าหลังเทาออกเป็น 2 clade ใหญ่ๆ อย่างชัดเจนด้วยค่า bootstrap probability ที่สนับสนุนถึง 100% แสดงว่าฟ้าหลังขาวและไก่ฟ้าหลังเทามี

ความแตกต่างทางพันธุกรรมอย่างชัดเจน สามารถจำแนกออกเป็น 2 ชนิดตามลักษณะสัณฐานภายนอก นอกจากนี้ยังพบว่าไผ่ทั้งสี่ชนิดย่อยก็มีความแตกต่างทางพันธุกรรมของยีนดีลูบ และแบ่งออกเป็นกลุ่มย่อยๆ 4 กลุ่มตามลักษณะสัณฐานภายนอกของชนิดย่อย โดยในความสัมพันธ์ระหว่างชนิดย่อยของไผ่หลังขาวจะเห็นได้ว่าการแบ่งออกเป็น 2 clade เช่นกันด้วยค่า bootstrap probability ที่มากกว่า 83% ทำให้ไผ่หลังขาวแบ่งเป็น 2 ชนิดย่อย ได้แก่ ไผ่หลังขาวโจนส์และไผ่หลังขาวจันทบูร ซึ่งเมื่อนำผลไปวิเคราะห์เปรียบเทียบกับผลการศึกษาของนางสาวขวัญฤทัย โชติพิชญานุกูล ในปี พ.ศ. 2554 ที่ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระดับโมเลกุลของไผ่หลังขาวจันทบูรกับไผ่หลังขาวโจนส์ โดยเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีนดีลูบในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ (เฉพาะบริเวณ hypervariable region I ของยีนดีลูบ) พบว่าข้อมูลที่ได้มีความสอดคล้องกัน กล่าวคือพบว่า ไผ่หลังขาวโจนส์และไผ่หลังขาวจันทบูรมีความใกล้ชิดกันภายในกลุ่มประชากรมากกว่าระหว่างกลุ่มประชากร และมีความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการแบบ monophyletic group (ขวัญฤทัย โชติพิชญานุกูล, 2554) นอกจากนี้ การศึกษารังนี้ยังพบว่าไผ่หลังเทาที่แยกออกเป็น 2 กลุ่มย่อยเช่นกัน ได้แก่ ไผ่หลังเทาเข้มแดงและไผ่หลังเทาเข้มเทา แต่มีความแปรผันทางพันธุกรรมระหว่างชนิดย่อยน้อยกว่าในไผ่หลังขาว

การพบไผ่ที่มีลักษณะสัณฐานภายนอกเหมือนกับไผ่หลังเทาเข้มแดง แต่มีไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอสเปคไทป์ของไผ่หลังเทาเข้มเทา จำนวน 10 ตัวอย่าง (ได้แก่ LLCKS1M, LLCKS3M, LLCKS6F, LLCKS7M, LLCKS11M, LLCKS12F, LLCKS14F, LLCKS16F, LLCKS19M และ LLCKS20F) ใน clade ของไผ่หลังเทาเข้มเทา แสดงว่าน่าจะเป็นผลมาจากการเกิด gene flow ของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ (mtDNA) ระหว่างไผ่หลังเทาเข้มเทาและไผ่หลังเทาเข้มแดง หรืออาจกล่าวได้ว่าไผ่หลังเทาเข้มแดงที่เก็บตัวอย่างมานั้นน่าจะเป็นลูกผสมที่เกิดจากการผสมข้ามสายพันธุ์ระหว่างไผ่หลังเทาเข้มเทาและไผ่หลังเทาเข้มแดงในอดีต ทั้งนี้อาจเกิดจากความผิดพลาดในการจับคู่สมพันธุ์ในกรงเลี้ยง เนื่องจากจะสังเกตได้ว่าไผ่หลังเทาเข้มเทาและไผ่หลังเทาเข้มแดงทั้งเพศผู้และเพศเมียมีลักษณะสัณฐานภายนอกคล้ายคลึงกันมาก ทำให้ยากต่อการจำแนกชนิดย่อยของไผ่ทั้งสองชนิดย่อย ประกอบกับที่สถานเพาะเลี้ยงสัตว์ป่าเขาสน จังหวัดราชบุรี ซึ่งเป็นสถานที่ที่ได้เก็บตัวอย่างไผ่หลังเทาเข้มแดงมานั้น เป็นแหล่งที่เพาะเลี้ยงและเพาะพันธุ์ทั้งไผ่หลังเทาเข้มเทาและไผ่หลังเทาเข้มแดง ดังนั้นจึงเป็นไปได้ที่เจ้าหน้าที่ที่ไม่ชำนาญ อาจจำแนกชนิดย่อยของไผ่หลังเทาไม่ถูกต้องจนเกิดความผิดพลาดในการจับคู่สมพันธุ์ในกรงเลี้ยง จากผลการศึกษาที่ได้จะเห็นได้ว่าไผ่หลังเทาเข้มเทาและไผ่หลังเทาเข้มเทามีความแตกต่างทางพันธุกรรมของยีนดีลูบในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ ดังนั้นเพื่อไม่ให้เกิดความผิดพลาดในการจำแนกชนิดย่อยของไผ่ทั้งสองชนิดย่อยในกรงเลี้ยง จึงควรใช้ยีนดีลูบเป็น genetic marker ในการระบุชนิดย่อย ทั้งนี้เพื่อความถูกต้องในการจับคู่สมพันธุ์ไผ่ในกรงเลี้ยงในอนาคต และนอกจากนี้ยังสามารถใช้ยีนดีลูบเป็น genetic marker ในการระบุชนิดย่อยของไผ่หลังขาวได้อีกด้วย การเกิด gene flow ของ mtDNA ที่ตรวจพบได้ในครั้งนี้พบได้เพียงทิศทางเดียว คือ mtDNA จากประชากรของไผ่หลังเทาเข้มเทา introgress สู่ประชากรของไผ่หลังเทาเข้มแดง หรืออาจกล่าวได้ว่าการเกิดการผสมข้ามสายพันธุ์ระหว่างไผ่หลังเทาเข้มเทาและไผ่หลังเทาเข้มแดงในกรงเลี้ยงในอดีตนั้น สามารถเกิดขึ้นได้ประสบความสำเร็จทิศทางเดียว โดยเพศเมียของไผ่หลังเทาเข้มเทาน่าจะสามารถให้กำเนิดลูกผสมได้สำเร็จนั่นเอง ซึ่งการตรวจพบการเกิดการผสมข้ามสายพันธุ์ในกลุ่มไผ่สกุล *Lophura* โดยใช้เทคนิคด้านอนุชีววิทยาและ mtDNA marker ในการตรวจสอบนั้นเคยมีรายงานพบใน *L. imperialis* ซึ่งคาดว่าน่าจะเป็นไผ่ลูกผสมระหว่างไผ่ชนิด *L. edwardsi*, *L. hatinhensis* และ *L. nycthemera* (Hennache et al., 2003) นอกจากนี้ Dong และคณะในปี ค.ศ. 2010 ยังพบว่าไผ่ชนิดย่อย *L. n. rufipes* ในประชากร Yingjiang ที่ประเทศจีน น่าจะเป็นลูกผสมระหว่างไผ่หลังขาวชนิดย่อย *L. n. occidentalis* และไผ่หลังเทาชนิดย่อย *L. l. lathamii* (Dong et al., 2010)

โดยสรุป ผลการวิจัยครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าไผ่หลังขาวและไผ่หลังเทามีความแตกต่างทางพันธุกรรมอย่างชัดเจน จึงควรจำแนกไผ่ทั้งสองชนิดนี้เป็นคนละชนิดกัน นอกจากนี้ไผ่หลังขาวโจนส์และไผ่หลังขาวจันทบูรก็มีความแตกต่างทางพันธุกรรมมากพอที่จะจำแนกให้เป็นไผ่หลังขาวคนละชนิดย่อยกัน สำหรับสถานภาพทาง

อนุกรมวิธานของไก่ฟ้าหลังเทาเข้มเทาและไก่ฟ้าหลังเทาเข้มแดงนั้น จากข้อมูลทางด้านพันธุกรรมที่ได้ผู้วิจัยเห็นว่า ไก่ฟ้าหลังเทาเข้มเทาและไก่ฟ้าหลังเทาเข้มแดงก็มีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมมากพอที่จะจำแนกเป็นคนละชนิดย่อยได้ อีกทั้งข้อมูลที่ได้ยังแสดงให้เห็นว่าไก่ฟ้าหลังเทาเข้มเทาและไก่ฟ้าหลังเทาเข้มแดงมีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้ชิดกับไก่ฟ้าหลังเทามากกว่าไก่ฟ้าหลังขาว ดังนั้นจึงควรจัดไก่ฟ้าหลังเทาเข้มเทาและไก่ฟ้าหลังเทาเข้มแดงให้เป็นชนิดย่อยของไก่ฟ้าหลังเทาดังเช่นเดิมมากกว่าที่จะจัดให้เป็นชนิดย่อยของไก่ฟ้าหลังขาว เนื่องจากไก่ฟ้าทั้งสองชนิดย่อยมีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมและมีความแตกต่างทางพันธุกรรมอย่างชัดเจนกับไก่ฟ้าหลังขาว

สรุปผลการทดลอง

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ 1) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างชนิดย่อยของไ้ฟ้าหลังขาว (*Lophura nycthemera*) และไ้ฟ้าหลังเทา (*L. leucomelana*) จากกรงเลี้ยงในพื้นที่ต่างๆ ของประเทศไทยทั้งภายในและระหว่างประชากรโดยวิเคราะห์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนดีลูบในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ 2) ศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการและสถานภาพทางอนุกรมวิธานของชนิดย่อยของไ้ฟ้าหลังขาวและไ้ฟ้าหลังเทาในกรงเลี้ยงจากพื้นที่ต่างๆ ของประเทศไทย 3) ประเมินความเป็นไปได้ในการเกิดการผสมข้ามสายพันธุ์ระหว่างชนิดย่อยของไ้ฟ้าหลังขาวและไ้ฟ้าหลังเทาโดยใช้เทคนิคทางด้านอนุชีววิทยา

ขั้นตอนการวิจัยเริ่มจากการเก็บตัวอย่างเส้นขนของไ้ฟ้า 4 ชนิดย่อยได้แก่ ไ้ฟ้า ไ้ฟ้าหลังขาวโจนส์, ไ้ฟ้าหลังขาวจันทบูร, ไ้ฟ้าหลังเทาเข้มแดง และไ้ฟ้าหลังเทาเข้มเทา จากกรงเลี้ยงในพื้นที่ต่างๆ ของประเทศไทย ได้แก่ สถานีเพาะเลี้ยงสัตว์ป่าเขาซอยดาว อำเภอโป่งน้ำร้อน จังหวัดจันทบุรี, เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง อำเภอลานสัก จังหวัดอุทัยธานี, สถานีเพาะเลี้ยงสัตว์ป่าเขาสน อำเภอจอมบึง จังหวัดราชบุรี และ สวนสัตว์เชียงใหม่ อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ รวมทั้งสิ้น 154 ตัวอย่าง จากนั้นทำการสกัดดีเอ็นเอ เพิ่มปริมาณยีนดีลูบในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอในหลอดทดลองด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ตรวจสอบขนาดของ PCR product ด้วยวิธีการ agarose gel electrophoresis และหาลำดับนิวคลีโอไทด์

ผลการศึกษาพบว่า มี 152 ตัวอย่าง ที่ให้ลำดับนิวคลีโอไทด์ชัดเจนและมีความน่าเชื่อถือ โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มีความยาว 1,113 เบส มีเบสที่มีเปอร์เซ็นต์ A+T เฉลี่ยเท่ากับ 58.9 มีความแปรผันทางพันธุกรรมจำนวน 54 (4.85%) ตำแหน่ง และมีจำนวน haplotype ที่แตกต่างกัน 15 haplotype โดยมีค่า haplotype diversity เฉลี่ยเท่ากับ 0.898 ± 0.009 และค่า nucleotide diversity เฉลี่ยเท่ากับ 0.01807 ± 0.00067 นอกจากนี้ จากการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยวิธี neighbor-joining และ maximum likelihood พบว่า tree ที่ได้สามารถแบ่งไ้ฟ้าหลังขาวและไ้ฟ้าหลังเทา ออกเป็น 2 clade ใหญ่ๆ อย่างชัดเจน ด้วยค่า bootstrap probability ที่สนับสนุนถึง 100% จากผลการศึกษาที่ได้แสดงว่าไ้ฟ้าหลังขาวและไ้ฟ้าหลังเทามีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการเป็นแบบ monophyletic group โดยมีค่า genetic distance อยู่ระหว่าง 0.030-0.039 ผลการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าไ้ฟ้าหลังขาวและไ้ฟ้าหลังเทา มีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมอย่างชัดเจน นอกจากนี้ยังพบว่าไ้ฟ้าทั้ง 4 ชนิดย่อยก็มีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมของยีนดีลูบในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ และแยกออกเป็นกลุ่มย่อยๆ 4 กลุ่มตามลักษณะสัณฐานภายนอกของชนิดย่อย genetic distance ระหว่างไ้ฟ้าหลังขาวโจนส์กับไ้ฟ้าหลังขาวจันทบูร มีค่าอยู่ระหว่าง 0.016-0.018 และระหว่างไ้ฟ้าหลังเทาเข้มแดงกับไ้ฟ้าหลังเทาเข้มเทา มีค่าอยู่ระหว่าง 0.003-0.005 นอกจากนี้ยังพบว่าไ้ฟ้าหลังเทาเข้มเทาและไ้ฟ้าหลังเทาเข้มแดงมีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้ชิดกับไ้ฟ้าหลังเทามากกว่าไ้ฟ้าหลังขาว ดังนั้นจึงควรจัดไ้ฟ้าหลังเทาเข้มเทาและไ้ฟ้าหลังเทาเข้มแดงเป็นชนิดย่อยของไ้ฟ้าหลังเทามากกว่าเป็นชนิดย่อยของไ้ฟ้าหลังขาว นอกจากนี้ ยังพบไ้ฟ้าที่มีลักษณะสัณฐานภายนอกเหมือนกับไ้ฟ้าหลังเทาเข้มแดง แต่มีไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอแฮพโลไทป์ของไ้ฟ้าหลังเทาเข้มเทา จำนวน 10 ตัวอย่าง (ได้แก่ LLCKS1M, LLCKS3M, LLCKS6F, LLCKS7M, LLCKS11M, LLCKS12F, LLCKS14F, LLCKS16F, LLCKS19M และ LLCKS20F) ใน clade ของไ้ฟ้าหลังเทาเข้มเทาอีกด้วย การตรวจพบการเกิด gene flow ระหว่างประชากรไ้ฟ้าหลังเทาเข้มเทาและไ้ฟ้าหลังเทาเข้มแดงที่สถานเพาะเลี้ยงสัตว์ป่าเขาสน จังหวัดราชบุรีนี้ แสดงว่าไ้ฟ้าทั้งสองชนิดย่อยนี้สามารถผสมข้ามสายพันธุ์กันได้ในสภาพกรงเลี้ยง

เอกสารอ้างอิง

- บุญส่ง เลขะกุล และ ฟิลิป ดี ราวต์. 2534. *A guide to the birds of Thailand*. กรุงเทพมหานคร : คณะบุคลากรนายแพทย์
บุญส่ง เลขะกุล.
- จารุจินต์ นฤตตะภัก, กานต์ เลขะกุล, และ วัชร สวณสมบัติ. 2550. *คู่มือดูนก หมอบุญส่ง เลขะกุล นกเมืองไทย*.
กรุงเทพมหานคร : คณะบุคลากรนายแพทย์บุญส่ง เลขะกุล.
- ขวัญฤทัย โชติพิชญานกุล. 2554. การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณดีลูระหว่างไก่ฟ้าหลังขาวจันทบูร *Lophura
nycthemera lewisi* และไก่ฟ้าหลังขาวธรรมดา *Lophura nycthemera jonesi*. โครงการการเรียนการสอนเพื่อ
เสริมประสบการณ์. 1-24.
- วีณา เมฆวิชัย และ สุทธิพงศ์ อาศิริพนธ์. 2552. *ฐานวิทยายของชนไก่ฟ้าไก่ป่าในประเทศไทยและการจำแนกชนนก*.
กรุงเทพมหานคร : บริษัทพรินทร์แอนด์ประเทศไทย จำกัด.
- โอภาส ขอบเขตต์. 2541. *นกในเมืองไทย*. เล่มที่ 1. โรงพิมพ์กรุงเทพ จำกัด : สารคดี ในนามบริษัท วิริยะธุรกิจ.
- Desjardins, P. and Morais, R. 1990. Nucleotide sequence and evolution of coding and noncoding regions of a
quail mitochondrial genome. *Journal of Molecular Evolution*. 32: 153-161.
- Dong, L., Liang, W., Heckel, G., Zhang, Y. and Zheng, G. 2010. Taxonomic clarification on a polymorphic
plumage species, Silver pheasant. *The 5th International Galliformes Symposium*. 7-10 November 2010.
Chiangmai, Thailand. p 72.
- Hennache, A., Rasmussen, P., Lucchini, V., Rimondi, S. and Randi, E. 2003. Hybrid origin of the imperial
pheasant *Lophura imperialis* (Delacour and Jabouille, 1924) demonstrated by morphology, hybrid
experiments, and DNA analyses. *Biological Journal of the Linnean Society*. 80: 573-600.
- Lekagul, B. and Round, P. D. 1991. *A guide to the Birds of Thailand*. Bangkok: Darnsutha Press.
- McGowan, P. J. K. and Panchen, A. L. 1994. Plumage variation and geographical distribution in the Kalij and
Silver Pheasants. *Bulletin of the British Ornithologists' Club*. 114: 113-123.
- Moulin, S., Randi, E., Tabarroni, C. and Hennache, A. 2003. Mitochondrial DNA diversification among the
subspecies of the Silver and Kalij Pheasants, *Lophura nycthemera* and *L. leucomelanos*, Phasianidae.
Ibis. 145: 1-11.
- Nei, M. 1987. *Molecular evolutionary genetics*. New York: Columbia University Press.
- Penchart, K., Sukmasuang, R. and Wajjawalku, W. 2012. Genetic diversity of selected pheasant species in
captive conditions. *European Journal of Scientific Research*. 83: 190-199.
- Quinn, T. W. and Wilson, A. C. 1993. Sequence evolution in and around the mitochondrial control region
in birds. *Journal of Molecular Evolution*. 37: 417-425.
- Randi, E. and Lucchini, V. 1998. Organization and evolution of the mitochondrial DNA control region in the
Avian Genus *Alectoris*. *Journal of molecular evolution*. 47: 449-462.
- Randi, E., Lucchini, V., Hennache, A., Kimball, R. T., Braun, E. L. and Ligon, J. D. 2001. Evolution of the
mitochondrial DNA control region and cytochrome b genes and the inference of phylogenetic
relationships in the avian genus *Lophura* (Galliformes). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 19:
187-201.
- Robson, C. 2000. *A Field Guide to the Birds of South-East Asia*. New Holland Publishers.

- Rozas, J., Librado, P., Sánchez-Del Barrio, J. C., Messeguer, X. and Rozas, R. 2010. DnaSP Version 5.10 HelpContents. *Bioinformatics*. 25: 1451-1453.
- Saitou, N. and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology Evolution*. 4: 406–425
- Tajima, F. 1983. Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. *Genetics*. 105: 437-460.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. and Kumar, S. 2011. MEGA5.1: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*. 28: 2731-2739.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. and Gibson, T. J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*. 22: 4673–4680.

ภาคผนวก

แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนดีลูบความยาวประมาณ 1,113 bp ของไก่อฟ้าหลังขาวและไก่อฟ้าหลังเทาแต่ละชนิดย่อย จำนวน 152 ตัวอย่างเทียบกับ outgroup ได้แก่ *L. diardi* และ *L. ignita* โดยเครื่องหมาย (.) แสดงตำแหน่งของเบสที่เหมือนกัน

หมายเหตุ	LNJ	= ไก่อฟ้าหลังขาวโจนส์ (<i>L. n. jonesi</i>)
	LNL	= ไก่อฟ้าหลังขาวจันทบุรี (<i>L. n. lewisi</i>)
	LLL	= ไก่อฟ้าหลังเทาแข่งเทา (<i>L. l. lineata</i>)
	LLC	= ไก่อฟ้าหลังเทาแข่งแดง (<i>L. l. crawfordii</i>)
	<i>L. ignita</i>	= ไก่อฟ้าหน้าเขียว
	<i>L. diardi</i>	= ไก่อฟ้าพญาลอ
	SD	= สถานีเพาะเลี้ยงสัตว์ป่าเขาซอยดาว จังหวัดจันทบุรี
	HK	= เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง จังหวัดอุทัยธานี
	KS	= สถานีเพาะเลี้ยงสัตว์ป่าเขาสน จังหวัดราชบุรี
	CM	= สวนสัตว์เชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่
	F	= เพศเมีย
	M	= เพศผู้

	* 20 * 40 * 60 * 80	
LNJHK1F	: CTCCCCTATTGAATGCACCCCCCCTTCCCCCCCAGGGGGGTATACTATGCATAATCGTGCATACATTATATCCACA	: 80
LNJHK8F	:	: 80
LNJHK15M	:	: 80
LNJHK19M	:	: 80
LNJHK20M	:	: 80
LNJHK2F	:	: 80
LNJHK3F	:	: 80
LNJHK5F	:	: 80
LNJHK7F	:	: 80
LNJHK23M	:	: 80
LNJSD1M	:	: 80
LNJSD2F	:	: 80
LNJSD3M	:	: 80
LNJSD4F	:	: 80
LNJSD6F	:	: 80
LNJSD7M	:	: 80
LNJSD9M	:	: 80
LNJSD10F	:	: 80
LNJSD11M	:	: 80
LNJSD12F	:	: 80
LNJSD13M	:	: 80
LNJSD14F	:	: 80
LNJSD15M	:	: 80
LNJSD16F	:	: 80
LNJSD17M	:	: 80
LNJSD18F	:	: 80
LNJSD23M	:	: 80
LNJSD24F	:	: 80
LNJSD25M	:	: 80
LNJHK4F	:	: 80
LNJHK6F	:	: 80
LNJHK17M	:	: 80
LNJHK18M	:	: 80
LNJHK22M	:	: 80
LNJHK24M	:	: 80
LNJSD5M	:	: 80
LNJSD8F	:	: 80
LNJSD19M	:	: 80
LNJSD20F	:	: 80
LNJSD21M	:	: 80
LNJSD22F	:	: 80
LNLSD1M	:	: 80
LNLSD3M	:	: 80
LNLSD6F	:	: 80
LNLSD7M	:	: 80
LNLSD11M	:	: 80
LNLSD16F	:	: 80
LNLSD18F	:	: 80
LNLSD2F	:	: 80
LNLSD4F	:	: 80
LNLSD5M	:	: 80
LNLSD8F	:	: 80
LNLSD9M	:	: 80
LNLSD10F	:	: 80
LNLSD12F	:	: 80
LNLSD13M	:	: 80
LNLSD14F	:	: 80
LNLSD15M	:	: 80
LNLSD17M	:	: 80
LNLSD19M	:	: 80
LNLSD20F	:	: 80
LNLSD21M	:	: 80
LLCKS14F	:	: 80
LLCKS19M	:	: 80
LLCKS1M	:	: 80
LLKS22F	:	: 80
LLKS26F	:	: 80
LLCKS15M	:	: 80
LLCKS8F	:	: 80
LLCKS4F	:	: 80
LLCKS5M	:	: 80
LLCKS13M	:	: 80
LLCKS17M	:	: 80
LLCKS10F	:	: 80
LLCKS9M	:	: 80
LLCKS2F	:	: 80
LLCKS18F	:	: 80
LLCKS6F	:	: 80
LLHK10F	:	: 80
LLHK13F	:	: 80

LLLHK12F	:	80
LLLHK15F	:	80
LLLHK3F	:	80
LLLHK2F	:	80
LLLHK6F	:	80
LLLHK37M	:	80
LLLHK36M	:	80
LLLHK29M	:	80
LLLHK27M	:	80
LLLHK8F	:	80
LLLHK32M	:	80
LLLHK19F	:	80
LLLHK22F	:	80
LLLHK21F	:	80
LLLHK28M	:	80
LLLHK43M	:	80
LLLHK47M	:	80
LLLS37M	:	80
LLLHK49M	:	80
LLLS31M	:	80
LLLS35M	:	80
LLLS34F	:	80
LLLS30F	:	80
LLLS28F	:	80
LLLS27M	:	80
LLLS33M	:	80
LLLS23M	:	80
LLLS24F	:	80
LLLS21M	:	80
LLCKS12F	:	80
LLCKS11M	:	80
LLCKS20F	:	80
LLCKS16F	:	80
LLCKS7M	:	80
LLCKS3M	:	80
LLLHK30M	:	80
LLLHK17F	:	80
LLLHK18F	:	80
LLLHK39M	:	80
LLLHK44M	:	80
LLLHK48M	:	80
LLLS40F	:	80
LLLHK1F	:	80
LLLHK4F	:	80
LLLHK5F	:	80
LLLHK11F	:	80
LLLHK14F	:	80
LLLHK33M	:	80
LLLHK7F	:	80
LLLCM2M	:	80
LLLCM1F	:	80
LLLS32F	:	80
LLLHK16F	:	80
LLLHK25M	:	80
LLLHK34M	:	80
LLLHK20F	:	80
LLLHK46M	:	80
LLLS38F	:	80
LLLHK9F	:	80
LLLHK26M	:	80
LLLHK31M	:	80
LLLS39M	:	80
LLLHK35M	:	80
LLLHK41M	:	80
LLLHK42M	:	80
LLLHK23F	:	80
LLLHK38M	:	80
LLLHK40M	:	80
LLLS25M	:	80
LLLS36F	:	80
LLLHK45M	:	80
LLLS29M	:	80
<i>L. ignita</i>	T	80
<i>L. diardi</i>	T	80

	*	100	*	120	*	140	*	160	
LNJHK1F	:	TATACTATGGTAGCGGTACATATATATTATAATCGTACTAAACCCATTATATGTATACGGACATCAAACCCAGCCCCAT	:	160					
LNJHK8F	:		:	160					
LNJHK15M	:		:	160					
LNJHK19M	:		:	160					
LNJHK20M	:		:	160					
LNJHK2F	:		:	160					
LNJHK3F	:		:	160					
LNJHK5F	:		:	160					
LNJHK7F	:		:	160					
LNJHK23M	:		:	160					
LNJSD1M	:		:	160					
LNJSD2F	:		:	160					
LNJSD3M	:		:	160					
LNJSD4F	:		:	160					
LNJSD6F	:		:	160					
LNJSD7M	:		:	160					
LNJSD9M	:		:	160					
LNJSD10F	:		:	160					
LNJSD11M	:		:	160					
LNJSD12F	:		:	160					
LNJSD13M	:		:	160					
LNJSD14F	:		:	160					
LNJSD15M	:		:	160					
LNJSD16F	:		:	160					
LNJSD17M	:		:	160					
LNJSD18F	:		:	160					
LNJSD23M	:		:	160					
LNJSD24F	:		:	160					
LNJSD25M	:		:	160					
LNJHK4F	:		:	160					
LNJHK6F	:		:	160					
LNJHK17M	:		:	160					
LNJHK18M	:		:	160					
LNJHK22M	:		:	160					
LNJHK24M	:		:	160					
LNJSD5M	:		:	160					
LNJSD8F	:		:	160					
LNJSD19M	:		:	160					
LNJSD20F	:		:	160					
LNJSD21M	:		:	160					
LNJSD22F	:		:	160					
LNLS1M	:	G.....T.....	:	160					
LNLS3M	:	G.....T.....	:	160					
LNLS6F	:	G.....T.....	:	160					
LNLS7M	:	G.....T.....	:	160					
LNLS11M	:	G.....T.....	:	160					
LNLS16F	:	G.....T.....	:	160					
LNLS18F	:	G.....T.....	:	160					
LNLS2F	:	G.....T.....	:	160					
LNLS4F	:	G.....T.....	:	160					
LNLS5M	:	G.....T.....	:	160					
LNLS8F	:	G.....T.....	:	160					
LNLS9M	:	G.....T.....	:	160					
LNLS10F	:	G.....T.....	:	160					
LNLS12F	:	G.....T.....	:	160					
LNLS13M	:	G.....T.....	:	160					
LNLS14F	:	G.....T.....	:	160					
LNLS15M	:	G.....T.....	:	160					
LNLS17M	:	G.....T.....	:	160					
LNLS19M	:	G.....T.....	:	160					
LNLS20F	:	G.....T.....	:	160					
LNLS21M	:	G.....T.....	:	160					
LLCKS14F	:	G.....T.....G.....	:	160					
LLCKS19M	:	G.....T.....G.....	:	160					
LLCKS1M	:	G.....T.....G.....	:	160					
LLKS22F	:	G.....T.....G.....	:	160					
LLKS26F	:	G.....T.....G.....	:	160					
LLCKS15M	:	G.....T.....G.....	:	160					
LLCKS8F	:	G.....T.....G.....	:	160					
LLCKS4F	:	G.....T.....G.....	:	160					
LLCKS5M	:	G.....T.....G.....	:	160					
LLCKS13M	:	G.....T.....G.....	:	160					
LLCKS17M	:	G.....T.....G.....	:	160					
LLCKS10F	:	G.....T.....G.....	:	160					
LLCKS9M	:	G.....T.....G.....	:	160					
LLCKS2F	:	G.....T.....G.....	:	160					
LLCKS18F	:	G.....T.....G.....	:	160					
LLCKS6F	:	G.....T.....G.....	:	160					
LLHK10F	:	G.....T.....G.....	:	160					
LLHK13F	:	G.....T.....G.....	:	160					

LLLHK12F	:	G.....T.....G.....	:	160
LLLHK15F	:	G.....T.....G.....	:	160
LLLHK3F	:	G.....T.....G.....	:	160
LLLHK2F	:	G.....T.....G.....	:	160
LLLHK6F	:	G.....T.....G.....	:	160
LLLHK37M	:	G.....T.....G.....	:	160
LLLHK36M	:	G.....T.....G.....	:	160
LLLHK29M	:	G.....T.....G.....	:	160
LLLHK27M	:	G.....T.....G.....	:	160
LLLHK8F	:	G.....T.....G.....	:	160
LLLHK32M	:	G.....T.....G.....	:	160
LLLHK19F	:	G.....T.....G.....	:	160
LLLHK22F	:	G.....T.....G.....	:	160
LLLHK21F	:	G.....T.....G.....	:	160
LLLHK28M	:	G.....T.....G.....	:	160
LLLHK43M	:	G.....T.....G.....	:	160
LLLHK47M	:	G.....T.....G.....	:	160
LLLS37M	:	G.....T.....G.....	:	160
LLLHK49M	:	G.....T.....G.....	:	160
LLLS31M	:	G.....T.....G.....	:	160
LLLS35M	:	G.....T.....G.....	:	160
LLLS34F	:	G.....T.....G.....	:	160
LLLS30F	:	G.....T.....G.....	:	160
LLLS28F	:	G.....T.....G.....	:	160
LLLS27M	:	G.....T.....G.....	:	160
LLLS33M	:	G.....T.....G.....	:	160
LLLS23M	:	G.....T.....G.....	:	160
LLLS24F	:	G.....T.....G.....	:	160
LLLS21M	:	G.....T.....G.....	:	160
LLCKS12F	:	G.....T.....G.....	:	160
LLCKS11M	:	G.....T.....G.....	:	160
LLCKS20F	:	G.....T.....G.....	:	160
LLCKS16F	:	G.....T.....G.....	:	160
LLCKS7M	:	G.....T.....G.....	:	160
LLCKS3M	:	G.....T.....G.....	:	160
LLLHK30M	:	G.....T.....G.....	:	160
LLLHK17F	:	G.....T.....G.....	:	160
LLLHK18F	:	G.....T.....G.....	:	160
LLLHK39M	:	G.....T.....G.....	:	160
LLLHK44M	:	G.....T.....G.....	:	160
LLLHK48M	:	G.....T.....G.....	:	160
LLLS40F	:	G.....T.....G.....	:	160
LLLHK1F	:	G.....T.....G.....	:	160
LLLHK4F	:	G.....T.....G.....	:	160
LLLHK5F	:	G.....T.....G.....	:	160
LLLHK11F	:	G.....T.....G.....	:	160
LLLHK14F	:	G.....T.....G.....	:	160
LLLHK33M	:	G.....T.....G.....	:	160
LLLHK7F	:	G.....T.....G.....	:	160
LLLCM2M	:	G.....T.....G.....	:	160
LLLCM1F	:	G.....T.....G.....	:	160
LLLS32F	:	G.....T.....G.....	:	160
LLLHK16F	:	G.....T.....G.....	:	160
LLLHK25M	:	G.....T.....G.....	:	160
LLLHK34M	:	G.....T.....G.....	:	160
LLLHK20F	:	G.....T.....G.....	:	160
LLLHK46M	:	G.....T.....G.....	:	160
LLLS38F	:	G.....T.....G.....	:	160
LLLHK9F	:	G.....T.....G.....	:	160
LLLHK26M	:	G.....T.....G.....	:	160
LLLHK31M	:	G.....T.....G.....	:	160
LLLS39M	:	G.....T.....G.....	:	160
LLLHK35M	:	G.....T.....G.....	:	160
LLLHK41M	:	G.....T.....G.....	:	160
LLLHK42M	:	G.....T.....G.....	:	160
LLLHK23F	:	G.....T.....G.....	:	160
LLLHK38M	:	G.....T.....G.....	:	160
LLLHK40M	:	G.....T.....G.....	:	160
LLLS25M	:	G.....T.....G.....	:	160
LLLS36F	:	G.....T.....G.....	:	160
LLLHK45M	:	G.....T.....G.....	:	160
LLLS29M	:	G.....T.....G.....	:	160
<i>L. ignita</i>	:	C.....T.....T.....	:	160
<i>L. diardi</i>	:	C.....C.....	:	160

	*	180	*	200	*	220	*	240	
LNJHK1F	:	TTCTCCCAATGTACTAAC	-	TATGCAATGCTCCAAGCCTATAACAGATCC	-	CTACCCAGCAAATGATCTACAACCCCTCAGG	:		238
LNJHK8F	:	-		-			:		238
LNJHK15M	:	-		-			:		238
LNJHK19M	:	-		-			:		238
LNJHK20M	:	-		-			:		238
LNJHK2F	:	-		-		A.....	:		238
LNJHK3F	:	-		-		A.....	:		238
LNJHK5F	:	-		-		A.....	:		238
LNJHK7F	:	-		-		A.....	:		238
LNJHK23M	:	-		-		A.....	:		238
LNJSD1M	:	-		-		A.....	:		238
LNJSD2F	:	-		-		A.....	:		238
LNJSD3M	:	-		-		A.....	:		238
LNJSD4F	:	-		-		A.....	:		238
LNJSD6F	:	-		-		A.....	:		238
LNJSD7M	:	-		-		A.....	:		238
LNJSD9M	:	-		-		A.....	:		238
LNJSD10F	:	-		-		A.....	:		238
LNJSD11M	:	-		-		A.....	:		238
LNJSD12F	:	-		-		A.....	:		238
LNJSD13M	:	-		-		A.....	:		238
LNJSD14F	:	-		-		A.....	:		238
LNJSD15M	:	-		-		A.....	:		238
LNJSD16F	:	-		-		A.....	:		238
LNJSD17M	:	-		-		A.....	:		238
LNJSD18F	:	-		-		A.....	:		238
LNJSD23M	:	-		-		A.....	:		238
LNJSD24F	:	-		-		A.....	:		238
LNJSD25M	:	-		-		A.....	:		238
LNJHK4F	:	-		G.....-		A.....	:		238
LNJHK6F	:	-		G.....-		A.....	:		238
LNJHK17M	:	-		G.....-		A.....	:		238
LNJHK18M	:	-		G.....-		A.....	:		238
LNJHK22M	:	-		G.....-		A.....	:		238
LNJHK24M	:	-		G.....-		A.....	:		238
LNJSD5M	:	-		G.....-		A.....	:		238
LNJSD8F	:	-		G.....-		A.....	:		238
LNJSD19M	:	-		G.....-		A.....	:		238
LNJSD20F	:	-		G.....-		A.....	:		238
LNJSD21M	:	-		G.....-		A.....	:		238
LNJSD22F	:	-		G.....-		A.....	:		238
LNLSD1M	:	G.....		T.....C.T-..C.....T.A.....			:		238
LNLSD3M	:	G.....		T.....C.T-..C.....T.A.....			:		238
LNLSD6F	:	G.....		T.....C.T-..C.....T.A.....			:		238
LNLSD7M	:	G.....		T.....C.T-..C.....T.A.....			:		238
LNLSD11M	:	G.....		T.....C.T-..C.....T.A.....			:		238
LNLSD16F	:	G.....		T.....C.T-..C.....T.A.....			:		238
LNLSD18F	:	G.....		T.....C.T-..C.....T.A.....			:		238
LNLSD2F	:	G.....		T.....C.T-..C.....T.A.....			:		238
LNLSD4F	:	G.....		T.....C.T-..C.....T.A.....			:		238
LNLSD5M	:	G.....		T.....C.T-..C.....T.A.....			:		238
LNLSD8F	:	G.....		T.....C.T-..C.....T.A.....			:		238
LNLSD9M	:	G.....		T.....C.T-..C.....T.A.....			:		238
LNLSD10F	:	G.....		T.....C.T-..C.....T.A.....			:		238
LNLSD12F	:	G.....		T.....C.T-..C.....T.A.....			:		238
LNLSD13M	:	G.....		T.....C.T-..C.....T.A.....			:		238
LNLSD14F	:	G.....		T.....C.T-..C.....T.A.....			:		238
LNLSD15M	:	G.....		T.....C.T-..C.....T.A.....			:		238
LNLSD17M	:	G.....		T.....C.T-..C.....T.A.....			:		238
LNLSD19M	:	G.....		T.....C.T-..C.....T.A.....			:		238
LNLSD20F	:	G.....		T.....C.T-..C.....T.A.....			:		238
LNLSD21M	:	G.....		T.....C.T-..C.....T.A.....			:		238
LLCKS14F	:	CC.....TCC.....T.....		CT.....C.T-TC.....T.....		A.....	:		238
LLCKS19M	:	CC.....TCC.....T.....		CT.....C.T-TC.....T.....		A.....	:		238
LLCKS1M	:	CC.....TCC.....T.....		CT.....C.T-TC.....T.....		A.....	:		238
LLKS22F	:	CC.....TCC.....T.....		CT.....C.T-TC.....T.....		A.....	:		238
LLKS26F	:	CC.....TCC.....T.....		CT.....C.T-TC.....T.....		A.....	:		238
LLCKS15M	:	CC.....CC.....T.....		CT.....C.T-TC.....T.....		A.....	:		238
LLCKS8F	:	CC.....CC.....T.....		CT.....C.T-TC.....T.....		A.....	:		238
LLCKS4F	:	CC.....CC.....T.....		CT.....C.T-TC.....T.....		A.....	:		238
LLCKS5M	:	CC.....CC.....T.....		CT.....C.T-TC.....T.....		A.....	:		238
LLCKS13M	:	CC.....CC.....T.....		CT.....C.T-TC.....T.....		A.....	:		238
LLCKS17M	:	CC.....CC.....T.....		CT.....C.T-TC.....T.....		A.....	:		238
LLCKS10F	:	CC.....CC.....T.....		CT.....C.T-TC.....T.....		A.....	:		238
LLCKS9M	:	CC.....CC.....T.....		CT.....C.T-TC.....T.....		A.....	:		238
LLCKS2F	:	CC.....CC.....T.....		CT.....C.T-TC.....T.....		A.....	:		238
LLCKS18F	:	CC.....CC.....T.....		CT.....C.T-TC.....T.....		A.....	:		238
LLCKS6F	:	CC.....C.....TCC.....T.....		CT.....C.T-TC.....T.....		A.....	:		238
LLHK10F	:	CC.....C.....TCC.....T.....		CT.....C.T-TC.....T.....		A.....	:		238
LLHK13F	:	CC.....C.....TCC.....T.....		CT.....C.T-TC.....T.....		A.....	:		238

[illegible]

	*	260	*	280	*	300	*	320	
LNJHK1F	:	TCACCATACTATGAATGGTTACAGGACATACACATAATACTAAGTCTCTACCCCATTTGGTTATGCTCGACGTACCAGAT	:						318
LNJHK8F	:		:						318
LNJHK15M	:		:						318
LNJHK19M	:		:						318
LNJHK20M	:		:						318
LNJHK2F	:		:						318
LNJHK3F	:		:						318
LNJHK5F	:		:						318
LNJHK7F	:		:						318
LNJHK23M	:		:						318
LNJSD1M	:		:						318
LNJSD2F	:		:						318
LNJSD3M	:		:						318
LNJSD4F	:		:						318
LNJSD6F	:		:						318
LNJSD7M	:		:						318
LNJSD9M	:		:						318
LNJSD10F	:		:						318
LNJSD11M	:		:						318
LNJSD12F	:		:						318
LNJSD13M	:		:						318
LNJSD14F	:		:						318
LNJSD15M	:		:						318
LNJSD16F	:		:						318
LNJSD17M	:		:						318
LNJSD18F	:		:						318
LNJSD23M	:		:						318
LNJSD24F	:		:						318
LNJSD25M	:		:						318
LNJHK4F	:		:						318
LNJHK6F	:		:						318
LNJHK17M	:		:						318
LNJHK18M	:		:						318
LNJHK22M	:		:						318
LNJHK24M	:		:						318
LNJSD5M	:		:						318
LNJSD8F	:		:						318
LNJSD19M	:		:						318
LNJSD20F	:		:						318
LNJSD21M	:		:						318
LNJSD22F	:		:						318
LNLSD1M	:	GT...C...T...T.....	:						318
LNLSD3M	:	GT...C...T...T.....	:						318
LNLSD6F	:	GT...C...T...T.....	:						318
LNLSD7M	:	GT...C...T...T.....	:						318
LNLSD11M	:	GT...C...T...T.....	:						318
LNLSD16F	:	GT...C...T...T.....	:						318
LNLSD18F	:	GT...C...T...T.....	:						318
LNLSD2F	:	GT...C...T...T.....	:						318
LNLSD4F	:	GT...C...T...T.....	:						318
LNLSD5M	:	GT...C...T...T.....	:						318
LNLSD8F	:	GT...C...T...T.....	:						318
LNLSD9M	:	GT...C...T...T.....	:						318
LNLSD10F	:	GT...C...T...T.....	:						318
LNLSD12F	:	GT...C...T...T.....	:						318
LNLSD13M	:	GT...C...T...T.....	:						318
LNLSD14F	:	GT...C...T...T.....	:						318
LNLSD15M	:	GT...C...T...T.....	:						318
LNLSD17M	:	GT...C...T...T.....	:						318
LNLSD19M	:	GT...C...T...T.....	:						318
LNLSD20F	:	GT...C...T...T.....	:						318
LNLSD21M	:	GT...C...T...T.....	:						318
LLCKS14F	:	CG.....TGC...C...T.G.....	:						318
LLCKS19M	:	CG.....TGC...C...T.G.....	:						318
LLCKS1M	:	CG.....TGC...C...T.G.....	:						318
LLKS22F	:	CG.....TGC...C...T.G.....	:						318
LLKS26F	:	CG.....TGC...C...T.G.....	:						318
LLCKS15M	:	CG.....TGC...C...T.G.....	:						318
LLCKS8F	:	CG.....TGC...C...T.G.....	:						318
LLCKS4F	:	CG.....TGC...C...T.G.....	:						318
LLCKS5M	:	CG.....TGC...C...T.G.....	:						318
LLCKS13M	:	CG.....TGC...C...T.G.....	:						318
LLCKS17M	:	CG.....TGC...C...T.G.....	:						318
LLCKS10F	:	CG.....TGC...C...T.G.....	:						318
LLCKS9M	:	CG.....TGC...C...T.G.....	:						318
LLCKS2F	:	CG.....TGC...C...T.G.....	:						318
LLCKS18F	:	CG.....TGC...C...T.G.....	:						318
LLCKS6F	:	CG.....TGC...C...T.....	:						318
LLHK10F	:	CG.....TGC...C...T.....	:						318
LLHK13F	:	CG.....TGC...C...T.....	:						318

LLLHK12F	: CG.....TGC.....C.....T.....	: 318
LLLHK15F	: CG.....TGC.....C.....T.....	: 318
LLLHK3F	: CG.....TGC.....C.....T.....	: 318
LLLHK2F	: CG.....TGC.....C.....T.....	: 318
LLLHK6F	: CG.....TGC.....C.....T.....	: 318
LLLHK37M	: CG.....TGC.....C.....T.....	: 318
LLLHK36M	: CG.....TGC.....C.....T.....	: 318
LLLHK29M	: CG.....TGC.....C.....T.....	: 318
LLLHK27M	: CG.....TGC.....C.....T.....	: 318
LLLHK8F	: CG.....TGC.....C.....T.....	: 318
LLLHK32M	: CG.....TGC.....C.....T.....	: 318
LLLHK19F	: CG.....TGC.....C.....T.....	: 318
LLLHK22F	: CG.....TGC.....C.....T.....	: 318
LLLHK21F	: CG.....TGC.....C.....T.....	: 318
LLLHK28M	: CG.....TGC.....C.....T.....	: 318
LLLHK43M	: CG.....TGC.....C.....T.....	: 318
LLLHK47M	: CG.....TGC.....C.....T.....	: 318
LLLSK37M	: CG.....TGC.....C.....T.....	: 318
LLLSK49M	: CG.....TGC.....C.....T.....	: 318
LLLSK31M	: CG.....TGC.....C.....T.....	: 318
LLLSK35M	: CG.....TGC.....C.....T.....	: 318
LLLSK34F	: CG.....TGC.....C.....T.....	: 318
LLLSK30F	: CG.....TGC.....C.....T.....	: 318
LLLSK28F	: CG.....TGC.....C.....T.....	: 318
LLLSK27M	: CG.....TGC.....C.....T.....	: 318
LLLSK33M	: CG.....TGC.....C.....T.....	: 318
LLLSK23M	: CG.....TGC.....C.....T.....	: 318
LLLSK24F	: CG.....TGC.....C.....T.....	: 318
LLLSK21M	: CG.....TGC.....C.....T.....	: 318
LLCKS12F	: CG.....TGC.....C.....T.....	: 318
LLCKS11M	: CG.....TGC.....C.....T.....	: 318
LLCKS20F	: CG.....TGC.....C.....T.....	: 318
LLCKS16F	: CG.....TGC.....C.....T.....	: 318
LLCKS7M	: CG.....TGC.....C.....T.....	: 318
LLCKS3M	: CG.....TGC.....C.....T.....	: 318
LLLHK30M	: CG.....TGC.....C.....T.....	: 318
LLLHK17F	: CG.....TGC.....C.....T.....	: 318
LLLHK18F	: CG.....TGC.....C.....T.....	: 318
LLLHK39M	: CG.....TGC.....C.....T.....	: 318
LLLHK44M	: CG.....TGC.....C.....T.....	: 318
LLLHK48M	: CG.....TGC.....C.....T.....	: 318
LLLSK40F	: CG.....TGC.....C.....T.....	: 318
LLLHK1F	: CG.....TGC.....C.....T.....	: 318
LLLHK4F	: CG.....TGC.....C.....T.....	: 318
LLLHK5F	: CG.....TGC.....C.....T.....	: 318
LLLHK11F	: CG.....TGC.....C.....T.....	: 318
LLLHK14F	: CG.....TGC.....C.....T.....	: 318
LLLHK33M	: CG.....TGC.....C.....T.....	: 318
LLLHK7F	: CG.....TGC.....C.....T.....	: 318
LLLCM2M	: CG.....TGC.....C.....T.....	: 318
LLLCM1F	: CG.....TGC.....C.....T.....	: 318
LLLSK32F	: CG.....TGC.....C.....T.....	: 317
LLLHK16F	: CG.....TGC.....C.....T.....	: 318
LLLHK25M	: CG.....TGC.....C.....T.....	: 318
LLLHK34M	: CG.....TGC.....C.....T.....	: 318
LLLHK20F	: CG.....TGC.....C.....T.....	: 318
LLLHK46M	: CG.....TGC.....C.....T.....	: 318
LLLSK38F	: CG.....TGC.....C.....T.....	: 318
LLLHK9F	: CG.....TGC.....C.....T.....	: 318
LLLHK26M	: CG.....TGC.....C.....T.....	: 318
LLLHK31M	: CG.....TGC.....C.....T.....	: 318
LLLSK39M	: CG.....TGC.....C.....T.....	: 318
LLLHK35M	: CG.....TGC.....C.....T.....	: 318
LLLHK41M	: CG.....TGC.....C.....T.....	: 318
LLLHK42M	: CG.....TGC.....C.....T.....	: 318
LLLHK23F	: CG.....TGC.....C.....T.....	: 318
LLLHK38M	: CG.....TGC.....C.....T.....	: 318
LLLHK40M	: CG.....TGC.....C.....T.....	: 318
LLLSK25M	: CG.....TGC.....C.....T.....	: 318
LLLSK36F	: CG.....TGC.....C.....T.....	: 318
LLLHK45M	: CG.....TGC.....C.....T.....	: 318
LLLSK29M	: CG.....TGC.....C.....T.....	: 318
<i>L. ignita</i>	:TGC.....C.TC-.....A..	: 318
<i>L. diardi</i>	:TGC.....C.G.C..C-.....	: 316

	*	340	*	360	*	380	*	400	
LNJHK1F	:	GGATTTATTGATCGTACACCTCACGAGAGATCAGCAACCCCTGCCTGTAATGTACTTCATGACTAGCTTCAGGCCCATTC	:						398
LNJHK8F	:		:						398
LNJHK15M	:		:						398
LNJHK19M	:		:						398
LNJHK20M	:		:						398
LNJHK2F	:		:						398
LNJHK3F	:		:						398
LNJHK5F	:		:						398
LNJHK7F	:		:						398
LNJHK23M	:		:						398
LNJSD1M	:		:						398
LNJSD2F	:		:						398
LNJSD3M	:		:						398
LNJSD4F	:		:						398
LNJSD6F	:		:						398
LNJSD7M	:		:						398
LNJSD9M	:		:						398
LNJSD10F	:		:						398
LNJSD11M	:		:						398
LNJSD12F	:		:						398
LNJSD13M	:		:						398
LNJSD14F	:		:						398
LNJSD15M	:		:						398
LNJSD16F	:		:						398
LNJSD17M	:		:						398
LNJSD18F	:		:						398
LNJSD23M	:		:						398
LNJSD24F	:		:						398
LNJSD25M	:		:						398
LNJHK4F	:		:						398
LNJHK6F	:		:						398
LNJHK17M	:		:						398
LNJHK18M	:		:						398
LNJHK22M	:		:						398
LNJHK24M	:		:						398
LNJSD5M	:		:						398
LNJSD8F	:		:						398
LNJSD19M	:		:						398
LNJSD20F	:		:						398
LNJSD21M	:		:						398
LNJSD22F	:		:						398
LNLSD1M	:	C.....	:						398
LNLSD3M	:	C.....	:						398
LNLSD6F	:	C.....	:						398
LNLSD7M	:	C.....	:						398
LNLSD11M	:	C.....	:						398
LNLSD16F	:	C.....	:						398
LNLSD18F	:	C.....	:						398
LNLSD2F	:	C.....	:						398
LNLSD4F	:	C.....	:						398
LNLSD5M	:	C.....	:						398
LNLSD8F	:	C.....	:						398
LNLSD9M	:	C.....	:						398
LNLSD10F	:	C.....	:						398
LNLSD12F	:	C.....	:						398
LNLSD13M	:	C.....	:						398
LNLSD14F	:	C.....	:						398
LNLSD15M	:	C.....	:						398
LNLSD17M	:	C.....	:						398
LNLSD19M	:	C.....	:						398
LNLSD20F	:	C.....	:						398
LNLSD21M	:	C.....	:						398
LLCKS14F	:	C.....	:						398
LLCKS19M	:	C.....	:						398
LLCKS1M	:	C.....	:						398
LLKS22F	:	C.....	:						398
LLKS26F	:	C.....	:						398
LLCKS15M	:	C.....	:						398
LLCKS8F	:	C.....	:						398
LLCKS4F	:	C.....	:						398
LLCKS5M	:	C.....	:						398
LLCKS13M	:	C.....	:						398
LLCKS17M	:	C.....	:						398
LLCKS10F	:	C.....	:						398
LLCKS9M	:	C.....	:						398
LLCKS2F	:	C.....	:						398
LLCKS18F	:	C.....	:						398
LLCKS6F	:	C.....	:						398
LLHK10F	:	C.....	:						398
LLHK13F	:	C.....	:						398

LLLHK12F	:	C.....	:	398
LLLHK15F	:	C.....	:	398
LLLHK3F	:	C.....	:	398
LLLHK2F	:	C.....	:	398
LLLHK6F	:	C.....	:	398
LLLHK37M	:	C.....	:	398
LLLHK36M	:	C.....	:	398
LLLHK29M	:	C.....	:	398
LLLHK27M	:	C.....	:	398
LLLHK8F	:	C.....	:	398
LLLHK32M	:	C.....	:	398
LLLHK19F	:	C.....	:	398
LLLHK22F	:	C.....	:	398
LLLHK21F	:	C.....	:	398
LLLHK28M	:	C.....	:	398
LLLHK43M	:	C.....	:	398
LLLHK47M	:	C.....	:	398
LLLSK37M	:	C.....	:	398
LLLSK49M	:	C.....	:	398
LLLSK31M	:	C.....	:	398
LLLSK35M	:	C.....	:	398
LLLSK34F	:	C.....	:	398
LLLSK30F	:	C.....	:	398
LLLSK28F	:	C.....	:	398
LLLSK27M	:	C.....	:	398
LLLSK33M	:	C.....	:	398
LLLSK23M	:	C.....	:	398
LLLSK24F	:	C.....	:	398
LLLSK21M	:	C.....	:	398
LLCKS12F	:	C.....	:	398
LLCKS11M	:	C.....	:	398
LLCKS20F	:	C.....	:	398
LLCKS16F	:	C.....	:	398
LLCKS7M	:	C.....	:	398
LLCKS3M	:	C.....	:	398
LLLHK30M	:	C.....	:	398
LLLHK17F	:	C.....	:	398
LLLHK18F	:	C.....	:	398
LLLHK39M	:	C.....	:	398
LLLHK44M	:	C.....	:	398
LLLHK48M	:	C.....	:	398
LLLSK40F	:	C.....	:	398
LLLHK1F	:	C.....	:	398
LLLHK4F	:	C.....	:	398
LLLHK5F	:	C.....	:	398
LLLHK11F	:	C.....	:	398
LLLHK14F	:	C.....	:	398
LLLHK33M	:	C.....	:	398
LLLHK7F	:	C.....	:	398
LLLCM2M	:	C.....	:	398
LLLCM1F	:	C.....	:	398
LLLSK32F	:		:	397
LLLHK16F	:	C.....	:	398
LLLHK25M	:	C.....	:	398
LLLHK34M	:	C.....	:	398
LLLHK20F	:	C.....	:	398
LLLHK46M	:	C.....	:	398
LLLSK38F	:	C.....	:	398
LLLHK9F	:	C.....	:	398
LLLHK26M	:	C.....	:	398
LLLHK31M	:	C.....	:	398
LLLSK39M	:	C.....	:	398
LLLHK35M	:	C.....	:	398
LLLHK41M	:	C.....	:	398
LLLHK42M	:	C.....	:	398
LLLHK23F	:	C.....	:	398
LLLHK38M	:	C.....	:	398
LLLHK40M	:	C.....	:	398
LLLSK25M	:	C.....	:	398
LLLSK36F	:	C.....	:	398
LLLHK45M	:	C.....	:	398
LLLSK29M	:	C.....	:	398
<i>L. ignita</i>	:	C.....	:	398
<i>L. diardi</i>	:	C.....	:	396

	*	420	*	440	*	460	*	480	
LNJHK1F	:	TTTCCCCCTACACCCCTCGCCCCCTCTTGCTCTTTTGC		CGCCTCTGGTTCTCGGTCAGGAACATCCCATGCTTA		ACTCCTG	:		478
LNJHK8F	:						:		478
LNJHK15M	:						:		478
LNJHK19M	:						:		478
LNJHK20M	:						:		478
LNJHK2F	:						:		478
LNJHK3F	:						:		478
LNJHK5F	:						:		478
LNJHK7F	:						:		478
LNJHK23M	:						:		478
LNJSD1M	:						:		478
LNJSD2F	:						:		478
LNJSD3M	:						:		478
LNJSD4F	:						:		478
LNJSD6F	:						:		478
LNJSD7M	:						:		478
LNJSD9M	:						:		478
LNJSD10F	:						:		478
LNJSD11M	:						:		478
LNJSD12F	:						:		478
LNJSD13M	:						:		478
LNJSD14F	:						:		478
LNJSD15M	:						:		478
LNJSD16F	:						:		478
LNJSD17M	:						:		478
LNJSD18F	:						:		478
LNJSD23M	:						:		478
LNJSD24F	:						:		478
LNJSD25M	:						:		478
LNJHK4F	:						:		478
LNJHK6F	:						:		478
LNJHK17M	:						:		478
LNJHK18M	:						:		478
LNJHK22M	:						:		478
LNJHK24M	:						:		478
LNJSD5M	:						:		478
LNJSD8F	:						:		478
LNJSD19M	:						:		478
LNJSD20F	:						:		478
LNJSD21M	:						:		478
LNJSD22F	:						:		478
LNLSD1M	:					T.....	:		478
LNLSD3M	:					T.....	:		478
LNLSD6F	:					T.....	:		478
LNLSD7M	:					T.....	:		478
LNLSD11M	:					T.....	:		478
LNLSD16F	:					T.....	:		478
LNLSD18F	:					T.....	:		478
LNLSD2F	:						:		478
LNLSD4F	:						:		478
LNLSD5M	:						:		478
LNLSD8F	:						:		478
LNLSD9M	:						:		478
LNLSD10F	:						:		478
LNLSD12F	:						:		478
LNLSD13M	:						:		478
LNLSD14F	:						:		478
LNLSD15M	:						:		478
LNLSD17M	:						:		478
LNLSD19M	:						:		478
LNLSD20F	:						:		478
LNLSD21M	:						:		478
LLCKS14F	:						:		478
LLCKS19M	:						:		478
LLCKS1M	:						:		478
LLKS22F	:						:		478
LLKS26F	:						:		478
LLCKS15M	:						:		478
LLCKS8F	:						:		478
LLCKS4F	:						:		478
LLCKS5M	:						:		478
LLCKS13M	:						:		478
LLCKS17M	:						:		478
LLCKS10F	:						:		478
LLCKS9M	:						:		478
LLCKS2F	:						:		478
LLCKS18F	:						:		478
LLCKS6F	:						:		478
LLHK10F	:						:		478
LLHK13F	:						:		478

LLLHK12F	:	478
LLLHK15F	:	478
LLLHK3F	:	478
LLLHK2F	:	478
LLLHK6F	:	478
LLLHK37M	:	478
LLLHK36M	:	478
LLLHK29M	:	478
LLLHK27M	:	478
LLLHK8F	:	478
LLLHK32M	:	478
LLLHK19F	:	478
LLLHK22F	:	478
LLLHK21F	:	478
LLLHK28M	:	478
LLLHK43M	:	478
LLLHK47M	:	478
LLLS37M	:	478
LLLHK49M	:	478
LLLS31M	:	478
LLLS35M	:	478
LLLS34F	:	478
LLLS30F	:	478
LLLS28F	:	478
LLLS27M	:	478
LLLS33M	:	478
LLLS23M	:	478
LLLS24F	:	478
LLLS21M	:	478
LLCKS12F	:	478
LLCKS11M	:	478
LLCKS20F	:	478
LLCKS16F	:	478
LLCKS7M	:	478
LLCKS3M	:	478
LLLHK30M	:	478
LLLHK17F	:	478
LLLHK18F	:	478
LLLHK39M	:	478
LLLHK44M	:	478
LLLHK48M	:	478
LLLS40F	:	478
LLLHK1F	:	478
LLLHK4F	:	478
LLLHK5F	:	478
LLLHK11F	:	478
LLLHK14F	:	478
LLLHK33M	:	478
LLLHK7F	:	478
LLLCM2M	:	478
LLLCM1F	:	478
LLLS32F	:	477
LLLHK16F	:	478
LLLHK25M	:	478
LLLHK34M	:	478
LLLHK20F	:	478
LLLHK46M	:	478
LLLS38F	:	478
LLLHK9F	:	478
LLLHK26M	:	478
LLLHK31M	:	478
LLLS39M	:	478
LLLHK35M	:	478
LLLHK41M	:	478
LLLHK42M	:	478
LLLHK23F	:	478
LLLHK38M	:	478
LLLHK40M	:	478
LLLS25M	:	478
LLLS36F	:	478
LLLHK45M	:	478
LLLS29M	:	478
<i>L. ignita</i>	.T.	478
<i>L. diardi</i>	.TC.G.	476

	*	500	*	520	*	540	*	560	
LNJHK1F	:	AA-TTCCTCACTTTTCACGAAGTCATCTGTGGATGGTAT-CCCCCTATTTAGTCCGTGATCGCGGCATCTTCTTTCTTCT				:		556	
LNJHK8F	:	..-.....-.....				:		556	
LNJHK15M	:	..-.....-.....				:		556	
LNJHK19M	:	..-.....-.....				:		556	
LNJHK20M	:	..-.....-.....				:		556	
LNJHK2F	:	..-.....-.....				:		556	
LNJHK3F	:	..-.....-.....				:		556	
LNJHK5F	:	..-.....-.....				:		556	
LNJHK7F	:	..-.....-.....				:		556	
LNJHK23M	:	..-.....-.....				:		556	
LNJSD1M	:	..-.....-.....				:		556	
LNJSD2F	:	..-.....-.....				:		556	
LNJSD3M	:	..-.....-.....				:		556	
LNJSD4F	:	..-.....-.....				:		556	
LNJSD6F	:	..-.....-.....				:		556	
LNJSD7M	:	..-.....-.....				:		556	
LNJSD9M	:	..-.....-.....				:		556	
LNJSD10F	:	..-.....-.....				:		556	
LNJSD11M	:	..-.....-.....				:		556	
LNJSD12F	:	..-.....-.....				:		556	
LNJSD13M	:	..-.....-.....				:		556	
LNJSD14F	:	..-.....-.....				:		556	
LNJSD15M	:	..-.....-.....				:		556	
LNJSD16F	:	..-.....-.....				:		556	
LNJSD17M	:	..-.....-.....				:		556	
LNJSD18F	:	..-.....-.....				:		556	
LNJSD23M	:	..-.....-.....				:		556	
LNJSD24F	:	..-.....-.....				:		556	
LNJSD25M	:	..-.....-.....				:		556	
LNJHK4F	:	..-.....-.....				:		556	
LNJHK6F	:	..-.....-.....				:		556	
LNJHK17M	:	..-.....-.....				:		556	
LNJHK18M	:	..-.....-.....				:		556	
LNJHK22M	:	..-.....-.....				:		556	
LNJHK24M	:	..-.....-.....				:		556	
LNJSD5M	:	..-.....-.....				:		556	
LNJSD8F	:	..-.....-.....				:		556	
LNJSD19M	:	..-.....-.....				:		556	
LNJSD20F	:	..-.....-.....				:		556	
LNJSD21M	:	..-.....-.....				:		556	
LNJSD22F	:	..-.....-.....				:		556	
LNLSD1M	:	..-.....-A.....				:		556	
LNLSD3M	:	..-.....-A.....				:		556	
LNLSD6F	:	..-.....-A.....				:		556	
LNLSD7M	:	..-.....-A.....				:		556	
LNLSD11M	:	..-.....-A.....				:		556	
LNLSD16F	:	..-.....-A.....				:		556	
LNLSD18F	:	..-.....-A.....				:		556	
LNLSD2F	:	..-.....-A.....				:		556	
LNLSD4F	:	..-.....-A.....				:		556	
LNLSD5M	:	..-.....-A.....				:		556	
LNLSD8F	:	..-.....-A.....				:		556	
LNLSD9M	:	..-.....-A.....				:		556	
LNLSD10F	:	..-.....-A.....				:		556	
LNLSD12F	:	..-.....-A.....				:		556	
LNLSD13M	:	..-.....-A.....				:		556	
LNLSD14F	:	..-.....-A.....				:		556	
LNLSD15M	:	..-.....-A.....				:		556	
LNLSD17M	:	..-.....-A.....				:		556	
LNLSD19M	:	..-.....-A.....				:		556	
LNLSD20F	:	..-.....-A.....				:		556	
LNLSD21M	:	..-.....-A.....				:		556	
LLCKS14F	:	..-C.....TC-T.....C.....				:		556	
LLCKS19M	:	..-C.....TC-T.....C.....				:		556	
LLCKS1M	:	..-C.....TC-T.....C.....				:		556	
LLKS22F	:	..-C.....TC-T.....C.....				:		556	
LLKS26F	:	..-C.....TC-T.....C.....				:		556	
LLCKS15M	:	..-C.....TC-T.....C.....				:		556	
LLCKS8F	:	..-C.....TC-T.....C.....				:		556	
LLCKS4F	:	..-C.....TC-T.....C.....				:		556	
LLCKS5M	:	..-C.....TC-T.....C.....				:		556	
LLCKS13M	:	..-C.....TC-T.....C.....				:		556	
LLCKS17M	:	..-C.....TC-T.....C.....				:		556	
LLCKS10F	:	..-C.....TC-T.....C.....				:		556	
LLCKS9M	:	..-C.....TC-T.....C.....				:		556	
LLCKS2F	:	..-C.....TC-T.....C.....				:		556	
LLCKS18F	:	..-C.....TC-T.....C.....				:		556	
LLCKS6F	:	..-C.....TC-T.....C.....				:		556	
LLLHK10F	:	..-C.....TC-T.....C.....				:		556	
LLLHK13F	:	..-C.....TC-T.....C.....				:		556	

LLLHK12F	: ..-C.....TC-T.....C.....	: 556
LLLHK15F	: ..-C.....TC-T.....C.....	: 556
LLLHK3F	: ..-C.....TC-T.....C.....	: 556
LLLHK2F	: ..-C.....TC-T.....C.....	: 556
LLLHK6F	: ..-C.....TC-T.....C.....	: 556
LLLHK37M	: ..-C.....TC-T.....C.....	: 556
LLLHK36M	: ..-C.....TC-T.....C.....	: 556
LLLHK29M	: ..-C.....TC-T.....C.....	: 556
LLLHK27M	: ..-C.....TC-T.....C.....	: 556
LLLHK8F	: ..-C.....TC-T.....C.....	: 556
LLLHK32M	: ..-C.....TC-T.....C.....	: 556
LLLHK19F	: ..-C.....TC-T.....C.....	: 556
LLLHK22F	: ..-C.....TC-T.....C.....	: 556
LLLHK21F	: ..-C.....TC-T.....C.....	: 556
LLLHK28M	: ..-C.....TC-T.....C.....	: 556
LLLHK43M	: ..-C.....TC-T.....C.....	: 556
LLLHK47M	: ..-C.....TC-T.....C.....	: 556
LLLSK37M	: ..-C.....TC-T.....C.....	: 556
LLLSK49M	: ..-C.....TC-T.....C.....	: 556
LLLSK31M	: ..-C.....TC-T.....C.....	: 556
LLLSK35M	: ..-C.....TC-T.....C.....	: 556
LLLSK34F	: ..-C.....TC-T.....C.....	: 556
LLLSK30F	: ..-C.....TC-T.....C.....	: 556
LLLSK28F	: ..-C.....TC-T.....C.....	: 556
LLLSK27M	: ..-C.....TC-T.....C.....	: 556
LLLSK33M	: ..-C.....TC-T.....C.....	: 556
LLLSK23M	: ..-C.....TC-T.....C.....	: 556
LLLSK24F	: ..-C.....TC-T.....C.....	: 556
LLLSK21M	: ..-C.....TC-T.....C.....	: 556
LLCKS12F	: ..-C.....TC-T.....C.....	: 556
LLCKS11M	: ..-C.....TC-T.....C.....	: 556
LLCKS20F	: ..-C.....TC-T.....C.....	: 556
LLCKS16F	: ..-C.....TC-T.....C.....	: 556
LLCKS7M	: ..-C.....TC-T.....C.....	: 556
LLCKS3M	: ..-C.....TC-T.....C.....	: 556
LLLHK30M	: ..-C.....TC-T.....C.....	: 556
LLLHK17F	: ..-C.....TC-T.....C.....	: 556
LLLHK18F	: ..-C.....TC-T.....C.....	: 556
LLLHK39M	: ..-C.....TC-T.....C.....	: 556
LLLHK44M	: ..-C.....TC-T.....C.....	: 556
LLLHK48M	: ..-C.....TC-T.....C.....	: 556
LLLSK40F	: ..-C.....TC-T.....C.....	: 556
LLLHK1F	: ..-C.....TC-T.....C.....	: 556
LLLHK4F	: ..-C.....TC-T.....C.....	: 556
LLLHK5F	: ..-C.....TC-T.....C.....	: 556
LLLHK11F	: ..-C.....TC-T.....C.....	: 556
LLLHK14F	: ..-C.....TC-T.....C.....	: 556
LLLHK33M	: ..-C.....TC-T.....C.....	: 556
LLLHK7F	: ..-C.....TC-T.....C.....	: 556
LLLCM2M	: ..-C.....TC-T.....C.....	: 556
LLLCM1F	: ..-C.....TC-T.....C.....	: 556
LLLSK32F	: ..-C.....TC-T.....C.....	: 555
LLLHK16F	: ..-C.....TC-T.....C.....	: 556
LLLHK25M	: ..-C.....TC-T.....C.....	: 556
LLLHK34M	: ..-C.....TC-T.....C.....	: 556
LLLHK20F	: ..-C.....TC-T.....C.....	: 556
LLLHK46M	: ..-C.....TC-T.....C.....	: 556
LLLSK38F	: ..-C.....TC-T.....C.....	: 556
LLLHK9F	: ..-C.....TC-T.....C.....	: 556
LLLHK26M	: ..-C.....TC-T.....C.....	: 556
LLLHK31M	: ..-C.....TC-T.....C.....	: 556
LLLSK39M	: ..-C.....TC-T.....C.....	: 556
LLLHK35M	: ..-C.....TC-T.....C.....	: 556
LLLHK41M	: ..-C.....TC-T.....C.....	: 556
LLLHK42M	: ..-C.....TC-T.....C.....	: 556
LLLHK23F	: ..-C.....TC-T.....C.....	: 556
LLLHK38M	: ..-C.....TC-T.....C.....	: 556
LLLHK40M	: ..-C.....TC-T.....C.....	: 556
LLLSK25M	: ..-C.....TC-T.....C.....	: 556
LLLSK36F	: ..-C.....TC-T.....C.....	: 556
LLLHK45M	: ..-C.....TC-T.....C.....	: 556
LLLSK29M	: ..-C.....TC-T.....C.....	: 556
<i>L. ignita</i>	: ..-C.....TC-T.....T.C.....A	: 556
<i>L. diardi</i>	: ..C.....TC-T.....C.....T.C.....A	: 555

	*	580	*	600	*	620	*	640	
LNJHK1F	:	CTGCTGTGTTTCCTTTTTTCTCTGGGGCTTCTTCACAGGTTGCCCTTCACAGTGC				GGGTGCGGAGTGCTATTCAAGTGA	:		636
LNJHK8F	:						:		636
LNJHK15M	:						:		636
LNJHK19M	:						:		636
LNJHK20M	:						:		636
LNJHK2F	:						:		636
LNJHK3F	:						:		636
LNJHK5F	:						:		636
LNJHK7F	:						:		636
LNJHK23M	:						:		636
LNJSD1M	:						:		636
LNJSD2F	:						:		636
LNJSD3M	:						:		636
LNJSD4F	:						:		636
LNJSD6F	:						:		636
LNJSD7M	:						:		636
LNJSD9M	:						:		636
LNJSD10F	:						:		636
LNJSD11M	:						:		636
LNJSD12F	:						:		636
LNJSD13M	:						:		636
LNJSD14F	:						:		636
LNJSD15M	:						:		636
LNJSD16F	:						:		636
LNJSD17M	:						:		636
LNJSD18F	:						:		636
LNJSD23M	:						:		636
LNJSD24F	:						:		636
LNJSD25M	:						:		636
LNJHK4F	:						:		636
LNJHK6F	:						:		636
LNJHK17M	:						:		636
LNJHK18M	:						:		636
LNJHK22M	:						:		636
LNJHK24M	:						:		636
LNJSD5M	:						:		636
LNJSD8F	:						:		636
LNJSD19M	:						:		636
LNJSD20F	:						:		636
LNJSD21M	:						:		636
LNJSD22F	:						:		636
LNLSD1M	:						:		636
LNLSD3M	:						:		636
LNLSD6F	:						:		636
LNLSD7M	:						:		636
LNLSD11M	:						:		636
LNLSD16F	:						:		636
LNLSD18F	:						:		636
LNLSD2F	:						:		636
LNLSD4F	:						:		636
LNLSD5M	:						:		636
LNLSD8F	:						:		636
LNLSD9M	:						:		636
LNLSD10F	:						:		636
LNLSD12F	:						:		636
LNLSD13M	:						:		636
LNLSD14F	:						:		636
LNLSD15M	:						:		636
LNLSD17M	:						:		636
LNLSD19M	:						:		636
LNLSD20F	:						:		636
LNLSD21M	:						:		636
LLCKS14F	:					A	:		636
LLCKS19M	:					A	:		636
LLCKS1M	:					A	:		636
LLKS22F	:					A	:		636
LLKS26F	:					A	:		636
LLCKS15M	:					A	:		636
LLCKS8F	:					A	:		636
LLCKS4F	:					A	:		636
LLCKS5M	:					A	:		636
LLCKS13M	:					A	:		636
LLCKS17M	:					A	:		636
LLCKS10F	:					A	:		636
LLCKS9M	:					A	:		636
LLCKS2F	:					A	:		636
LLCKS18F	:					A	:		636
LLCKS6F	:					A	:		636
LLHK10F	:					A	:		636
LLHK13F	:					A	:		636

LLLHK12F	:	A.....	:	636
LLLHK15F	:	A.....	:	636
LLLHK3F	:	A.....	:	636
LLLHK2F	:	A.....	:	636
LLLHK6F	:	A.....	:	636
LLLHK37M	:	A.....	:	636
LLLHK36M	:	A.....	:	636
LLLHK29M	:	A.....	:	636
LLLHK27M	:	A.....	:	636
LLLHK8F	:	A.....	:	636
LLLHK32M	:	A.....	:	636
LLLHK19F	:	A.....	:	636
LLLHK22F	:	A.....	:	636
LLLHK21F	:	A.....	:	636
LLLHK28M	:	A.....	:	636
LLLHK43M	:	A.....	:	636
LLLHK47M	:	A.....	:	636
LLLS37M	:	A.....	:	636
LLLHK49M	:	A.....	:	636
LLLS31M	:	A.....	:	636
LLLS35M	:	A.....	:	636
LLLS34F	:	A.....	:	636
LLLS30F	:	A.....	:	636
LLLS28F	:	A.....	:	636
LLLS27M	:	A.....	:	636
LLLS33M	:	A.....	:	636
LLLS23M	:	A.....	:	636
LLLS24F	:	A.....	:	636
LLLS21M	:	A.....	:	636
LLCKS12F	:	A.....	:	636
LLCKS11M	:	A.....	:	636
LLCKS20F	:	A.....	:	636
LLCKS16F	:	A.....	:	636
LLCKS7M	:	A.....	:	636
LLCKS3M	:	A.....	:	636
LLLHK30M	:	A.....	:	636
LLLHK17F	:	A.....	:	636
LLLHK18F	:	A.....	:	636
LLLHK39M	:	A.....	:	636
LLLHK44M	:	A.....	:	636
LLLHK48M	:	A.....	:	636
LLLS40F	:	A.....	:	636
LLLHK1F	:	A.....	:	636
LLLHK4F	:	A.....	:	636
LLLHK5F	:	A.....	:	636
LLLHK11F	:	A.....	:	636
LLLHK14F	:	A.....	:	636
LLLHK33M	:	A.....	:	636
LLLHK7F	:	A.....	:	636
LLLCM2M	:	A.....	:	636
LLLCM1F	:	A.....	:	636
LLLS32F	:	A.....	:	635
LLLHK16F	:	A.....	:	636
LLLHK25M	:	A.....	:	636
LLLHK34M	:	A.....	:	636
LLLHK20F	:	A.....	:	636
LLLHK46M	:	A.....	:	636
LLLS38F	:	A.....	:	636
LLLHK9F	:	A.....	:	636
LLLHK26M	:	A.....	:	636
LLLHK31M	:	A.....	:	636
LLLS39M	:	A.....	:	636
LLLHK35M	:	A.....	:	636
LLLHK41M	:	A.....	:	636
LLLHK42M	:	A.....	:	636
LLLHK23F	:	A.....	:	636
LLLHK38M	:	A.....	:	636
LLLHK40M	:	A.....	:	636
LLLS25M	:	A.....	:	636
LLLS36F	:	A.....	:	636
LLLHK45M	:	A.....	:	636
LLLS29M	:	A.....	:	636
<i>L. ignita</i>	:		:	636
<i>L. diardi</i>	:		:	635

	*	660	*	680	*	700	*	720	
LNJHK1F	:	AGCCTGGACTACTCCTGCGTTGCGTCCTATCCTAGTCTTCT	-	CGTGTCCCTCAATGAGACGGTTTGC	GTATGGGGAAT	:		715	
LNJHK8F	:		-			:		715	
LNJHK15M	:		-			:		715	
LNJHK19M	:		-			:		715	
LNJHK20M	:		-			:		715	
LNJHK2F	:		-			:		715	
LNJHK3F	:		-			:		715	
LNJHK5F	:		-			:		715	
LNJHK7F	:		-			:		715	
LNJHK23M	:		-			:		715	
LNJSD1M	:		-			:		715	
LNJSD2F	:		-			:		715	
LNJSD3M	:		-			:		715	
LNJSD4F	:		-			:		715	
LNJSD6F	:		-			:		715	
LNJSD7M	:		-			:		715	
LNJSD9M	:		-			:		715	
LNJSD10F	:		-			:		715	
LNJSD11M	:		-			:		715	
LNJSD12F	:		-			:		715	
LNJSD13M	:		-			:		715	
LNJSD14F	:		-			:		715	
LNJSD15M	:		-			:		715	
LNJSD16F	:		-			:		715	
LNJSD17M	:		-			:		715	
LNJSD18F	:		-			:		715	
LNJSD23M	:		-			:		715	
LNJSD24F	:		-			:		715	
LNJSD25M	:		-			:		715	
LNJHK4F	:		-			:		715	
LNJHK6F	:		-			:		715	
LNJHK17M	:		-			:		715	
LNJHK18M	:		-			:		715	
LNJHK22M	:		-			:		715	
LNJHK24M	:		-			:		715	
LNJSD5M	:		-			:		715	
LNJSD8F	:		-			:		715	
LNJSD19M	:		-			:		715	
LNJSD20F	:		-			:		715	
LNJSD21M	:		-			:		715	
LNJSD22F	:		-			:		715	
LNLSD1M	:	T.....	-			:		715	
LNLSD3M	:	T.....	-			:		715	
LNLSD6F	:	T.....	-			:		715	
LNLSD7M	:	T.....	-			:		715	
LNLSD11M	:	T.....	-			:		715	
LNLSD16F	:	T.....	-			:		715	
LNLSD18F	:	T.....	-			:		715	
LNLSD2F	:	T.....	-			:		715	
LNLSD4F	:	T.....	-			:		715	
LNLSD5M	:	T.....	-			:		715	
LNLSD8F	:	T.....	-			:		715	
LNLSD9M	:	T.....	-			:		715	
LNLSD10F	:	T.....	-			:		715	
LNLSD12F	:	T.....	-			:		715	
LNLSD13M	:	T.....	-			:		715	
LNLSD14F	:	T.....	-			:		715	
LNLSD15M	:	T.....	-			:		715	
LNLSD17M	:	T.....	-			:		715	
LNLSD19M	:	T.....	-			:		715	
LNLSD20F	:	T.....	-			:		715	
LNLSD21M	:	T.....	-			:		715	
LLCKS14F	:	C.....A.....G.....				:		716	
LLCKS19M	:	C.....A.....G.....				:		716	
LLCKS1M	:	C.....A.....G.....				:		716	
LLKS22F	:	C.....A.....G.....				:		716	
LLKS26F	:	C.....A.....G.....				:		716	
LLCKS15M	:	C.....A.....G.....				:		716	
LLCKS8F	:	C.....A.....G.....				:		716	
LLCKS4F	:	C.....A.....G.....				:		716	
LLCKS5M	:	C.....A.....G.....				:		716	
LLCKS13M	:	C.....A.....G.....				:		716	
LLCKS17M	:	C.....A.....G.....				:		716	
LLCKS10F	:	C.....A.....G.....				:		716	
LLCKS9M	:	C.....A.....G.....				:		716	
LLCKS2F	:	C.....A.....G.....				:		716	
LLCKS18F	:	C.....A.....G.....				:		716	
LLCKS6F	:	C.....A.....G.....				:		716	
LLHK10F	:	C.....A.....G.....				:		716	
LLHK13F	:	C.....A.....G.....				:		716	

LLLHK12F	:	C.....A.....G.....	:	716
LLLHK15F	:	C.....A.....G.....	:	716
LLLHK3F	:	C.....A.....G.....	:	716
LLLHK2F	:	C.....A.....G.....	:	716
LLLHK6F	:	C.....A.....G.....	:	716
LLLHK37M	:	C.....A.....G.....	:	716
LLLHK36M	:	C.....A.....G.....	:	716
LLLHK29M	:	C.....A.....G.....	:	716
LLLHK27M	:	C.....A.....G.....	:	716
LLLHK8F	:	C.....A.....G.....	:	716
LLLHK32M	:	C.....A.....G.....	:	716
LLLHK19F	:	C.....A.....G.....	:	716
LLLHK22F	:	C.....A.....G.....	:	716
LLLHK21F	:	C.....A.....G.....	:	716
LLLHK28M	:	C.....A.....G.....	:	716
LLLHK43M	:	C.....A.....G.....	:	716
LLLHK47M	:	C.....A.....G.....	:	716
LLLS37M	:	C.....A.....G.....	:	716
LLLHK49M	:	C.....A.....G.....	:	716
LLLS31M	:	C.....A.....G.....	:	716
LLLS35M	:	C.....A.....G.....	:	716
LLLS34F	:	C.....A.....G.....	:	716
LLLS30F	:	C.....A.....G.....	:	716
LLLS28F	:	C.....A.....G.....	:	716
LLLS27M	:	C.....A.....G.....	:	716
LLLS33M	:	C.....A.....G.....	:	716
LLLS23M	:	C.....A.....G.....	:	716
LLLS24F	:	C.....A.....G.....	:	716
LLLS21M	:	C.....A.....G.....	:	716
LLCKS12F	:	C.....A.....G.....	:	716
LLCKS11M	:	C.....A.....G.....	:	716
LLCKS20F	:	C.....A.....G.....	:	716
LLCKS16F	:	C.....A.....G.....	:	716
LLCKS7M	:	C.....A.....G.....	:	716
LLCKS3M	:	C.....A.....G.....	:	716
LLLHK30M	:	C.....A.....G.....	:	716
LLLHK17F	:	C.....A.....G.....	:	716
LLLHK18F	:	C.....A.....G.....	:	716
LLLHK39M	:	C.....A.....G.....	:	716
LLLHK44M	:	C.....A.....G.....	:	716
LLLHK48M	:	C.....A.....G.....	:	716
LLLS40F	:	C.....A.....G.....	:	716
LLLHK1F	:	C.....A.....G.....	:	716
LLLHK4F	:	C.....A.....G.....	:	716
LLLHK5F	:	C.....A.....G.....	:	716
LLLHK11F	:	C.....A.....G.....	:	716
LLLHK14F	:	C.....A.....G.....	:	716
LLLHK33M	:	C.....A.....G.....	:	716
LLLHK7F	:	C.....A.....G.....	:	716
LLLCM2M	:	C.....A.....G.....	:	716
LLLCM1F	:	C.....A.....G.....	:	716
LLLS32F	:	C.....A.....G.....	:	715
LLLHK16F	:	C.....A.....G.....	:	716
LLLHK25M	:	C.....A.....G.....	:	716
LLLHK34M	:	C.....A.....G.....	:	716
LLLHK20F	:	C.....A.....G.....	:	716
LLLHK46M	:	C.....A.....G.....	:	716
LLLS38F	:	C.....A.....G.....	:	716
LLLHK9F	:	C.....A.....G.....	:	716
LLLHK26M	:	C.....A.....G.....	:	716
LLLHK31M	:	C.....A.....G.....	:	716
LLLS39M	:	C.....A.....G.....	:	716
LLLHK35M	:	C.....A.....G.....	:	716
LLLHK41M	:	C.....A.....G.....	:	716
LLLHK42M	:	C.....A.....G.....	:	716
LLLHK23F	:	C.....A.....G.....	:	716
LLLHK38M	:	C.....A.....G.....	:	716
LLLHK40M	:	C.....A.....G.....	:	716
LLLS25M	:	C.....A.....G.....	:	716
LLLS36F	:	C.....A.....G.....	:	716
LLLHK45M	:	C.....A.....G.....	:	716
LLLS29M	:	C.....A.....G.....	:	716
<i>L. ignita</i>	:	C.....-.....G.....	:	715
<i>L. diardi</i>	:	T.....-.....	:	714

	*	740	*	760	*	780	*	800	
LNJHK1F	:	CATCTTGACACTGATGCAC	TTTGGATCGCATT	TGGTTATGGCTCTTCCACCCTCCCGGCTAAATGGT	GCTATATAGTGAA	:		795	
LNJHK8F	:					:		795	
LNJHK15M	:					:		795	
LNJHK19M	:					:		795	
LNJHK20M	:					:		795	
LNJHK2F	:					:		795	
LNJHK3F	:					:		795	
LNJHK5F	:					:		795	
LNJHK7F	:					:		795	
LNJHK23M	:					:		795	
LNJSD1M	:					:		795	
LNJSD2F	:					:		795	
LNJSD3M	:					:		795	
LNJSD4F	:					:		795	
LNJSD6F	:					:		795	
LNJSD7M	:					:		795	
LNJSD9M	:					:		795	
LNJSD10F	:					:		795	
LNJSD11M	:					:		795	
LNJSD12F	:					:		795	
LNJSD13M	:					:		795	
LNJSD14F	:					:		795	
LNJSD15M	:					:		795	
LNJSD16F	:					:		795	
LNJSD17M	:					:		795	
LNJSD18F	:					:		795	
LNJSD23M	:					:		795	
LNJSD24F	:					:		795	
LNJSD25M	:					:		795	
LNJHK4F	:					:		795	
LNJHK6F	:					:		795	
LNJHK17M	:					:		795	
LNJHK18M	:					:		795	
LNJHK22M	:					:		795	
LNJHK24M	:					:		795	
LNJSD5M	:					:		795	
LNJSD8F	:					:		795	
LNJSD19M	:					:		795	
LNJSD20F	:					:		795	
LNJSD21M	:					:		795	
LNJSD22F	:					:		795	
LNLSD1M	:					:		795	
LNLSD3M	:					:		795	
LNLSD6F	:					:		795	
LNLSD7M	:					:		795	
LNLSD11M	:					:		795	
LNLSD16F	:					:		795	
LNLSD18F	:					:		795	
LNLSD2F	:					:		795	
LNLSD4F	:					:		795	
LNLSD5M	:					:		795	
LNLSD8F	:					:		795	
LNLSD9M	:					:		795	
LNLSD10F	:					:		795	
LNLSD12F	:					:		795	
LNLSD13M	:					:		795	
LNLSD14F	:					:		795	
LNLSD15M	:					:		795	
LNLSD17M	:					:		795	
LNLSD19M	:					:		795	
LNLSD20F	:					:		795	
LNLSD21M	:					:		795	
LLCKS14F	:					:		796	
LLCKS19M	:					:		796	
LLCKS1M	:					:		796	
LLKS22F	:					:		796	
LLKS26F	:					:		796	
LLCKS15M	:					:		796	
LLCKS8F	:					:		796	
LLCKS4F	:					:		796	
LLCKS5M	:					:		796	
LLCKS13M	:					:		796	
LLCKS17M	:					:		796	
LLCKS10F	:					:		796	
LLCKS9M	:					:		796	
LLCKS2F	:					:		796	
LLCKS18F	:					:		796	
LLCKS6F	:					:		796	
LLHK10F	:					:		796	
LLHK13F	:					:		796	

LLLHK12F	:	796
LLLHK15F	:	796
LLLHK3F	:	796
LLLHK2F	:	796
LLLHK6F	:	796
LLLHK37M	:	796
LLLHK36M	:	796
LLLHK29M	:	796
LLLHK27M	:	796
LLLHK8F	:	796
LLLHK32M	:	796
LLLHK19F	:	796
LLLHK22F	:	796
LLLHK21F	:	796
LLLHK28M	:	796
LLLHK43M	:	796
LLLHK47M	:	796
LLLS37M	:	796
LLLS49M	:	796
LLLS31M	:	796
LLLS35M	:	796
LLLS34F	:	796
LLLS30F	:	796
LLLS28F	:	796
LLLS27M	:	796
LLLS33M	:	796
LLLS23M	:	796
LLLS24F	:	796
LLLS21M	:	796
LLCKS12F	:	796
LLCKS11M	:	796
LLCKS20F	:	796
LLCKS16F	:	796
LLCKS7M	:	796
LLCKS3M	:	796
LLLHK30M	:	796
LLLHK17F	:	796
LLLHK18F	:	796
LLLHK39M	:	796
LLLHK44M	:	796
LLLHK48M	:	796
LLLS40F	:	796
LLLHK1F	:	796
LLLHK4F	:	796
LLLHK5F	:	796
LLLHK11F	:	796
LLLHK14F	:	796
LLLHK33M	:	796
LLLHK7F	:	796
LLLCM2M	:	796
LLLCM1F	:	796
LLLS32F	:	795
LLLHK16F	:	796
LLLHK25M	:	796
LLLHK34M	:	796
LLLHK20F	:	796
LLLHK46M	:	796
LLLS38F	:	796
LLLHK9F	:	796
LLLHK26M	:	796
LLLHK31M	:	796
LLLS39M	:	796
LLLHK35M	:	796
LLLHK41M	:	796
LLLHK42M	:	796
LLLHK23F	:	796
LLLHK38M	:	796
LLLHK40M	:	796
LLLS25M	:	796
LLLS36F	:	796
LLLHK45M	:	796
LLLS29M	:	796
<i>L. ignita</i>	: C T G T	794
<i>L. diardi</i>	: G T	794

	* 820	* 840	* 860	* 880				
LNJHK1F	: TGCTTGT	CGGACATATTTT	TACAAATTTT	CACTTCTCTATTTT	CTTCACAAA	ACTAGGAGATTGCCACAATTTT	CT	: 875
LNJHK8F	:							: 875
LNJHK15M	:							: 875
LNJHK19M	:							: 875
LNJHK20M	:							: 875
LNJHK2F	:							: 875
LNJHK3F	:							: 875
LNJHK5F	:							: 875
LNJHK7F	:							: 875
LNJHK23M	:							: 875
LNJSD1M	:							: 875
LNJSD2F	:							: 875
LNJSD3M	:							: 875
LNJSD4F	:							: 875
LNJSD6F	:							: 875
LNJSD7M	:							: 875
LNJSD9M	:							: 875
LNJSD10F	:							: 875
LNJSD11M	:							: 875
LNJSD12F	:							: 875
LNJSD13M	:							: 875
LNJSD14F	:							: 875
LNJSD15M	:							: 875
LNJSD16F	:							: 875
LNJSD17M	:							: 875
LNJSD18F	:							: 875
LNJSD23M	:							: 875
LNJSD24F	:							: 875
LNJSD25M	:							: 875
LNJHK4F	:							: 875
LNJHK6F	:							: 875
LNJHK17M	:							: 875
LNJHK18M	:							: 875
LNJHK22M	:							: 875
LNJHK24M	:							: 875
LNJSD5M	:							: 875
LNJSD8F	:							: 875
LNJSD19M	:							: 875
LNJSD20F	:							: 875
LNJSD21M	:							: 875
LNJSD22F	:							: 875
LNLSD1M	:							: 875
LNLSD3M	:							: 875
LNLSD6F	:							: 875
LNLSD7M	:							: 875
LNLSD11M	:							: 875
LNLSD16F	:							: 875
LNLSD18F	:							: 875
LNLSD2F	:							: 875
LNLSD4F	:							: 875
LNLSD5M	:							: 875
LNLSD8F	:							: 875
LNLSD9M	:							: 875
LNLSD10F	:							: 875
LNLSD12F	:							: 875
LNLSD13M	:							: 875
LNLSD14F	:							: 875
LNLSD15M	:							: 875
LNLSD17M	:							: 875
LNLSD19M	:							: 875
LNLSD20F	:							: 875
LNLSD21M	:							: 875
LLCKS14F	:					C		: 876
LLCKS19M	:					C		: 876
LLCKS1M	:					C		: 876
LLKS22F	:					C		: 876
LLKS26F	:					C		: 876
LLCKS15M	:					C		: 876
LLCKS8F	:					C		: 876
LLCKS4F	:					C		: 876
LLCKS5M	:					C		: 876
LLCKS13M	:					C		: 876
LLCKS17M	:					C		: 876
LLCKS10F	:					C		: 876
LLCKS9M	:					C		: 876
LLCKS2F	:					C		: 876
LLCKS18F	:					C		: 876
LLCKS6F	:					G	C	: 876
LLHK10F	:					G	C	: 876
LLHK13F	:					G	C	: 876

LLLHK12F	:	G..C.....	:	876
LLLHK15F	:	G..C.....	:	876
LLLHK3F	:	G..C.....	:	876
LLLHK2F	:	G..C.....	:	876
LLLHK6F	:	G..C.....	:	876
LLLHK37M	:	G..C.....	:	876
LLLHK36M	:	G..C.....	:	876
LLLHK29M	:	G..C.....	:	876
LLLHK27M	:	G..C.....	:	876
LLLHK8F	:	G..C.....	:	876
LLLHK32M	:	G..C.....	:	876
LLLHK19F	:	G..C.....	:	876
LLLHK22F	:	G..C.....	:	876
LLLHK21F	:	G..C.....	:	876
LLLHK28M	:	G..C.....	:	876
LLLHK43M	:	G..C.....	:	876
LLLHK47M	:	G..C.....	:	876
LLLSK37M	:	G..C.....	:	876
LLLHK49M	:	G..C.....	:	876
LLLSK31M	:	C.....	:	876
LLLSK35M	:	C.....	:	876
LLLSK34F	:	C.....	:	876
LLLSK30F	:	C.....	:	876
LLLSK28F	:	C.....	:	876
LLLSK27M	:	C.....	:	876
LLLSK33M	:	C.....	:	876
LLLSK23M	:	C.....	:	876
LLLSK24F	:	C.....	:	876
LLLSK21M	:	C.....	:	876
LLCKS12F	:	C.....	:	876
LLCKS11M	:	C.....	:	876
LLCKS20F	:	C.....	:	876
LLCKS16F	:	C.....	:	876
LLCKS7M	:	C.....	:	876
LLCKS3M	:	C.....	:	876
LLLHK30M	:	C.....	:	876
LLLHK17F	:	C.....	:	876
LLLHK18F	:	C.....	:	876
LLLHK39M	:	C.....	:	876
LLLHK44M	:	C.....	:	876
LLLHK48M	:	C.....	:	876
LLLSK40F	:	C.....	:	876
LLLHK1F	:	C.....	:	876
LLLHK4F	:	C.....	:	876
LLLHK5F	:	C.....	:	876
LLLHK11F	:	C.....	:	876
LLLHK14F	:	C.....	:	876
LLLHK33M	:	C.....	:	876
LLLHK7F	:	C.....	:	876
LLLCM2M	:	C.....	:	876
LLLCM1F	:	C.....	:	876
LLLSK32F	:	C.....	:	875
LLLHK16F	:	A.....C.....	:	876
LLLHK25M	:	A.....C.....	:	876
LLLHK34M	:	A.....C.....	:	876
LLLHK20F	:	A.....C.....	:	876
LLLHK46M	:	A.....C.....	:	876
LLLSK38F	:	A.....C.....	:	876
LLLHK9F	:	A.....C.....	:	876
LLLHK26M	:	C.....	:	876
LLLHK31M	:	C.....	:	876
LLLSK39M	:	C.....	:	876
LLLHK35M	:	C.....	:	876
LLLHK41M	:	C.....	:	876
LLLHK42M	:	C.....	:	876
LLLHK23F	:	C.....	:	876
LLLHK38M	:	C.....	:	876
LLLHK40M	:	C.....	:	876
LLLSK25M	:	C.....	:	876
LLLSK36F	:	C.....	:	876
LLLHK45M	:	C.....	:	876
LLLSK29M	:	C.....	:	876
<i>L. ignita</i>	:	C.....A.....AT	:	874
<i>L. diardi</i>	:	C.....CA.....	:	874

	*	900	*	920	*	940	*	960	
LNJHK1F	:	TTAGTTTTTTATTATTTTTTTTAAAAAAATTTTTAAAAAACTAAATTAACTAAACTACCGCATAAAAACCCCTCAAACC	:	955					
LNJHK8F	:		:	955					
LNJHK15M	:		:	955					
LNJHK19M	:		:	955					
LNJHK20M	:		:	955					
LNJHK2F	:		:	955					
LNJHK3F	:		:	955					
LNJHK5F	:		:	955					
LNJHK7F	:		:	955					
LNJHK23M	:		:	955					
LNJSD1M	:		:	955					
LNJSD2F	:		:	955					
LNJSD3M	:		:	955					
LNJSD4F	:		:	955					
LNJSD6F	:		:	955					
LNJSD7M	:		:	955					
LNJSD9M	:		:	955					
LNJSD10F	:		:	955					
LNJSD11M	:		:	955					
LNJSD12F	:		:	955					
LNJSD13M	:		:	955					
LNJSD14F	:		:	955					
LNJSD15M	:		:	955					
LNJSD16F	:		:	955					
LNJSD17M	:		:	955					
LNJSD18F	:		:	955					
LNJSD23M	:		:	955					
LNJSD24F	:		:	955					
LNJSD25M	:		:	955					
LNJHK4F	:		:	955					
LNJHK6F	:		:	955					
LNJHK17M	:		:	955					
LNJHK18M	:		:	955					
LNJHK22M	:		:	955					
LNJHK24M	:		:	955					
LNJSD5M	:		:	955					
LNJSD8F	:		:	955					
LNJSD19M	:		:	955					
LNJSD20F	:		:	955					
LNJSD21M	:		:	955					
LNJSD22F	:		:	955					
LNLSD1M	:	T.....	:	955					
LNLSD3M	:	T.....	:	955					
LNLSD6F	:	T.....	:	955					
LNLSD7M	:	T.....	:	955					
LNLSD11M	:	T.....	:	955					
LNLSD16F	:	T.....	:	955					
LNLSD18F	:	T.....	:	955					
LNLSD2F	:	T.....	:	955					
LNLSD4F	:	T.....	:	955					
LNLSD5M	:	T.....	:	955					
LNLSD8F	:	T.....	:	955					
LNLSD9M	:	T.....	:	955					
LNLSD10F	:	T.....	:	955					
LNLSD12F	:	T.....	:	955					
LNLSD13M	:	T.....	:	955					
LNLSD14F	:	T.....	:	955					
LNLSD15M	:	T.....	:	955					
LNLSD17M	:	T.....	:	955					
LNLSD19M	:	T.....	:	955					
LNLSD20F	:	T.....	:	955					
LNLSD21M	:	T.....	:	955					
LLCKS14F	:	T.....	:	956					
LLCKS19M	:	T.....	:	956					
LLCKS1M	:	T.....	:	956					
LLKS22F	:	T.....	:	956					
LLKS26F	:	T.....	:	956					
LLCKS15M	:	T.....	:	956					
LLCKS8F	:	T.....	:	956					
LLCKS4F	:	T.....	:	956					
LLCKS5M	:	T.....	:	956					
LLCKS13M	:	T.....	:	956					
LLCKS17M	:	T.....	:	956					
LLCKS10F	:	T.....	:	956					
LLCKS9M	:	T.....	:	956					
LLCKS2F	:	T.....	:	956					
LLCKS18F	:	T.....	:	956					
LLCKS6F	:	T.....	:	956					
LLHK10F	:	T.....	:	956					
LLHK13F	:	T.....	:	956					

LLLHK12F	:	T.....	:	956
LLLHK15F	:	T.....	:	956
LLLHK3F	:	T.....	:	956
LLLHK2F	:	T.....	:	956
LLLHK6F	:	T.....	:	956
LLLHK37M	:	T.....	:	956
LLLHK36M	:	T.....	:	956
LLLHK29M	:	T.....	:	956
LLLHK27M	:	T.....	:	956
LLLHK8F	:	T.....	:	956
LLLHK32M	:	T.....	:	956
LLLHK19F	:	T.....	:	956
LLLHK22F	:	T.....	:	956
LLLHK21F	:	T.....	:	956
LLLHK28M	:	T.....	:	956
LLLHK43M	:	T.....	:	956
LLLHK47M	:	T.....	:	956
LLLS37M	:	T.....	:	956
LLLHK49M	:	T.....	:	956
LLLS31M	:	T.....	:	956
LLLS35M	:	T.....	:	956
LLLS34F	:	T.....	:	956
LLLS30F	:	T.....	:	956
LLLS28F	:	T.....	:	956
LLLS27M	:	T.....	:	956
LLLS33M	:	T.....	:	956
LLLS23M	:	T.....	:	956
LLLS24F	:	T.....	:	956
LLLS21M	:	T.....	:	956
LLCKS12F	:	T.....	:	956
LLCKS11M	:	T.....	:	956
LLCKS20F	:	T.....	:	956
LLCKS16F	:	T.....	:	956
LLCKS7M	:	T.....	:	956
LLCKS3M	:	T.....	:	956
LLLHK30M	:	T.....	:	956
LLLHK17F	:	T.....	:	956
LLLHK18F	:	T.....	:	956
LLLHK39M	:	T.....	:	956
LLLHK44M	:	T.....	:	956
LLLHK48M	:	T.....	:	956
LLLS40F	:	T.....	:	956
LLLHK1F	:	T.....	:	956
LLLHK4F	:	T.....	:	956
LLLHK5F	:	T.....	:	956
LLLHK11F	:	T.....	:	956
LLLHK14F	:	T.....	:	956
LLLHK33M	:	T.....	:	956
LLLHK7F	:	T.....	:	956
LLLCM2M	:	T.....	:	956
LLLCM1F	:	T.....	:	956
LLLS32F	:	T.....	:	955
LLLHK16F	:	T.....	:	956
LLLHK25M	:	T.....	:	956
LLLHK34M	:	T.....	:	956
LLLHK20F	:	T.....	:	956
LLLHK46M	:	T.....	:	956
LLLS38F	:	T.....	:	956
LLLHK9F	:	T.....	:	956
LLLHK26M	:	T.....	:	956
LLLHK31M	:	T.....	:	956
LLLS39M	:	T.....	:	956
LLLHK35M	:	T.....	:	956
LLLHK41M	:	T.....	:	956
LLLHK42M	:	T.....	:	956
LLLHK23F	:	T.....	:	956
LLLHK38M	:	T.....	:	956
LLLHK40M	:	T.....	:	956
LLLS25M	:	T.....	:	956
LLLS36F	:	T.....	:	956
LLLHK45M	:	T.....	:	956
LLLS29M	:	T.....	:	956
<i>L. ignita</i>	:	..C.....T.....	:	954
<i>L. diardi</i>	:	AT.....T.....	:	953

	*	980	*	1000	*	1020	*	1040	
LNJHK1F	:	ATAAAAAACGTTCCGTTTAAATATATACACATTGTTATATTAAACATTTTATTAGAGAAACTCCACTACTAAACTTACTTT	:		:		:		1035
LNJHK8F	:		:		:		:		1035
LNJHK15M	:		:		:		:		1035
LNJHK19M	:		:		:		:		1035
LNJHK20M	:		:		:		:		1035
LNJHK2F	:		:		:		:		1035
LNJHK3F	:		:		:		:		1035
LNJHK5F	:		:		:		:		1035
LNJHK7F	:		:		:		:		1035
LNJHK23M	:		:		:		:		1035
LNJSD1M	:		:		:		:		1035
LNJSD2F	:		:		:		:		1035
LNJSD3M	:		:		:		:		1035
LNJSD4F	:		:		:		:		1035
LNJSD6F	:		:		:		:		1035
LNJSD7M	:		:		:		:		1035
LNJSD9M	:		:		:		:		1035
LNJSD10F	:		:		:		:		1035
LNJSD11M	:		:		:		:		1035
LNJSD12F	:		:		:		:		1035
LNJSD13M	:		:		:		:		1035
LNJSD14F	:		:		:		:		1035
LNJSD15M	:		:		:		:		1035
LNJSD16F	:		:		:		:		1035
LNJSD17M	:		:		:		:		1035
LNJSD18F	:		:		:		:		1035
LNJSD23M	:		:		:		:		1035
LNJSD24F	:		:		:		:		1035
LNJSD25M	:		:		:		:		1035
LNJHK4F	:		:		:		:		1035
LNJHK6F	:		:		:		:		1035
LNJHK17M	:		:		:		:		1035
LNJHK18M	:		:		:		:		1035
LNJHK22M	:		:		:		:		1035
LNJHK24M	:		:		:		:		1035
LNJSD5M	:		:		:		:		1035
LNJSD8F	:		:		:		:		1035
LNJSD19M	:		:		:		:		1035
LNJSD20F	:		:		:		:		1035
LNJSD21M	:		:		:		:		1035
LNJSD22F	:		:		:		:		1035
LNLSD1M	:		:		:		:		1035
LNLSD3M	:		:		:		:		1035
LNLSD6F	:		:		:		:		1035
LNLSD7M	:		:		:		:		1035
LNLSD11M	:		:		:		:		1035
LNLSD16F	:		:		:		:		1035
LNLSD18F	:		:		:		:		1035
LNLSD2F	:		:		:		:		1035
LNLSD4F	:		:		:		:		1035
LNLSD5M	:		:		:		:		1035
LNLSD8F	:		:		:		:		1035
LNLSD9M	:		:		:		:		1035
LNLSD10F	:		:		:		:		1035
LNLSD12F	:		:		:		:		1035
LNLSD13M	:		:		:		:		1035
LNLSD14F	:		:		:		:		1035
LNLSD15M	:		:		:		:		1035
LNLSD17M	:		:		:		:		1035
LNLSD19M	:		:		:		:		1035
LNLSD20F	:		:		:		:		1035
LNLSD21M	:		:		:		:		1035
LLCKS14F	:	T.....	:	A.....	:	C.....	:		1036
LLCKS19M	:	T.....	:	A.....	:	A.....C.....	:		1036
LLCKS1M	:	T.....	:	A.....	:	C.....	:		1036
LLKS22F	:	T.....	:	A.....	:	C.....	:		1036
LLKS26F	:	T.....	:	A.....	:	C.....	:		1036
LLCKS15M	:	T.....	:	A.....	:	C.....	:		1036
LLCKS8F	:	T.....	:	A.....	:	C.....	:		1036
LLCKS4F	:	T.....	:	A.....	:	C.....	:		1036
LLCKS5M	:	T.....	:	A.....	:	C.....	:		1036
LLCKS13M	:	T.....	:	A.....	:	C.....	:		1036
LLCKS17M	:	T.....	:	A.....	:	C.....	:		1036
LLCKS10F	:	T.....	:	A.....	:	C.....	:		1036
LLCKS9M	:	T.....	:	A.....	:	C.....	:		1036
LLCKS2F	:	T.....	:	A.....	:	C.....	:		1036
LLCKS18F	:	T.....	:	A.....	:	C.....	:		1036
LLCKS6F	:	T.....	:	A.....	:	C.....	:		1036
LLHK10F	:	T.....	:	A.....	:	C.....	:		1036
LLHK13F	:	T.....	:	A.....	:	C.....	:		1036

LLLHK12F	:	T.....A.....C.....	: 1036
LLLHK15F	:	T.....A.....C.....	: 1036
LLLHK3F	:	T.....A.....C.....	: 1036
LLLHK2F	:	T.....A.....C.....	: 1036
LLLHK6F	:	T.....A.....C.....	: 1036
LLLHK37M	:	T.....A.....C.....	: 1036
LLLHK36M	:	T.....A.....C.....	: 1036
LLLHK29M	:	T.....A.....C.....	: 1036
LLLHK27M	:	T.....A.....C.....	: 1036
LLLHK8F	:	T.....A.....C.....	: 1036
LLLHK32M	:	T.....A.....C.....	: 1036
LLLHK19F	:	T.....A.....C.....	: 1036
LLLHK22F	:	T.....A.....C.....	: 1036
LLLHK21F	:	T.....A.....C.....	: 1036
LLLHK28M	:	T.....A.....C.....	: 1036
LLLHK43M	:	T.....A.....C.....	: 1036
LLLHK47M	:	T.....A.....C.....	: 1036
LLLS37M	:	T.....A.....C.....	: 1036
LLLHK49M	:	T.....A.....C.....	: 1036
LLLS31M	:	T.....A.....C.....	: 1036
LLLS35M	:	T.....A.....C.....	: 1036
LLLS34F	:	T.....A.....C.....	: 1036
LLLS30F	:	T.....A.....C.....	: 1036
LLLS28F	:	T.....A.....C.....	: 1036
LLLS27M	:	T.....A.....C.....	: 1036
LLLS33M	:	T.....A.....C.....	: 1036
LLLS23M	:	T.....A.....C.....	: 1036
LLLS24F	:	T.....A.....C.....	: 1036
LLLS21M	:	T.....A.....C.....	: 1036
LLCKS12F	:	T.....A.....C.....	: 1036
LLCKS11M	:	T.....A.....C.....	: 1036
LLCKS20F	:	T.....A.....C.....	: 1036
LLCKS16F	:	T.....A.....C.....	: 1036
LLCKS7M	:	T.....A.....C.....	: 1036
LLCKS3M	:	T.....A.....C.....	: 1036
LLLHK30M	:	T.....A.....C.....	: 1036
LLLHK17F	:	T.....A.....C.....	: 1036
LLLHK18F	:	T.....A.....C.....	: 1036
LLLHK39M	:	T.....A.....C.....	: 1036
LLLHK44M	:	T.....A.....C.....	: 1036
LLLHK48M	:	T.....A.....C.....	: 1036
LLLS40F	:	T.....A.....C.....	: 1036
LLLHK1F	:	T.....A.....C.....	: 1036
LLLHK4F	:	T.....A.....C.....	: 1036
LLLHK5F	:	T.....A.....C.....	: 1036
LLLHK11F	:	T.....A.....C.....	: 1036
LLLHK14F	:	T.....A.....C.....	: 1036
LLLHK33M	:	T.....A.....C.....	: 1036
LLLHK7F	:	T.....A.....C.....	: 1036
LLLCM2M	:	T.....A.....C.....	: 1036
LLLCM1F	:	T.....A.....C.....	: 1036
LLLS32F	:	T.....A.....C.....	: 1035
LLLHK16F	:	T.....A.....C.....	: 1036
LLLHK25M	:	T.....A.....C.....	: 1036
LLLHK34M	:	T.....A.....C.....	: 1036
LLLHK20F	:	T.....A.....C.....	: 1036
LLLHK46M	:	T.....A.....C.....	: 1036
LLLS38F	:	T.....A.....C.....	: 1036
LLLHK9F	:	T.....A.....C.....	: 1036
LLLHK26M	:	T.....A.....C.....	: 1036
LLLHK31M	:	T.....A.....C.....	: 1036
LLLS39M	:	T.....A.....C.....	: 1036
LLLHK35M	:	T.....A.....C.....	: 1036
LLLHK41M	:	T.....A.....C.....	: 1036
LLLHK42M	:	T.....A.....C.....	: 1036
LLLHK23F	:	T.....A.....C.....	: 1036
LLLHK38M	:	T.....A.....C.....	: 1036
LLLHK40M	:	T.....A.....C.....	: 1036
LLLS25M	:	T.....A.....C.....	: 1036
LLLS36F	:	T.....A.....C.....	: 1036
LLLHK45M	:	T.....A.....C.....	: 1036
LLLS29M	:	T.....A.....C.....	: 1036
<i>L. ignita</i>	:	T.....G.....C.....	: 1034
<i>L. diardi</i>	:	T.....G.....T.....C.....T.....	: 1033

	*	1060	*	1080	*	1100	*	
LNJHK1F	:	TCTAAATACAAAAA	-	TTACATTGGACAAAACCTGCAAACAAACATTATTTATATTAACGATAACCAAATAGCTCAA	:			1111
LNJHK8F	:	-			:			1111
LNJHK15M	:	-			:			1111
LNJHK19M	:	-			:			1111
LNJHK20M	:	-			:			1111
LNJHK2F	:	-			:			1111
LNJHK3F	:	-			:			1111
LNJHK5F	:	-			:			1111
LNJHK7F	:	-			:			1111
LNJHK23M	:	-			:			1111
LNJSD1M	:	-			:			1111
LNJSD2F	:	-			:			1111
LNJSD3M	:	-			:			1111
LNJSD4F	:	-			:			1111
LNJSD6F	:	-			:			1111
LNJSD7M	:	-			:			1111
LNJSD9M	:	-			:			1111
LNJSD10F	:	-			:			1111
LNJSD11M	:	-			:			1111
LNJSD12F	:	-			:			1111
LNJSD13M	:	-			:			1111
LNJSD14F	:	-			:			1111
LNJSD15M	:	-			:			1111
LNJSD16F	:	-			:			1111
LNJSD17M	:	-			:			1111
LNJSD18F	:	-			:			1111
LNJSD23M	:	-			:			1111
LNJSD24F	:	-			:			1111
LNJSD25M	:	-			:			1111
LNJHK4F	:	-			:			1111
LNJHK6F	:	-			:			1111
LNJHK17M	:	-			:			1111
LNJHK18M	:	-			:			1111
LNJHK22M	:	-			:			1111
LNJHK24M	:	-			:			1111
LNJSD5M	:	-			:			1111
LNJSD8F	:	-			:			1111
LNJSD19M	:	-			:			1111
LNJSD20F	:	-			:			1111
LNJSD21M	:	-			:			1111
LNJSD22F	:	-			:			1111
LNLSD1M	:	-		G.....	:			1111
LNLSD3M	:	-		G.....	:			1111
LNLSD6F	:	-		G.....	:			1111
LNLSD7M	:	-		G.....	:			1111
LNLSD11M	:	-		G.....	:			1111
LNLSD16F	:	-		G.....	:			1111
LNLSD18F	:	-		G.....	:			1111
LNLSD2F	:	-		G.....	:			1111
LNLSD4F	:	-		G.....	:			1111
LNLSD5M	:	-		G.....	:			1111
LNLSD8F	:	-		G.....	:			1111
LNLSD9M	:	-		G.....	:			1111
LNLSD10F	:	-		G.....	:			1111
LNLSD12F	:	-		G.....	:			1111
LNLSD13M	:	-		G.....	:			1111
LNLSD14F	:	-		G.....	:			1111
LNLSD15M	:	-		G.....	:			1111
LNLSD17M	:	-		G.....	:			1111
LNLSD19M	:	-		G.....	:			1111
LNLSD20F	:	-		G.....	:			1111
LNLSD21M	:	-		G.....	:			1111
LLCKS14F	:	-		G.....	:			1112
LLCKS19M	:	-		G.....	:			1112
LLCKS1M	:	-		G.....	:			1112
LLKS22F	:	-		G.....	:			1112
LLKS26F	:	-		G.....	:			1112
LLCKS15M	:	-		G.....	:			1112
LLCKS8F	:	-		G.....	:			1112
LLCKS4F	:	-		G.....	:			1112
LLCKS5M	:	-		G.....	:			1112
LLCKS13M	:	-		G.....	:			1112
LLCKS17M	:	-		G.....	:			1112
LLCKS10F	:	-		G.....	:			1112
LLCKS9M	:	-		G.....	:			1112
LLCKS2F	:	-		G.....	:			1112
LLCKS18F	:	-		G.....	:			1112
LLCKS6F	:	-		G.....	:			1112
LLHK10F	:	-		G.....	:			1112

LLLHK13F	:	-	G.....	:	1112
LLLHK12F	:	-	G.....	:	1112
LLLHK15F	:	-	G.....	:	1112
LLLHK3F	:	-	G.....	:	1112
LLLHK2F	:	-	G.....	:	1112
LLLHK6F	:	-	G.....	:	1112
LLLHK37M	:	-	G.....	:	1112
LLLHK36M	:	-	G.....	:	1112
LLLHK29M	:	-	G.....	:	1112
LLLHK27M	:	-	G.....	:	1112
LLLHK8F	:	-	G.....	:	1112
LLLHK32M	:	-	G.....	:	1112
LLLHK19F	:	-	G.....	:	1112
LLLHK22F	:	-	G.....	:	1112
LLLHK21F	:	-	G.....	:	1112
LLLHK28M	:	-	G.....	:	1112
LLLHK43M	:	-	G.....	:	1112
LLLHK47M	:	-	G.....	:	1112
LLLS37M	:	-	G.....	:	1112
LLLHK49M	:	-	G.....	:	1112
LLLS31M	:	-	G.....	:	1112
LLLS35M	:	-	G.....	:	1112
LLLS34F	:	-	G.....	:	1112
LLLS30F	:	-	G.....	:	1112
LLLS28F	:	-	G.....	:	1112
LLLS27M	:	-	G.....	:	1112
LLLS33M	:	-	G.....	:	1112
LLLS23M	:	-	G.....	:	1112
LLLS24F	:	-	G.....	:	1112
LLLS21M	:	-	G.....	:	1112
LLCKS12F	:	-	G.....	:	1112
LLCKS11M	:	-	G.....	:	1112
LLCKS20F	:	-	G.....	:	1112
LLCKS16F	:	-	G.....	:	1112
LLCKS7M	:	-	G.....	:	1112
LLCKS3M	:	-	G.....	:	1112
LLLHK30M	:	-	G.....	:	1112
LLLHK17F	:	-	G.....	:	1112
LLLHK18F	:	-	G.....	:	1112
LLLHK39M	:	-	G.....	:	1112
LLLHK44M	:	-	G.....	:	1112
LLLHK48M	:	-	G.....	:	1112
LLLS40F	:	-	G.....	:	1112
LLLHK1F	:	-	G.....	:	1112
LLLHK4F	:	-	G.....	:	1112
LLLHK5F	:	-	G.....	:	1112
LLLHK11F	:	-	G.....	:	1112
LLLHK14F	:	-	G.....	:	1112
LLLHK33M	:	-	G.....	:	1112
LLLHK7F	:	-	G.....	:	1112
LLLCM2M	:	-	G.....	:	1112
LLLCM1F	:	-	G.....	:	1112
LLLS32F	:	-	G.....	:	1111
LLLHK16F	:	-	G.....	:	1112
LLLHK25M	:	-	G.....	:	1112
LLLHK34M	:	-	G.....	:	1112
LLLHK20F	:	-	G.....	:	1112
LLLHK46M	:	-	G.....	:	1112
LLLS38F	:	-	G.....	:	1112
LLLHK9F	:	-	G.....	:	1112
LLLHK26M	:	-	G.....	:	1112
LLLHK31M	:	-	G.....	:	1112
LLLS39M	:	-	G.....	:	1112
LLLHK35M	:	-	G.....	:	1112
LLLHK41M	:	-	G.....	:	1112
LLLHK42M	:	-	G.....	:	1112
LLLHK23F	:	-	G.....	:	1112
LLLHK38M	:	-	G.....	:	1112
LLLHK40M	:	-	G.....	:	1112
LLLS25M	:	-	G.....	:	1112
LLLS36F	:	-	G.....	:	1112
LLLHK45M	:	-	G.....	:	1112
LLLS29M	:	-	G.....	:	1112
<i>L. ignita</i>	:	-	G.T.....C.....	:	1110
<i>L. diardi</i>	:	.T....C.....A.....	G.TA.....C.....	:	1110

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ (ระบุชื่อผู้แต่ง ชื่อเรื่อง ชื่อวารสาร ปี เล่มที่ เลขที่ และหน้า) หรือผลงานตามที่คาดว่าจะตีพิมพ์ในสัญญาโครงการ
 ขณะนี้อยู่ระหว่างการเขียน manuscript เพื่อส่งตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ
 ชื่อเรื่องที่จะตีพิมพ์ : Genetic diversity and phylogenetic relationships of the subspecies of the Silver and Kalij pheasants, *Lophura nycthemera* and *L. leucomelana*, in Thailand based on mitochondrial D-loop sequences
 ชื่อวารสารที่จะตีพิมพ์: The Raffles Bulletin of Zoology หรือ Biological Conservation หรือ Electrophoresis
2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์
 - เชิงพาณิชย์ (มีการนำไปผลิต/ขาย/ก่อให้เกิดรายได้ หรือมีการนำไปประยุกต์ใช้โดยภาคธุรกิจ/บุคคลทั่วไป)
 - เชิงนโยบาย (มีการกำหนดนโยบายอิงงานวิจัย/เกิดมาตรการใหม่/เปลี่ยนแปลงระเบียบข้อบังคับหรือวิธีทำงาน)
 - เชิงสาธารณะ (มีเครือข่ายความร่วมมือ/สร้างกระแสมความสนใจในวงกว้าง)
 - เชิงวิชาการ (มีการพัฒนาการเรียนการสอน/สร้างนักวิจัยใหม่)
3. อื่นๆ (เช่น ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการในประเทศ การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ หนังสือ การจดสิทธิบัตร)