



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การใช้เทคนิคทางโมเลกุลสำหรับระบุเพศและสายพันธุ์ในนกสกุลนกหัวโตเล็ก

Molecular approach to identify gender and species of the genus *Charadrius*



T137610

ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม
นายไกรรัตน์ เอี่ยมอำไพ

RCH
ร 831ก
2558

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 137610
รับเดือนปี 13 ก.ค. 2558

b. 1269518X
i.

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ 2557
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงการวิจัย (ภาษาไทย) การใช้เทคนิคทางโมเลกุลสำหรับระบุเพศและสายพันธุ์ในนก
สกุลนกหัวโตเล็ก
(ภาษาอังกฤษ) Molecular approach to identify gender and species of the
genus *Charadrius*

แหล่งเงิน เงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ 2557 จำนวนเงิน 50,000 บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ 1 ตุลาคม 2556 - 30 กันยายน 2557

ชื่อ-สกุล หัวหน้าโครงการ ผศ. ดร. สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
E-mail: poeaim@hotmail.com

ชื่อ-สกุล ผู้ร่วมโครงการ นายไกรรัตน์ เอี่ยมอำไพ
นักวิทยาศาสตร์ชำนาญการพิเศษ
ทำหน้าที่หัวหน้าสถานีวิจัยสัตว์ป่าบึงบอระเพ็ด
กลุ่มงานวิจัยสัตว์ป่า สำนักอนุรักษ์สัตว์ป่า
กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช
E-mail: eiam_kl@hotmail.com

คำสำคัญ: การระบุเพศในนก; ยีน *chromo-helicase-DNA binding (CHD)*; สกุลหัวโตเล็ก

Keywords: sex identification, *chromo-helicase-DNA binding (CHD)* gene,
Charadrius sp.

บทคัดย่อ

นกสกุลหัวโตเล็ก (*Charadrius* sp.) เป็นนกชายเลนที่อพยพเข้ามาประเทศไทยในช่วงนอกฤดูผสมพันธุ์ ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่นกเพนกวินและเพนกวินมีลักษณะสัณฐานวิทยาที่คล้ายกันยากต่อการระบุเพศ ในการวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อระบุเพศนก และศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับโมเลกุล โดยเก็บตัวอย่างนกสกุลหัวโตเล็กจาก 3 พื้นที่ ได้แก่ ตำบลบางหญ้าแพรก จังหวัดสมุทรสาคร ตำบลแหลมผักเบี้ย จังหวัดเพชรบุรี และตำบลกันตัง จังหวัดตรัง ระหว่างเดือนกันยายน-พฤศจิกายน พ.ศ. 2556 สามารถเก็บตัวอย่างได้ 5 สปีชีส์ ตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา จำนวนทั้งหมด 177 ตัวอย่าง แบ่งเป็นนกหัวโตทรายเล็ก (*Charadrius mongolus*) จำนวน 114 ตัว นกหัวโตทรายใหญ่ (*C. leschenaultii*) จำนวน 41 ตัว นกหัวโตชาดำ (*C. alexandrinus*) จำนวน 18 ตัว นกหัวโตหน้าขาว (*C. alexandrinus dealbatus*) จำนวน 3 ตัว และนกหัวโตมลายู (*C. peronii*) จำนวน 1 ตัว เมื่อนำมาระบุเพศโดยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *chromo-helicase-DNA binding (CHD)* ด้วยไพรเมอร์ 2550F/2718R เมื่อนำผลผลิตพีซีอาร์มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส นกเพนกวินพบชนิดดีเอ็นเอ 1 แถบ (*CHD-Z*) และเพนกวินพบชนิดดีเอ็นเอ 2 แถบ (*CHD-W* และ *CHD-Z*) ที่มีขนาดชนิดดีเอ็นเอแตกต่างกันประมาณ 200 คู่เบส เมื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *CHD* สามารถใช้ได้เพียงการระบุสปีชีส์ของนกหัวโตทรายเล็ก และนกหัวโตทรายใหญ่ และ *C. alexandrinus* complex โดย *C. alexandrinus* complex แบ่งเป็น 3 สปีชีส์ ที่ประกอบด้วยนกหัวโตชาดำ (*C. alexandrinus*) นกหัวโตหน้าขาว (*C. alexandrinus dealbatus*) และนกหัวโตมลายู (*C. peronii*) โดยผลจากการระบุเพศในระดับโมเลกุลและการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมมีความสำคัญต่อการจัดการและอนุรักษ์นกชายเลนต่อไป

ABSTRACT

Charadrius sp. are migratory shorebirds in Thailand during the non-breeding season in which adult plumages are not clearly sexually dimorphic. In this study, the molecular approach was used to determine the gender and genetic diversity. The plover used in this study were from 3 areas: Bang Ya Phraek Sub-district, Samut Sakhon Province; Laem Phak Bia Sub-district, Phetchaburi Province and Kantang Sub-district, Trang Province during September to November 2013. We were collected 5 species from morphological identification total 177 samples included 114 Lesser Sand Plover (*C. mongolus*), 41 Greater Sand Plover (*C. leschenaultii*), 18 Kentish Plover (*C. alexandrinus*), 3 White-faced Plover (*C. alexandrinus dealbatus*) and 1 Malaysian Plover (*C. peronii*). Sex identification based on *chromo-helicase-DNA-binding protein* (*CHD*) gene was amplified using 2550F/2718R primers. Gel electrophoresis revealed one band (*CHD-Z*) in male and two bands (*CHD-Z* and *CHD-W*) in female birds that DNA fragments of different sizes about 200 base pair. In genetic diversity, *CHD* gene sequencings were used to identify species which particular helpful identify species in Lesser sand plover, Greater sand plover and *C. alexandrinus* complex plover. The *C. alexandrinus* complex can be subdivided into three species: Kentish plover (*C. alexandrinus*), White-faced plover (*C. alexandrinus dealbatus*) and Malaysian plover (*C. peronii*). The results of molecular sexing and genetic diversity will also have implications for shorebird management and conservation.

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่สนับสนุนทุนวิจัยในส่วนของเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ 2557 และภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่องมือต่างๆ ในการวิจัย

ขอขอบพระคุณกรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพันธุ์พืช ที่อนุญาตในการเก็บตัวอย่าง รวมทั้งคุณไกรรัตน์ เอี่ยมอำไพ หัวหน้าสถานีวิจัยสัตว์ป่าบึงบอระเพ็ด จังหวัดนครสวรรค์ กลุ่มงานวิจัยสัตว์ป่า สำนักอนุรักษ์สัตว์ป่า กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพันธุ์พืช และเจ้าหน้าที่สถานีวิจัยสัตว์ป่าบึงบอระเพ็ดทุกท่านที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเก็บตัวอย่าง

สุดท้ายนี้ผู้จัดทำขอขอบพระคุณบิดา มารดา และบุคคลในครอบครัวที่สนับสนุนและให้กำลังใจในการทำวิจัย ลูกศิษย์ทุกคนที่ร่วมในการวิจัย และทุกท่านที่มีส่วนเกี่ยวข้องทำให้งานวิจัยนี้ เสร็จสมบูรณ์ จึงขอขอบคุณมา ณ ที่นี้

สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม



สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	II
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	III
กิตติกรรมประกาศ	IV
สารบัญ	V
สารบัญตาราง	VIII
สารบัญรูป	IX
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของการวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
1.3 ขอบเขตการวิจัย	2
1.4 ทฤษฎีและกรอบแนวคิดของการวิจัย	3
1.5 คำสำคัญของการวิจัย	3
1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 การอพยพและชนิดนกอพยพ	4
2.2 นกสกุลหัวโตเล็ก (Genus <i>Charadrius</i>)	5
2.3 การระบุเพศนก	9
2.4 การเก็บตัวอย่าง	13
บทที่ 3 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง	15
3.1 แหล่งที่มาของตัวอย่างนก	15
3.2 อุปกรณ์ และเครื่องมือ	15
3.3 สารเคมี	16
3.4 วิธีการทดลอง	17
3.4.1 การขออนุญาตเก็บตัวอย่าง	17
3.4.2 การเก็บตัวอย่างนก	17
3.4.3 การเก็บตัวอย่างเลือดนก	17
3.4.4 การทำดีเอ็นเอบนกระดาษ FTA ให้บริสุทธิ์	20
3.4.5 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์	20
3.4.6 การวิเคราะห์ผลผลิตพีซีอาร์ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส	21
3.4.7 การทำให้ผลผลิตพีซีอาร์บริสุทธิ์	21

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.4.8 การศึกษาหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากลำดับนิวคลีโอไทด์	22
บทที่ 4 ผล และอภิปรายผลการทดลอง	23
4.1 แหล่งที่มาและตัวอย่างนกในสกุลหัวโตเล็ก	23
4.1.1 นกหัวโตทรายเล็ก (<i>Charadrius mongolus</i>)	23
4.1.2 นกหัวโตทรายใหญ่ (<i>Charadrius leschenaultii</i>)	23
4.1.3 นกหัวโตขาดำ (<i>Charadrius alexandrinus</i>)	24
4.1.4 นกหัวโตหน้าขาว (<i>Charadrius alexandrinus dealbatus</i>)	24
4.1.5 นกหัวโตมลายู (<i>Charadrius peronii</i>)	25
4.2 การระบุเพศนกสกุลนกหัวโตเล็ก	27
4.2.1 ไพรมอร์ที่เหมาะสมในการระบุเพศนกสกุลหัวโตเล็ก	27
4.2.2 ผลการระบุเพศนกสกุลหัวโตเล็ก	31
4.3 ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งยีน <i>CHD</i>	33
4.3.1 การยืนยันความถูกต้องในการระบุเพศนก	33
4.3.2 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างอัลลีล <i>CHD-Z</i> และ <i>CHD-W</i>	34
4.3.3 ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของอัลลีล <i>CHD-W</i>	36
4.3.4 ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของอัลลีล <i>CHD-Z</i>	38
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	41
เอกสารอ้างอิง	42
ผลงานตีพิมพ์จากงานวิจัย	

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
3.1	แสดงชนิดไพโรเมอร์ ลำดับนิวคลีโอไทด์ ตำแหน่ง และเอกสารอ้างอิงของไพโรเมอร์	16
4.1	แสดงจำนวนตัวอย่างของนกแต่ละสปีชีส์ในสกุลหัวโตเล็ก จากการเก็บตัวอย่าง 3 พื้นที่	27
4.2	แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ และอุณหภูมิ annealing ของไพโรเมอร์แต่ละชนิดที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในตำแหน่งยีน CHD ที่นำมาใช้ในการระบุเพศนก	28
4.3	แสดงผลการระบุเพศนกในตำแหน่งยีน CHD ด้วยไพโรเมอร์ 2550F/2718R ในสกุลหัวโตเล็กจำนวน 5 สปีชีส์ จากการเก็บตัวอย่าง 3 พื้นที่	33



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และ VIII อ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	แผนที่แสดงเส้นทางการอพยพของนกชายเลนในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้	5
2.2	แสดงลักษณะที่แตกต่างกันระหว่าง 5 สปีชีส์ย่อยของนกหัวโตทรายเล็กในช่วงฤดูผสมพันธุ์	8
2.3	แสดงลักษณะที่แตกต่างกันระหว่าง 3 สปีชีส์ย่อยของนกหัวโตทรายใหญ่ในช่วงฤดูผสมพันธุ์	8
2.4	แสดงความแตกต่างระหว่างโครโมโซมเพศของนกและโครโมโซมเพศของคน	10
2.5	แสดงยีน <i>CHD-W</i> และ <i>CHD-Z</i> และความยาวบริเวณ Intron	11
3.1	แสดงขั้นตอนการดักจับนกด้วยวิธีท่อนึ่งตาข่าย (cannon net) (A) การติดตั้งตาข่ายดักจับนก (B) การเก็บตัวอย่างหลังการยิงท่อนึ่งตาข่าย (C) การวัดความยาวหน้าแข้ง	18
3.2	แสดงขั้นตอนการเก็บข้อมูลชีวสัณฐานของนก (D) การใส่เครื่องหมายติดตามตัว	
3.2	แสดงขั้นตอนการเก็บตัวอย่างเลือดนกด้วยกระดาษ FTA ได้แก่ (A) การใช้เข็มเจาะบริเวณปลายนิ้วเท้าหลังการทำความสะอาดนิ้วเท้าของนกด้วยแอลกอฮอล์ (B) การใช้กระดาษ FTA ซับหรือป้ายที่หยดเลือดเพื่อเก็บตัวอย่างเลือดนก (C) ตัวอย่างเลือดนกบนกระดาษ FTA	19
4.1	แสดงลักษณะของนกหัวโตทรายเล็ก (<i>Charadrius mongolus</i>)	23
4.2	แสดงลักษณะของนกหัวโตทรายใหญ่ (<i>Charadrius leschenaultii</i>)	24
4.3	แสดงลักษณะของนกหัวโตชาดำ (<i>Charadrius alexandrinus</i>)	25
4.4	แสดงลักษณะของนกหัวโตหน้าขาว (<i>Charadrius alexandrinus dealbatus</i>)	25
4.5	แสดงลักษณะของนกหัวโตมลายู (<i>Charadrius peronii</i>)	26
4.6	แสดงผลการวิเคราะห์ผลผลิตพีซีอาร์ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (เจลอะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์) จากการระบุเพศนกสกุลหัวโตเล็กด้วยไพรเมอร์ 3 คู่ ได้แก่ ไพรเมอร์ P2/P8 (ช่อง 2-5) 1237L/1272H (ช่อง 6-9) และไพรเมอร์ 2550F/2718R (ช่อง 10-13) เปรียบเทียบกับ Marker DNA 50 คู่เบส (ช่อง 1 และ 14) (M คือ เพศผู้ และ F คือ เพศเมีย)	28
4.7	รูปที่ 4.7 แสดงผลการระบุเพศนกโดยใช้ไพรเมอร์ 2550F/2718R ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสที่ความเข้มข้นของอะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์ ของนกจำนวน 5 สปีชีส์ ได้แก่ นกหัวโตทรายเล็ก (<i>C. mongolus</i>) (ช่อง 2-5) นกหัวโตทรายใหญ่ (<i>C. leschenaultii</i>) (ช่อง 6-9) นกหัวโตชาดำ (<i>C. alexandrinus</i>) (ช่อง 10-12) นกหัวโตหน้าขาว (<i>C. a dealbatus</i>) (ช่อง 13-15) นกหัวโตมลายู (<i>C. peronii</i>) (ช่อง 16) และ marker DNA 50 คู่เบส (ช่อง 1 และ 17)	31
4.8	แสดงตำแหน่งการจับของไพรเมอร์ 2550F/2718R บนลำดับนิวคลีโอไทด์ของอัลลีล <i>CHD-Z</i> และ <i>CHD-W</i> ในนกสกุลหัวโตเล็ก	35

4.9	แสดงตำแหน่งอินทรอน (intron) ของอัลลีล <i>CHD-Z</i> และ <i>CHD-W</i> ในนกสกุลหัวโตเล็ก	35
4.10	แสดง phylogenetic tree จากลำดับนิวคลีโอไทด์ <i>CHD-Z</i> และ <i>CHD-W</i> ของตัวอย่างนกในสกุลหัวโตเล็ก (<i>Charadrius</i>) และสกุลนกกาน้ำ (<i>Phalacrocorax</i>) ด้วยโปรแกรม Mega 6.0 โดยใช้วิธี neighbor joining และใช้ค่า bootstrap เท่ากับ 1000	37
4.11	แสดงการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของอัลลีล <i>CHD-W</i> ของนกสกุลหัวโตเล็ก โดยมีตำแหน่งที่แตกต่างกัน 3 ตำแหน่ง (ลูกศรชี้)	37
4.12	แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างนกสกุลหัวโตเล็ก (<i>Charadrius</i>) และนกสกุลนกกาน้ำ (<i>Phalacrocorax</i>) จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของอัลลีล <i>CHD-W</i> ด้วยโปรแกรม Mega 6.0 โดยใช้วิธี neighbor joining และใช้ค่า bootstrap เท่ากับ 1000	38
4.13	แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของอัลลีล <i>CHD-Z</i> ที่เกิด Indel ในกลุ่ม <i>C. alexandrinus</i> complex เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์จากนกสกุลหัวโตเล็กจำนวน 5 สปีชีส์	39
4.14	แสดง Phylogenetic tree ของนกสกุลหัวโตเล็ก จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของอัลลีล <i>CHD-Z</i> ด้วยโปรแกรม Mega 6.0 โดยใช้วิธี neighbor joining และใช้ค่า bootstrap เท่ากับ 1000 (SS เป็นตัวอย่างจากจังหวัดสมุทรสาคร PP เป็นตัวอย่างจากจังหวัดเพชรบุรี และ TT เป็นตัวอย่างจากจังหวัดตรัง)	40

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของการวิจัย

นกอพยพคือนกที่อพยพย้ายถิ่น เพื่อแสวงหาพื้นที่ที่มีสภาพแวดล้อมเหมาะสมต่อการดำรงชีวิตในแต่ละฤดูกาล ทั้งแหล่งอาหารที่มีความสมบูรณ์ พื้นที่เหมาะสมในการสร้างรังวางไข่และเลี้ยงดูลูกอ่อน ซึ่งเป็นวัฏจักรเช่นเดียวกันทุกปี โดยมากนกอพยพที่ย้ายถิ่นมาอาศัยในประเทศไทยจะอยู่ในช่วงนอกฤดูผสมพันธุ์ตลอดฤดูหนาวตั้งแต่เดือนกันยายนเป็นต้นมา และอพยพกลับในเดือนมีนาคมถึงเดือนเมษายน เส้นทางอพยพของนกในประเทศไทยตั้งอยู่ในเส้นทางการบินอพยพเอเชียตะวันออก-ออสเตรเลีย (East Asian-Australasian Flyway: EAAF) เป็นไปในทางเดียวกับการอพยพของนกในทวีปเอเชีย คืออยู่ในแนวเหนือ-ใต้เป็นส่วนใหญ่ มีนกหลายแสนตัวอพยพข้ามมหาสมุทรและแผ่นดินใหญ่เป็นระยะทางไกลหลายพันกิโลเมตรเข้ามาอาศัยในประเทศไทย ซึ่งมีพื้นที่ชุ่มน้ำที่อุดมสมบูรณ์และพื้นที่ป่าอนุรักษ์ที่มีความปลอดภัยสำหรับนกอพยพ ดังนั้นนกจึงเปรียบเสมือนดัชนีบ่งชี้คุณภาพความสมบูรณ์ของทรัพยากรชีวภาพ

ชนิดนกอพยพที่เข้ามาในประเทศไทยสามารถแบ่งออกได้หลายกลุ่ม ได้แก่ นกเป็ดน้ำ (Waterfowl bird) นกบก (Terrestrial bird) นกล่าเหยื่อ (Raptor หรือ Bird of prey) นกทะเล (Sea Bird) นกน้ำ (Water bird) และนกชายเลน (Shorebird) ซึ่งเป็นนกที่อาศัยอยู่ตามชายเลนหรือชายน้ำ ช่วงฤดูหนาวเป็นช่วงที่นกชายเลนอพยพเข้ามาในประเทศไทยปริมาณมากที่สุด บวกกับนกชายเลนบางกลุ่มที่แวะพักเข้ามาเติมพลังงานก่อนการเดินทางต่อไปทางตอนใต้ โดยเฉพาะพื้นที่ชายฝั่งทะเลอ่าวไทย ภาคใต้ฝั่งตะวันออก ภาคใต้ฝั่งตะวันตก บริเวณนาเกลือ บ่อกุ้ง บ่อเลี้ยงสัตว์น้ำ ชนิดนกชายเลนที่พบได้แก่สกุลนกนือต (*Calidris* sp.) สกุลชายเลนปากกว้าง (*Limicola* sp.) สกุลหัวโตหลังจุด (*Pluvialis* sp.) และสกุลหัวโตเล็ก (*Charadrius* sp.) เป็นต้น

นกในอันดับ Charadriiformes เป็นนกที่มีมากอีกกลุ่มหนึ่ง โดยทั่วโลกพบมากกว่า 360 ชนิด (สปีชีส์: species) จาก 19 วงศ์ (Clements, 2000) ซึ่งนกในอันดับนี้มีความหลากหลายสูงทั้งลักษณะภายนอก พฤติกรรม และการผสมพันธุ์ ตัวอย่างนกในอันดับนี้ คือนกในวงศ์ Scolopacidae เช่น นกปากซ่อมพง นกชายเลนเขียว และนกชายเลนปากช้อน วงศ์ Laridae (Gulls) คือกลุ่มนกนางนวล และวงศ์ Charadriidae (Plovers และ Lapwings) คือในกลุ่มนกหัวโตและนกกระแต จึงทำให้นักวิทยาศาสตร์สนใจศึกษา ซึ่งเมื่อศึกษาจาก protein electrophoresis พบว่านกในวงศ์ Charadriidae จะแตกต่างจากวงศ์ Laridae (Christian และคณะ, 1992) หากอาศัยเพียงลักษณะทางสัณฐานวิทยาจะยังคงอยู่ใกล้เคียงกัน (Chu, 1995) เป็นต้น แต่เดิมการศึกษาและจัดจำแนกความหลากหลายทางชีวภาพเพื่อจัดกลุ่มสิ่งมีชีวิตเป็นหมวดหมู่จะอาศัยการพิจารณารูปร่างลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphological analysis) เพียงอย่างเดียว แต่ปัจจุบันมีการอาศัยข้อมูลในระดับโมเลกุลมาช่วยเพื่อให้เกิดความถูกต้องมากขึ้น โดยการศึกษาความหลากหลายในระดับโมเลกุลที่นิยมศึกษา คือการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในนิวเคลียสและไมโทคอนเดรียในตำแหน่งต่างๆ ดังงานวิจัยของ Kupper และคณะ (2009) ทำการศึกษาหาความสัมพันธ์ของสายพันธุ์ย่อยนกหัวโตขาดำ ได้แก่สายพันธุ์ย่อยกลุ่มอเมริกัน (*Charadrius alexandrinus nivosus*) และสายพันธุ์ย่อยกลุ่มยูเรเชีย (*Charadrius alexandrinus alexandrinus*) โดยทำการเปรียบเทียบความแตกต่างทางพันธุกรรมและลักษณะทางฟีโนไทป์ พบว่าสายพันธุ์นกหัวโตขาดำ 2 กลุ่มนี้มีความแตกต่างกัน โดย

สายพันธุ์ย่อยกลุ่มยูเรเซียนมีความใกล้ชิดกับนกหัวโตหน้าขาว (*C. marginatus*) มากกว่า โดยการวิเคราะห์จากยีน *chromo-helicase-DNA binding (CHD)* ในนิวเคลียส วิเคราะห์เครื่องหมายดีเอ็นเอด้วยเทคนิค *Microsatellite* และวิเคราะห์ยีนไมโทคอนเดรีย 2 ตำแหน่ง คือยีน *NADH dehydrogenase subunit 3 (ND3)* และยีน *ATPase subunit 6/8 (ATPase 6/8)* ด้วยเทคนิค *Polomerase chain reaction (PCR)* รวมทั้ง Verkuil และคณะ (2010) ศึกษาตัวอย่างนกในอันดับ *Charadriiformes* วงศ์ *Scolopacidae* ซึ่งเป็นวงศ์ของนกชายเลนหรือนกชายน้ำ นำยีน *NADH dehydrogenase subunit 6 (ND6)* ยีน *tRNA^{Pro}* และ *tRNA^{Glu}* มาเปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์สามารถจัดกลุ่มของนกชายเลนและชายทะเลที่เป็นนกอพยพได้ ซึ่งการระบุสายพันธุ์และศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกชายเลนที่อพยพมาในประเทศไทย จะเป็นประโยชน์ทางด้านฐานข้อมูลทางพันธุกรรม การสำรวจประชากรนกอพยพที่เข้ามาตามแหล่งพื้นที่ต่างๆทั่วประเทศ เพื่อเป็นดัชนีชี้วัดความหลากหลายของนกอพยพและความอุดมสมบูรณ์ของพื้นที่บริเวณต่างๆที่นกอพยพเข้ามาอาศัย

นกชายเลนอพยพที่สนใจศึกษาครั้งนี้จะอพยพมาประเทศไทยในช่วงนอกฤดูผสมพันธุ์ ซึ่งช่วงเวลานี้นกอพยพบางสายพันธุ์มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่เหมือนกัน กล่าวคือเพศผู้และเพศเมียมีลักษณะทางภายนอกที่เหมือนกัน (*sexually monomorphic*) ซึ่งยากต่อการจัดจำแนกเพศ เพื่อใช้ในการสำรวจประชากรนกที่อพยพเข้ามา ดังนั้นจึงจำเป็นต้องอาศัยเทคนิคทางโมเลกุลช่วยเพื่อการระบุเพศนก ซึ่งเทคนิคทางโมเลกุลที่นิยมนำมาใช้ในการระบุเพศนกนั้นเกิดขึ้นหลังการค้นพบยีน *chromo-helicase-DNA binding (CHD)* บนโครโมโซม W (Griffiths และ Tiwari, 1995) และโครโมโซม Z (Griffiths และ Korn, 1997) เนื่องจากนกมีลักษณะของโครโมโซมเพศแตกต่างจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โดยนกเพศเมียมีโครโมโซมเพศที่แตกต่างกัน (*heterogametic sex: ZW*) ในขณะที่นกเพศผู้มีโครโมโซมเพศที่เหมือนกัน (*homogametic sex: ZZ*) ร่วมกับหลักการที่มีความแตกต่างของความยาวบริเวณ *intron* ของยีน *CHD* ระหว่างโครโมโซม Z (*CHD-Z*) กับโครโมโซม W (*CHD-W*) (Griffiths และ Tiwari, 1995; Ellegren, 1997; Griffiths และ Korn, 1997) จึงนำมาใช้ในการระบุเพศนกได้เป็นอย่างดี ยกเว้นนกที่บินไม่ได้ ซึ่งการระบุเพศนกด้วยเทคนิคทางโมเลกุล เป็นวิธีที่มีความรวดเร็ว ถูกต้อง แม่นยำ และเป็นประโยชน์ต่อการอนุรักษ์ และศึกษาอัตราส่วนของเพศเพื่อเป็นแนวทางในการประเมินประชากรของนกต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- 1.2.1 ตรวจสอบเพศนกสกุลหัวโตเล็กในระดับโมเลกุล
- 1.2.2 ศึกษาสายพันธุ์ของนกสกุลหัวโตเล็กในระดับโมเลกุล โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์
- 1.2.3 ศึกษาความหลากหลายของนกสกุลหัวโตเล็กที่อพยพมาประเทศไทย

1.3 ขอบเขตการวิจัย

โครงการนี้ดำเนินการขึ้นเพื่อการระบุเพศและศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกสกุลหัวโตเล็กที่อพยพมาในประเทศไทย โดยการเก็บตัวอย่างอยู่ภายใต้การทำงานของผู้เชี่ยวชาญและเจ้าหน้าที่จากสถานีวิจัยสัตว์ป่าบึงบอระเพ็ด กลุ่มงานวิจัยสัตว์ป่า สำนักอนุรักษ์สัตว์ป่า กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพันธุ์พืช

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.4 ทฤษฎีและกรอบแนวคิดของการวิจัย

การศึกษาและจัดจำแนกความหลากหลายทางชีวภาพ นิยมศึกษาทั้งจากรูปร่างลักษณะทาง สัณฐานวิทยาและข้อมูลในระดับโมเลกุล การศึกษาความหลากหลายในระดับโมเลกุลในครั้งนี้จะ เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *chromo-helicase-DNA binding (CHD)* ซึ่งมีตำแหน่งบนดีเอ็นเอในนิวเคลียส รวมทั้งนกชายเลนที่อพยพมาประเทศไทยนั้นอยู่ในช่วงนอกฤดูผสมพันธุ์ ซึ่ง ช่วงเวลาดังกล่าวนกสกุลหัวโตเล็กทั้งเพศผู้และเมียมีลักษณะภายนอกที่เหมือนกัน (sexually monomorphic) ซึ่งยากต่อการจัดจำแนกเพศ จึงจำเป็นต้องอาศัยเทคนิคทางโมเลกุลเพื่อการระบุเพศ นก โดยนกเพศเมียมีโครโมโซมเพศที่แตกต่างกัน (heterogametic sex: ZW) ในขณะที่นกเพศผู้มี โครโมโซมเพศที่เหมือนกัน (homogametic sex: ZZ) ร่วมกับหลักการที่มีความแตกต่างของความยาว บริเวณอินตรอน (intron) ของยีน *CHD* จึงนำความแตกต่างนี้มาใช้ระบุเพศนก

1.5 คำสำคัญของการวิจัย

การระบุเพศ (gender identification) ยีน *chromo-helicase-DNA binding (CHD)* (*chromo-helicase-DNA binding (CHD) gene*) นกสกุลหัวโตเล็ก (*Charadrius sp.*)

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

หากงานวิจัยนี้ประสบผลสำเร็จจะสามารถศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกสกุลหัวโต เล็ก เพื่อเป็นประโยชน์ต่อการสำรวจประชากรของนกอพยพ อีกทั้งยังเป็นฐานข้อมูลทางพันธุกรรมใน การติดตามเส้นทางอพยพ และสามารถระบุเพศนกในกลุ่มตัวอย่างของนกสกุลหัวโตเล็กได้ เพื่อนำไป ประยุกต์ใช้ในการศึกษาด้านประชากรของนกอพยพ รวมทั้งพฤติกรรมการอพยพและย้ายถิ่นต่อไป

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 การอพยพและชนิดนกอพยพ

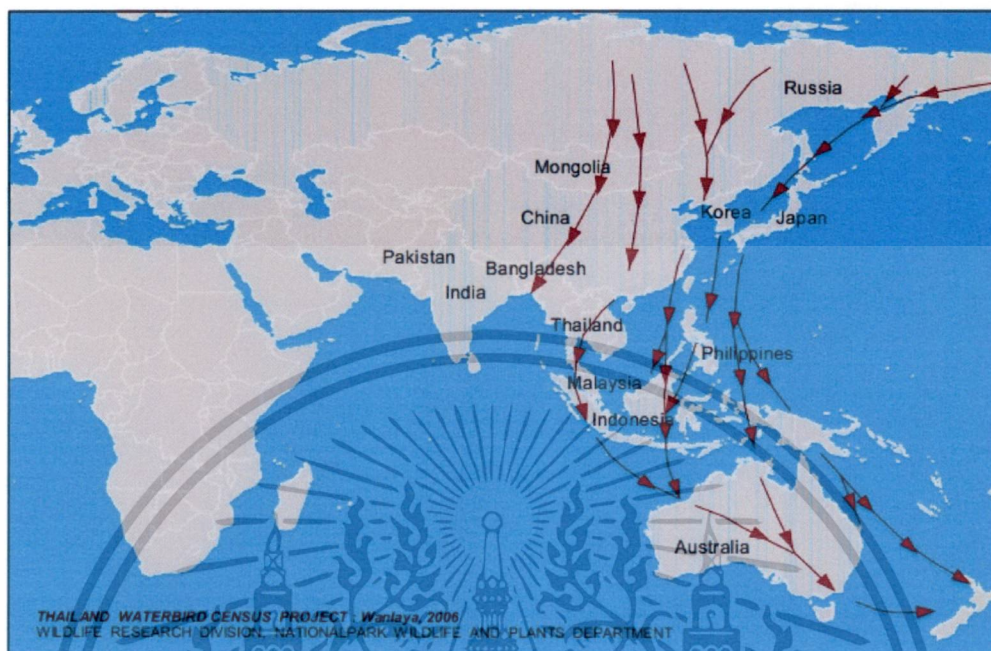
การอพยพของนก คือการเคลื่อนย้ายถิ่นระหว่างพื้นที่ซึ่งนกใช้เป็นแหล่งสร้างรังวางไข่ในฤดูผสมพันธุ์ กับพื้นที่ซึ่งนกใช้เป็นแหล่งหากินในช่วงนอกฤดูผสมพันธุ์ เพื่อหาพื้นที่ที่มีแหล่งอาหารสมบูรณ์และเหมาะสมในการสร้างรัง วางไข่ และเลี้ยงลูกอ่อน ในซีกโลกตอนเหนือมีนกอาศัยอยู่เป็นจำนวนมาก เมื่อเข้าสู่ฤดูหนาวอุณหภูมิต่ำลง น้ำจะกลายเป็นน้ำแข็ง พืชหยุดการเจริญเติบโต สภาพที่อาศัยอยู่ไม่เหมาะสมและอาหารลดน้อยลง นกจึงจำเป็นต้องอพยพเคลื่อนที่ไปยังซีกโลกใต้ ซึ่งมีแหล่งอาหารที่อุดมสมบูรณ์ เมื่อถึงฤดูร้อนก็อพยพกลับไปยังถิ่นเดิม ซึ่งเป็นวัฏจักรเช่นเดียวกันทุกปี นกเป็นสัตว์ที่มีโครงสร้างร่างกายรวมทั้งระบบเผาผลาญอาหารที่เหมาะสมกับการดำรงชีวิตในอากาศ และมีประสิทธิภาพในการเคลื่อนที่สูงทำให้นกสามารถแสวงหาแหล่งที่อยู่อาศัยที่มีสภาพแวดล้อมเหมาะสมต่อการดำรงชีวิตในแต่ละฤดูกาลได้ นกจึงเป็นสัตว์ที่มีการอพยพย้ายถิ่นมากที่สุด ปัจจุบันที่มีอิทธิพลต่อการอพยพย้ายถิ่นของนกก็คือความอุดมสมบูรณ์และสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการดำเนินชีวิตในแต่ละฤดูกาล โดยมากนกอพยพที่ย้ายถิ่นมาอาศัยในประเทศไทยจะอยู่ในช่วงนอกฤดูผสมพันธุ์ ตลอดฤดูหนาวตั้งแต่เดือนกันยายน และอพยพกลับในเดือนมีนาคม ถึงเดือนเมษายน (ดัดแปลงจาก วัลยา และคณะ, 2548)

ชนิดนกอพยพในประเทศไทยในรายงานของวัลยา และคณะ (2548) พบนกอพยพทั้งสิ้น 415 สปีชีส์ ซึ่งเป็นนกอพยพ 326 สปีชีส์ และนกที่มีสถานภาพเป็นทั้งนกอพยพและนกประจำถิ่นจำนวน 89 ชนิด สามารถแบ่งกลุ่มของนกอพยพได้ 6 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มนกกบ (Terrestrial bird) กลุ่มนกทะเล (Sea bird) กลุ่มนกล่าเหยื่อ (Raptor) กลุ่มนกลุยน้ำ (Wading bird) กลุ่มน่าน้ำและนกเปิดน้ำ (Waterfowl) และกลุ่มนกชายเลน (Shore bird) ซึ่งเป็นนกที่อาศัยอยู่ตามชายเลนหรือชายน้ำ ช่วงฤดูหนาวเป็นช่วงที่นกชายเลนอพยพเข้ามาในประเทศไทยปริมาณมากที่สุด โดยเฉพาะพื้นที่ชายฝั่งทะเลอ่าวไทย ภาคใต้ฝั่งตะวันออก และฝั่งตะวันตก บริเวณนาเกลือ บ่อกุ้ง

นกสกุลหัวโตเล็กที่สนใจศึกษาในงานวิจัยนี้ เป็นนกชายเลนอพยพ ซึ่งจากคู่มือการจำแนกนกชายเลนและนกทะเล (สมิทธิ, 2552) พบว่านกชายเลนส่วนใหญ่มีแหล่งขยายพันธุ์อยู่ทางตอนเหนือของทวีปเอเชียแถบเขตอาร์กติกและเขตทุนดราในไซบีเรีย เมื่อเข้าสู่ฤดูหนาวจะทำการกระตุ้นร่างกายให้สะสมพลังงาน เพื่อบินอพยพจากอะแลสกาและทางตะวันออกเฉียงเหนือของรัสเซีย บินอพยพลงมาจากเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ถึงออสเตรเลียและนิวซีแลนด์ เส้นทางที่ใช้อพยพจะเป็นเส้นทางเดิมประจำทุกปี ซึ่งประเทศไทยตั้งอยู่ในเส้นทางการบินอพยพนี้ คือ เส้นทางอพยพเอเชียตะวันออกเฉียง-ออสเตรเลีย (East Asian-Australasian Flyway: EAAF) ซึ่งมีนกชายเลนอพยพหลายแสนตัวอพยพข้ามมหาสมุทร และแผ่นดินใหญ่เป็นระยะทางไกลหลายพันกิโลเมตร เข้ามาอาศัยในประเทศไทยทุกปี แต่ยังไม่ทราบแน่ชัดว่ามาจากที่ใด เมื่อดูจากแผนที่ทวีปเอเชียจะเห็นได้ว่าประเทศไทยมีลักษณะเป็นคาบสมุทรอยู่ทางตอนล่างสุดของผืนทวีป นกบางส่วนที่บินมาจากตอนเหนือของจีน ธิเบต มองโกเลีย เป็นระยะทางหลายพันกิโลเมตร ถือโอกาสแวะพักผ่อนคลายความอ่อนล้าที่ประเทศไทย ส่วนนกกกลุ่มใหญ่ ซึ่งอพยพจากแถบไซบีเรีย ญี่ปุ่น เกาหลี บินเลาะชายฝั่งของจีนมายังไทยก่อนที่จะอพยพลงใต้สู่มาลเลเซีย อินโดนีเซีย หรืออาจเลยไปออสเตรเลียและนิวซีแลนด์ ในขณะที่อีกกลุ่มหนึ่งใช้เส้นทาง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อพยพจากญี่ปุ่น เลาะไปตามเกาะเล็กของฟิลิปปินส์ อินโดนีเซีย โดยมีจุดหมายปลายทางที่ออสเตรเลียเช่นเดียวกัน แสดงเส้นทางการอพยพดังรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 แผนที่แสดงเส้นทางการอพยพของนกชายเลนในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้
ที่มา : วัลยา และคณะ (2548)

2.2 นกสกุลหัวโตเล็ก (Genus *Charadrius*)

นกอพยพที่สนใจในการศึกษาค้างนี้เป็นนกสกุลหัวโตเล็ก (*Charadrius* sp.) ซึ่งเป็นนกชายเลนหรือนกชายทะเล อยู่ในวงศ์ย่อยนกหัวโต (Subfamily Charadiinae) นกในวงศ์ย่อยนี้มีขนาดเล็กจนถึงขนาดกลาง (15-36 ซม.) มีปากแข็งแรง บริเวณปลายปากมักโป่งเล็กน้อย ขนปลายปีกด้านนอกยาวที่สุด แข็งเป็นเกล็ดชนิดเกล็ดร่างแห นิ้วมีขนาดเล็กมีพังผืดหรือไม่มีพังผืด ปกติไม่มีนิ้วเท้าหลังหรือมีแต่เป็นขนาดเล็ก มีทั้งสิ้น 8 สกุก ในประเทศไทย พบ 3 สกุก คือ สกุกหัวโตหลังจุด (*Pluvialis* sp.) สกุกหัวโตเล็ก (*Charadrius* sp.) และสกุกกระแต (*Vanellus* sp.) ในสกุกหัวโตเล็ก แม้ว่าส่วนใหญ่แยกด้วยลักษณะภายนอกได้ แต่ระหว่างนกหัวโตทรายใหญ่ และนกหัวโตทรายเล็ก มีลักษณะใกล้เคียงกันมาก โดยนกสกุกหัวโตเล็กนี้ทั่วโลกมี 31 สปีชีส์ ประเทศไทยพบ 8 สปีชีส์ (โอภาส, 2543) ได้แก่ นกหัวโตปากยาว (*Charadrius placidus*) นกหัวโตขาสีส้ม (*Charadrius hiaticula*) นกหัวโตเล็กขาเหลือง (*Charadrius dubius*) นกหัวโตขาคำ (*Charadrius alexandrinus*) นกหัวโตมลายู (*Charadrius peronii*) นกหัวโตทรายใหญ่ (*Charadrius leschenaultia*) นกหัวโตขาขาว (*Charadrius veredus*) และนกหัวโตทรายเล็ก (*Charadrius mongolus*) โดยนกหัวโตทรายเล็กเป็นนกที่ผสมพันธุ์ในตอนกลางและตะวันออกเฉียงเหนือของเอเชีย ช่วงนอกฤดูผสมพันธุ์จะอพยพไปแอฟริกา เอเชียตะวันออกเฉียงกลาง อินเดีย หมู่เกาะอันดามัน หมู่เกาะนิโคบาร์ จีนด้านตะวันออกเฉียงใต้ ไต้หวัน เกาะไหหลำ หมู่เกาะซุนดาใหญ่ ฟิลิปปินส์ ออสเตรเลีย และนิวซีแลนด์ ลักษณะทั่วไปเป็นนกขนาดเล็ก (23 ซม.) ลักษณะรูปร่างและสีขนในแต่ละฤดูคล้ายกับนกหัวโตทรายใหญ่ ปากเล็กและสั้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขาและนิ้วมีสีเทาเข้ม ช่วงนอกฤดูผสมพันธุ์หัวและลำตัวบนสีน้ำตาลเทา หน้าผากและคิ้วสีขาว ข้างอกมีสีน้ำตาลแกมเทา ช่วงฤดูผสมพันธุ์กระหม่อมและท้ายทอยสีน้ำตาลแดง หน้าผากสีดำ แถบคาดตาสีดำ อกมีสีน้ำตาลแดง เป็นนกที่อาศัยอยู่ตามชายเลนและชายหาด มักพบอยู่เป็นฝูง มักพบว่าอพยพมาประเทศไทยช่วงนอกฤดูผสมพันธุ์ พบบ่อยและมีปริมาณมาก ตามแหล่งชายฝั่งทะเลทั่วประเทศ นอกจากนี้ยังพบตามแหล่งน้ำจืดบางแห่งในภาคกลางและภาคตะวันออกเฉียงเหนืออีกด้วย กฎหมายจัดเป็นสัตว์ป่าคุ้มครอง (โอภาส, 2543)

รายงานการศึกษาความหลากหลายในระดับโมเลกุลของนกชายเลน และในสกุลนกหัวโตเล็ก เช่น นกหัวโตขาดำเป็นนกที่อยู่ตามชายเลนและชายหาด มักพบรวมอยู่กับนกหัวโตเล็กขาเหลือง เป็นนกอพยพที่ยังประเทศไทยช่วงนอกฤดูผสมพันธุ์ พบบ่อยและมีปริมาณปานกลาง รายงานว่าทั่วโลกมี 6 สปีชีส์ย่อย ประเทศไทยพบ 2 สปีชีส์ย่อย คือ *Charadrius alexandrinus alexandrinus* ซึ่งในไทยเรียกชื่อสามัญว่านกหัวโตขาดำ และ *Charadrius alexandrinus dealbatus* เรียกชื่อสามัญว่านกหัวโตหน้าขาว Funk และคณะ (2007) ได้ศึกษาโครงสร้างทางพันธุกรรมของนกหัวโตขาดำ (*C. alexandrinus*) ในอเมริกาเหนือ หมู่เกาะแคริบเบียน และชายฝั่งตะวันตกของอเมริกาใต้ ที่มีการเปลี่ยนแปลงในพื้นที่ผสมพันธุ์ ด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง Domain I และ II ของยีน *Control region* ในไมโทคอนเดรีย (676 คู่เบส) ของตัวอย่าง *C. alexandrinus* 166 ตัวอย่าง จากพื้นที่ผสมพันธุ์ 20 แห่ง ศึกษาความหลากหลายของดีเอ็นเอด้วยการวิเคราะห์จาก Microsatellite 10 ตำแหน่ง ของตัวอย่าง 144 ตัวอย่าง จากพื้นที่ผสมพันธุ์ 14 แห่ง พบว่าข้อมูลจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในไมโทคอนเดรีย และ Microsatellite เป็นหลักฐานที่ดี โดยกลุ่มประชากรในพื้นที่เปอร์โตริโก มีลักษณะทางพันธุกรรมที่เปลี่ยนแปลงไปจากประชากรที่อยู่บนทวีปอเมริกา พบความแตกต่างในระดับสูงระหว่างกลุ่มประชากรบริเวณอเมริกาเหนือและอเมริกาใต้ ในทางตรงข้ามเกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมเล็กน้อยในพื้นที่ผสมพันธุ์บริเวณทวีปอเมริกา ผลการศึกษาวิจัยนี้เสนอว่านกหัวโตขาดำในบริเวณฟลอริดา พิจารณาให้เป็นสปีชีส์ย่อย *C. alexandrinus nivosus* แทนที่จะเป็นสปีชีส์ย่อย *C. alexandrinus tenuirostris* ที่ใช้ในปัจจุบัน ในขณะที่นกหัวโตขาดำบริเวณเปอร์โตริโกพิจารณาให้เป็นสปีชีส์ย่อย *C. alexandrinus tenuirostris* และนกหัวโตขาดำบริเวณอเมริกาใต้ ยังคงเป็นสปีชีส์ย่อย *C. alexandrinus occidentalis* นอกจากนั้นแล้ว Kupper และคณะ (2009) ศึกษาความแตกต่างสปีชีส์ย่อยของนกหัวโตขาดำ (*C. alexandrinus*) ระหว่างนกสปีชีส์ย่อยอเมริกัน (*C. alexandrinus nivosus*) และนกสปีชีส์ย่อยยูเรเชีย (*C. alexandrinus alexandrinus*) โดยทำการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างลักษณะทางพีโนไทป์และลักษณะทางจีโนไทป์ จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนในไมโทคอนเดรีย 2 ตำแหน่ง คือ ยีน *NADH dehydrogenase subunit 3 (ND3)* และยีน *ATPase subunit 6/8 (ATPase 6/8)* พบว่านก 2 สปีชีส์ย่อยนี้มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจนทั้งลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลำดับนิวคลีโอไทด์ อีกทั้งยังพบว่านกหัวโตขาดำสปีชีส์ย่อยยูเรเชีย (*C. alexandrinus alexandrinus*) มีความใกล้ชิดกับ *C. marginatus* มากกว่า จึงทำให้เกิดการปรับอนุกรมวิธานของนกที่ศึกษาโดยแยกสปีชีส์ย่อยอเมริกัน (*C. alexandrinus nivosus*) และสปีชีส์ย่อยยูเรเชีย (*C. alexandrinus alexandrinus*) ออกจากกันได้ โดย 2 กลุ่มใหญ่นี้ประกอบไปด้วย 6 สปีชีส์ย่อย ดังนี้ กลุ่ม Snowy ที่อาศัยอยู่บริเวณทางตอนเหนือและใต้ของทวีปอเมริกาประกอบด้วย 3 สปีชีส์ย่อย คือ *C. alexandrinus nivosus*, *C. alexandrinus tenuirostris* และ *C. alexandrinus occidentalis* และกลุ่ม Kentish ที่อาศัยอยู่บริเวณทวีปยุโรปและเอเชีย หรือเรียกว่าทวีปยูเรเชีย

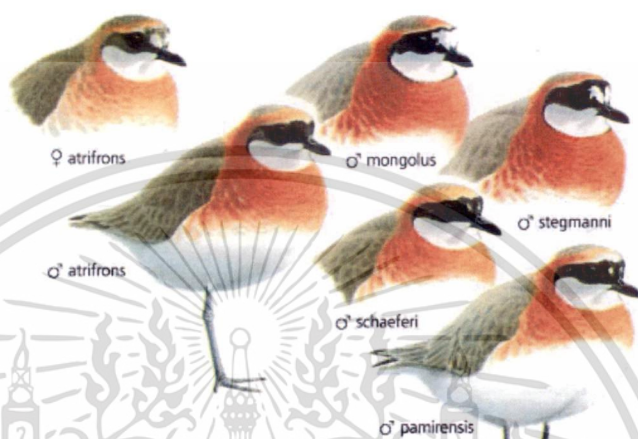
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประกอบไปด้วย 3 สปีชีส์ย่อย คือ *C. alexandrinus alexandrinus*, *C. alexandrinus dealbatus* และ *C. alexandrinus seebohmi*

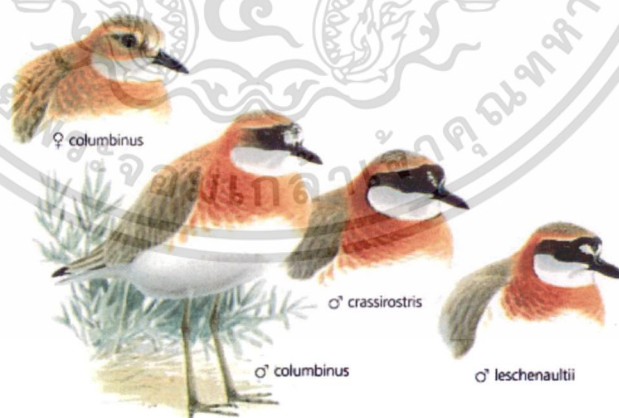
ต่อมา Rheindt และคณะ (2011) ได้ศึกษาการแก้ปัญหาความไม่สอดคล้องกันระหว่างลักษณะฟีโนไทป์และลักษณะจีโนไทป์ โดยบางสปีชีส์มีลักษณะฟีโนไทป์เหมือนกัน แต่มีจีโนไทป์ต่างกัน บางสปีชีส์มีลักษณะทางฟีโนไทป์แตกต่างกันอย่างชัดเจน แต่ลักษณะจีโนไทป์ไม่แตกต่างกัน ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษานกหัวโตหน้าขาว (*C. alexandrinus dealbatus*) ที่เป็นสปีชีส์ย่อยของนกหัวโตดำ (*C. alexandrinus*) ในงานวิจัยนี้ได้ทำการตรวจสอบลักษณะฟีโนไทป์ของนกหัวโตหน้าขาวอีกครั้ง และเปรียบเทียบลักษณะจีโนไทป์ จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไมโทคอนเดรีย 3 ตำแหน่ง (*ND3*, *ATPase6/8* และ *Control region*) และยีนในนิวเคลียส โดยเก็บตัวอย่างจาก *C. alexandrinus dealbatus*, *C. alexandrinus alexandrinus* และสปีชีส์ที่ใกล้เคียงกัน 4 สปีชีส์ (*C. ruficapillus*, *C. peronii*, *C. marginatus* และ *C. alexandrinus nivosus*) ทั้งหมด 278 ตัวอย่าง พบว่ามีความแตกต่างกันน้อยมากระหว่าง *C. alexandrinus dealbatus* และ *C. alexandrinus* แต่ *C. alexandrinus dealbatus* มีความแตกต่างกับนกสปีชีส์อื่นๆ และมีฟีโนไทป์แตกต่างกันอย่างชัดเจน ซึ่งได้รายงานไว้ว่า *C. alexandrinus* เป็น superspecies ของ *C. marginatus*, *C. ruficapillus*, *C. javanicus* และ *C. peronii* เนื่องจากมีความใกล้เคียงกันมาก หรือเรียกว่า *C. alexandrinus* complex และเสนอว่าการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการนั้นควรจะศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์และลักษณะทางจีโนไทป์ควบคู่กัน เพื่อนำมาเปรียบเทียบกันให้ได้ผลที่ถูกต้องยิ่งขึ้น

โอภาส (2543) รายงานว่านกหัวโตทรายเล็ก ทั่วโลกพบ 3 สปีชีส์ย่อย ประเทศไทยพบ 1 สปีชีส์ย่อย คือ *Charadrius mongolus atrifrons* ซึ่งพบครั้งแรกที่รัฐเบงกอล ประเทศอินเดีย หรือ *Charadrius mongolus schaeferi* ที่พบครั้งแรกประเทศจีน ซึ่งยังมีความคลุมเครือ ต่อมา Chandler (2009) ได้รายงานว่านกหัวโตทรายเล็ก แบ่งสปีชีส์ย่อยได้ 2 กลุ่มใหญ่ ที่ประกอบไปด้วย 5 สปีชีส์ย่อย ได้แก่ กลุ่ม *atrifrons* ประกอบไปด้วย 3 สปีชีส์ย่อย คือ *C. mongolus pamirensis*, *C. mongolus atrifrons* และ *C. mongolus schaeferi* และกลุ่ม *mongolus* ประกอบไปด้วย 2 สปีชีส์ย่อย คือ *C. mongolus mongolus* และ *C. mongolus stegmanni* ซึ่งสอดคล้องกับ Hirschfeld และคณะ (2000) ที่ศึกษาลักษณะทางสัณฐาน ได้แก่รูปแบบและความยาวของปาก รูปแบบและความยาวของปีก และขนอก โดยสามารถแบ่งสปีชีส์ย่อยของนกหัวโตทรายเล็กได้เป็น 5 สปีชีส์ย่อย เช่นกัน ดังรูปที่ 2.2 รวมทั้งสามารถแบ่งนกหัวโตทรายใหญ่ได้เป็น 3 สปีชีส์ย่อย ได้แก่ *C. leschenaultii leschenaultii*, *C. leschenaultii columbinus* และ *C. leschenaultii crassirostris* ดังรูปที่ 2.3 ในการศึกษาความหลากหลาย Verkuil และคณะ (2010) ศึกษาถิ่นที่อยู่ ไมโทคอนเดรียด้วยเทคนิค PCR ของนกชายเลนในอันดับ Charadriiformes วงศ์ Scolopacidae ซึ่งเป็นวงศ์ของนกอีโก้ย นกปากซ่อม พบว่านกรัฟ (*Philomachus pugnax*) มียีน cytochrome *b* และ 12S rRNA ที่มีความยาวมากกว่า 1.5 กิโลเบส พบยีน NADH dehydrogenase subunit 6 (ND6) อยู่ใกล้กับ transfer RNAs: tRNA^{Pro} และ tRNA^{Glu} และศึกษาลำดับเบสของนกชายเลนและชายทะเลที่เป็นนกอพยพ พบว่านกจุมูกตลอดและนกปากซ่อมไม่มีความสัมพันธ์ หรือไม่ใกล้เคียงกัน รวมทั้ง Dodge และคณะ (1995) ศึกษาข้อมูลทางพันธุกรรมของนก Pipilo และนก Spizella โดยศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cytochrome *b* ในไมโทคอนเดรียด้วยเทคนิค RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) พบว่าเมื่อนำข้อมูลทางพันธุกรรมมาทำ Phylogenetic tree เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นกทั้งสองจำพวก (genera) มีความสอดคล้องกันอย่างมีนัยสำคัญ สามารถนำข้อมูลไปใช้เพื่อเป็นประโยชน์ทาง phylogenetic ต่อไปได้ ดังนั้นข้อมูลพันธุกรรมจึงเป็นเครื่องมือสำคัญสำหรับการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต และเป็นที่ยอมรับใช้เพื่อการวิเคราะห์ความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ



รูปที่ 2.2 แสดงลักษณะที่แตกต่างกันระหว่าง 5 สปีชีส์ย่อยของนกหัวโตทรายเล็กในช่วงฤดูผสมพันธุ์
ที่มา: Hirschfeld และคณะ (2000)



รูปที่ 2.3 แสดงลักษณะที่แตกต่างกันระหว่าง 3 สปีชีส์ย่อยของนกหัวโตทรายใหญ่ในช่วงฤดูผสมพันธุ์
ที่มา: Hirschfeld และคณะ (2000)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นอกจากนั้นแล้วการหาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของนกสกุลต่างๆ Oyler-McCance และคณะ (2005) ศึกษานก Mountain plover (*Charadrius montanus*) ที่พบว่ามีการกระจายตัวลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 30 ปีที่ผ่านมา ซึ่งจากการคาดคะเนว่าอาจเป็นเพราะเกิดจากการเปลี่ยนแปลงภูมิประเทศแบบทุ่งหญ้าไปเป็นพื้นที่เกษตรกรรม ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงประชากรรวมทั้งมีถิ่นบางส่วนเกิดการกลายพันธุ์ สองสาเหตุนี้ทำให้เกิดสปีชีส์ใหม่หรือสปีชีส์ย่อยของนก Mountain plover เมื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม โดยวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในไมโทคอนเดรีย 2 ตำแหน่ง คือ บริเวณ *ATPase 6/8* และ *Control region* จากตัวอย่างประชากร 30 ตัวอย่างในช่วงฤดูผสมพันธุ์ พบว่ามีความสัมพันธ์กันระหว่างทางพันธุกรรมกับลักษณะทางภูมิศาสตร์ จึงอาจกล่าวได้ว่า การเปลี่ยนแปลงประชากรของ Mountain plover เกิดการเคลื่อนย้ายยีน (gene flow) ของประชากร ซึ่งมีสาเหตุมาจากการเปลี่ยนแปลงภูมิประเทศในช่วงยุคน้ำแข็ง (Pleistocene) มาเป็นยุคทุ่งหญ้า และเกิดการเปลี่ยนแปลงภูมิประเทศในช่วงยุคทุ่งหญ้ามาเป็นยุคพื้นดินหรือเกษตรกรรม

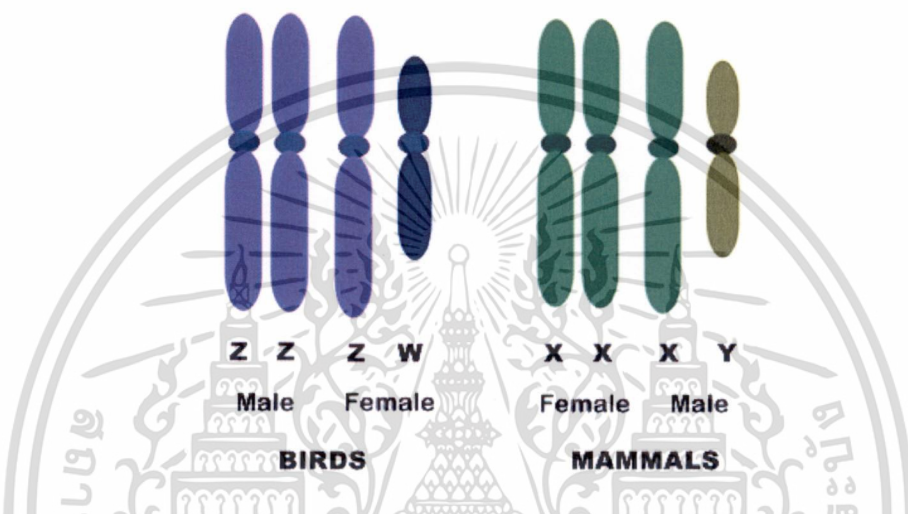
รวมทั้ง Julia และคณะ (2013) ศึกษา New Zealand dotterel (*C. obscurus*) เป็นนกชายเลนที่ใกล้จะสูญพันธุ์ พบเฉพาะถิ่นในประเทศนิวซีแลนด์ ซึ่งพบ 2 สปีชีส์ย่อย ที่อาศัยอยู่ในภูมิภาคที่แตกต่างกัน คือ *C. obscurus aquilonius* กระจายตัวอยู่บนเกาะทางตอนเหนือ ส่วน *C. obscurus obscurus* กระจายตัวอยู่บนเกาะ Stewart ทางตอนใต้ ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมากทางลักษณะทางสัณฐานและพฤติกรรม ก่อนหน้านี้ได้มีการศึกษาความแตกต่างของขนหางและการศึกษาด้านพันธุกรรม ซึ่งพบความล้มเหลวในการแยกความแตกต่างระหว่างสปีชีส์ย่อย จึงได้มีการใช้ลำดับดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรียและนิวเคลียส เพื่อแยกความแตกต่างระหว่าง 2 สปีชีส์ย่อย แม้พบความแตกต่างโดยรวมน้อยมาก แต่สามารถแยกนกออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มประชากรที่อยู่ทางเหนือ และกลุ่มประชากรที่อยู่ทางใต้ได้

2.3 การระบุเพศนก

การระบุเพศในนกเป็นประโยชน์ในการติดตามการเปลี่ยนแปลงประชากรนก อัตราส่วนของเพศ (sex ratio) พฤติกรรมการผสมพันธุ์ นิเวศวิทยา การอนุรักษ์ และวิวัฒนาการ รวมทั้งความถูกต้องแม่นยำในการจับคู่เพื่อเพาะขยายพันธุ์เพื่อการค้า การระบุเพศนกโดยทั่วไปแล้วสามารถสังเกตได้จากลักษณะสัณฐานที่แตกต่างกันระหว่างเพศ หรือมองเห็นความแตกต่างระหว่างเพศผู้และเพศเมียได้อย่างชัดเจน กล่าวคือ เพศผู้และเพศเมียมีลักษณะเฉพาะที่แสดงออกทางลักษณะภายนอกที่ต่างกันอย่างชัดเจน สามารถระบุเพศได้เรียกลักษณะนี้ว่า sexually dimorphic เช่น นกแก้ววิเลคัตส ที่สามารถแยกเพศได้จากสีขนโดยเพศเมียมีขนสีแดง ส่วนเพศผู้มีขนสีเขียวที่แยกกันได้อย่างชัดเจน ส่วนนกบางสปีชีส์ที่เพศผู้และเพศเมียมีลักษณะเหมือนกัน ทำให้ไม่สามารถระบุเพศได้จากลักษณะภายนอก เรียกลักษณะนี้ว่า sexually monomorphic เช่น นกชั้นคอนัวร์ และเหยี่ยว แม้ได้พยายามหาความสัมพันธ์ของลักษณะและพฤติกรรมระหว่างเพศ เช่น นกเพศผู้จะมีสีขนที่เข้มและสดใสมากกว่าเพศเมีย และมีขนาดที่เล็กกว่านกเพศเมีย การสังเกตพฤติกรรม การศึกษาเกี่ยวกับฮอร์โมน การตรวจโครโมโซมเพศ การผ่าหรือส่องกล้องเพื่อตรวจดูอวัยวะเพศภายใน ซึ่งอาจทำให้นกบาดเจ็บ นอกจากนี้แล้วยังมีวิธีการตรวจจากโครโมโซมเพศ โดยการจัดเรียงโครโมโซม (karyotyping) จากนกเป็นสัตว์ปีกที่มีลักษณะของโครโมโซมเพศแตกต่างกับคน กล่าวคือในคนเพศเมียมีโครโมโซมเพศเป็นแบบโฮโมแกมมีท (homogametic sex) ซึ่งมีโครโมโซมเพศที่เหมือนกัน คือ XX ทำให้สร้างเซลล์สืบพันธุ์ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

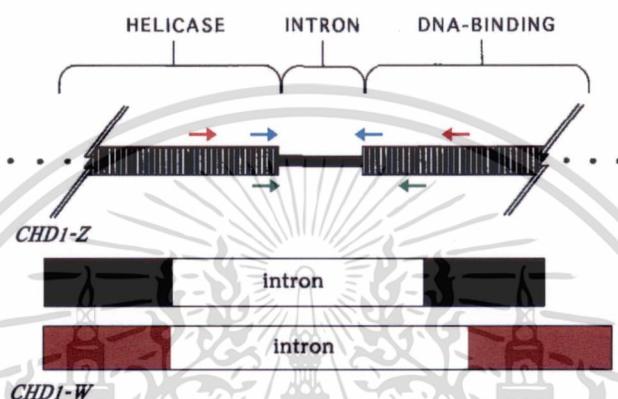
แบบเดียว ส่วนเพศผู้จะมีโครโมโซมเพศเป็นแบบเฮเทอโรแกมีท (heterogametic sex) จะมีโครโมโซมเพศแตกต่างกัน คือ แบบ XY ทำให้สามารถสร้างเซลล์สืบพันธุ์ได้สองแบบ แต่ในสัตว์ปีก เช่นนกเพศเมียจะมีโครโมโซมเพศเป็นเฮเทอโรแกมีท คือ มีโครโมโซม Z และ W ส่วนเพศผู้จะเป็นแบบโฮโมแกมีท ซึ่งจะมีเฉพาะโครโมโซม Z แสดงดังรูปที่ 2.4 และจากการศึกษาโครโมโซมเพศของนก พบว่าโครโมโซม Z จะมีขนาดใหญ่กว่าโครโมโซม W จากการรายงานของ Griffiths และคณะ (2000) สามารถใช้เทคนิคเซลล์พันธุศาสตร์ (cytogenetic) ในการระบุเพศนกได้ โดยตรวจสอบการจัดเรียงตัวของโครโมโซมและหาโครโมโซมเพศ แต่การระบุเพศนกด้วยวิธีนี้เป็นวิธีที่ยาก มีหลายขั้นตอนและต้องใช้เวลาในการตรวจสอบนานจึงไม่เป็นที่นิยมใช้ในการระบุเพศนก



รูปที่ 2.4 แสดงความแตกต่างระหว่างโครโมโซมเพศของนก และโครโมโซมเพศของคน
ที่มา : ณิชากัทร ขอบอาภรณ์

การระบุเพศบางชนิดยังมีปัจจัยที่ทำให้การแปลผลคลาดเคลื่อนได้ เช่น อายุ ฤดูกาลผสมพันธุ์ และขนาดของลำตัว เป็นต้น รวมทั้งมีผลทำให้นกบาดเจ็บได้ (Bermúdez-Humarán และคณะ, 2002) ดังนั้นจึงได้มีการพัฒนาการระบุเพศด้วยเทคนิคทางโมเลกุลขึ้น (Cerit and Avanus, 2007) โดยเทคนิคที่นิยมนำมาใช้มากขึ้นในการระบุเพศนกนั้นเกิดขึ้นหลังการค้นพบยีน *chromo-helicase-DNA binding (CHD)* บนโครโมโซม W (Griffiths and Tiwari, 1995) และโครโมโซม Z (Griffiths and Korn, 1997) Dubiec และ Neubauer (2006) ได้รวบรวมข้อมูลเกี่ยวกับการระบุเพศนกด้วยเทคนิคระดับโมเลกุล เนื่องจากพบปัญหาว่ามีนกหลายสปีชีส์ไม่สามารถระบุเพศได้จากลักษณะภายนอก จึงจำเป็นต้องอาศัยเทคนิคระดับโมเลกุลมาใช้เพื่อเพิ่มความถูกต้อง แม่นยำมากยิ่งขึ้น โดยการตรวจสอบสามารถตรวจสอบจากตำแหน่งยีนต่างๆ เช่น ยีน *Nipped-B homolog (NIPBL)* ยีน *RAS p21 protein activator 1 (RASA1)* และยีนตำแหน่ง 0.6 kb EcoRI (EE0.6) ที่อยู่บนโครโมโซมเพศนก (Morinha และคณะ, 2012) แต่ยีนที่ได้รับการนิยมในการระบุเพศนกมากที่สุด คือ ยีน *CHD (Chromo-helicase-DNA binding protein)* การตรวจสอบยีน *CHD* จะอาศัยหลักการที่ว่าโครโมโซมเพศในนกมีสองชนิดคือ โครโมโซม W และ โครโมโซม Z นกเพศผู้จะมีโครโมโซมเพศเป็น ZZ และนกเพศเมียมีโครโมโซมเพศเป็น ZW โดยยีน *CHD* ที่อยู่บนโครโมโซม Z เรียกว่าอัลลีล *CHD-Z* ส่วนที่อยู่บนโครโมโซม W เรียกว่าอัลลีล *CHD-W* (Griffiths และคณะ, 1998; Kahn และคณะ, 1998; Fridofsson และ Ellegren, 1999) และลักษณะของยีนจะมีอินตรอน (intron) อยู่ เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ระหว่าง helicase และ DNA binding protein ดังรูปที่ 2.5 ซึ่งพบได้ในนกเกือบทุกสปีชีส์ ร่วมกับหลักการที่มีความแตกต่างของความยาวบริเวณ intron ของอัลลีล *CHD-Z* และอัลลีล *CHD-W* (Griffiths และ Tiwari, 1995; Ellegren, 1996; Griffiths และ Korn, 1997; Kahn และคณะ, 1998) จึงนำมาใช้ในการระบุเพศนกได้เป็นอย่างดี ยกเว้นนกที่บินไม่ได้ การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยใช้ไพรเมอร์ชนิดต่างๆสามารถทำได้ทั้งสองอัลลีล แต่จะทำให้ชนิดดีเอ็นเอของอัลลีลทั้งสองมีความยาวแตกต่างกัน



รูปที่ 2.5 แสดงยีน *CHD-W* และ *CHD-Z* และความยาวบริเวณ Intron
ที่มา: Kahn และคณะ (1998)

ไพรเมอร์คู่แรกที่นำมาใช้ในการระบุเพศนก คือไพรเมอร์ P2/P3 (Griffiths และ Tiwari, 1995) แต่ไม่เป็นที่นิยมเนื่องจากเป็นการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในส่วน exon ของยีน *CHD* ที่ขนาดของชนิดดีเอ็นเอระหว่าง *CHD-W* และ *CHD-Z* แตกต่างกันประมาณ 60-110 คู่เบส ขึ้นอยู่กับแต่ละสปีชีส์ และได้มีการพัฒนา universal primers ที่สามารถนำมาใช้ในการระบุเพศนก ได้แก่ P2/P8 (Griffiths และคณะ, 1998), 1237L/1272H (Kahn และคณะ, 1998) และ 2550F/2718R (Fridolfsson และ Ellegren, 1999) ซึ่งไพรเมอร์ P2/P8 และ 1237L/1272H จะเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน *CHD* บริเวณ intron เดียวกัน และไพรเมอร์ 2550F/2718R จะเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน *CHD* บริเวณ intron ที่ต่างไป สำหรับ universal primer ทั้ง 3 คู่นี้เหมาะกับการระบุเพศในนกแตกต่างกันไป (Dalton *et al.*, 2010, Dawson *et al.*, 2001) รวมทั้งในวงศ์นกเป็ดน้ำ (Anatidae family) (Ong and Vellayan, 2008) Wang และคณะ (2007) ได้ศึกษาการนำไพรเมอร์มาใช้ในการระบุเพศนกจำนวน 73 สปีชีส์ รวม 19 วงศ์ พบว่าไพรเมอร์ 1237L/1272H สามารถระบุเพศนกได้ถึง 78.75 เปอร์เซ็นต์ และไม่สามารถระบุเพศได้ 21.25 เปอร์เซ็นต์ โดยไม่สามารถระบุเพศได้ในวงศ์ Ciconiidae, Muscipidae, Timaliidae และบางส่วนของ Psittacidae ซึ่งสามารถระบุเพศได้ด้วยไพรเมอร์ 2550F/2718R แต่สำหรับไพรเมอร์ 2550F/2718R สามารถระบุเพศนกได้เพียง 73.75 เปอร์เซ็นต์ โดยไม่สามารถใช้ไพรเมอร์นี้ในวงศ์ Accipitridae, Cracidae, Caprimulgidae, Musophagidae, Pycnonotidae และบางส่วนของ Threskiornithidae, Anatidae, Phasianidae และ Psittacidae แต่อย่างไรก็ตาม universal primers นี้ไม่สามารถเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นำมาใช้ในการระบุเพศนกบินไม่ได้ เช่น นกกระจอกเทศ (Ostrich: *Struthio camelus*) (Griffiths และคณะ, 1998)

Watson และคณะ (2004) ระบุเพศนกกินหอยปากแดง (*Eurasian oystercatcher*) โดยเก็บตัวอย่างจากขอบบริเวณอกของนกจากนั้นนำมาสกัดดีเอ็นเอ รวมทั้งวัดขนาดของปากเพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างเพศและลักษณะทางสัณฐาน การระบุเพศด้วยเทคนิคทางโมเลกุลโดยการเพิ่มปริมาณยีน *CHD* ด้วยไพรเมอร์ P2/P8 พบว่านกเพศผู้เกิด 1 แถบ ที่มีขนาด 380 คู่เบส นกเพศเมียเกิด 2 แถบ ที่มีขนาด 380 และ 400 คู่เบส และจากการระบุเพศนกจำนวน 80 ตัว สามารถระบุเพศได้ 75 ตัว ไม่สามารถเพิ่มปริมาณยีน *CHD* ได้จำนวน 5 ตัว และจากการเปรียบเทียบพบว่าการระบุเพศด้วยการวัดความยาวปากให้ผลถูกต้องเพียง 90 เปอร์เซ็นต์

Cheng และคณะ (2006) ระบุเพศนกปากซ้อนหน้าดำ (*Platalea minor*) ซึ่งเป็นนกประจำถิ่นของเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ที่ใกล้จะสูญพันธุ์ด้วยเทคนิคระดับโมเลกุล เพื่อเป็นประโยชน์ในการวางแผนการอนุรักษ์หรือขยายสายพันธุ์ และศึกษาชีววิทยาของนก โดยตัวอย่างที่ได้เป็นตัวอย่างนกที่ตายจากการเกิดโรคระบาดของเชื้อ *Clostridium botulinum* จำนวน 26 ตัว จากนั้นตรวจสอบลักษณะอวัยวะเพศ เพื่อยืนยันกับผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคทางโมเลกุล โดยการเพิ่มปริมาณยีน *CHD* ด้วยไพรเมอร์ 2550F/2718R จากผลการวิเคราะห์ พบว่านกเพศผู้เกิดผลผลิตพีซีอาร์ 1 แถบ มีขนาดขึ้นดีเอ็นเอ 600 คู่เบส (*CHD-Z*) เพศเมียเกิดผลผลิตพีซีอาร์ 2 แถบ มีขนาดขึ้นดีเอ็นเอ 600 และ 450 คู่เบส (*CHD-Z* และ *CHD-W*) ซึ่งผลจากการระบุเพศนกด้วยเทคนิคทางโมเลกุลให้ผลตรงกับการตรวจสอบอวัยวะเพศของนก ที่สามารถแยกเพศได้เป็นนกเพศผู้ 14 ตัว และเพศเมีย 12 ตัว

Wang และคณะ (2007) ศึกษาการระบุเพศนกจากตัวอย่างจำนวน 80 สายพันธุ์ ครอบคลุม 19 วงศ์ โดยอาศัยเทคนิคพีซีอาร์ที่ใช้ไพรเมอร์ 2 คู่ คือ 2550F/2718R และ 1237L/1273H ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในตำแหน่งยีน *CHD* โดยใช้สภาวะในการทำพีซีอาร์เดียวกันคือ 95 องศาเซลเซียส 5 นาที 95 องศาเซลเซียส 45 วินาที 50 องศาเซลเซียส 45 วินาที 72 องศาเซลเซียส 45 วินาที จำนวน 35 รอบ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที จากนั้นทำการวิเคราะห์ผลผลิตพีซีอาร์โดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสที่ความเข้มข้นของอะกาโรส 2.5 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเมื่อใช้ไพรเมอร์ 1237L/1273H สามารถระบุเพศนกได้จำนวน 63 สายพันธุ์ และไพรเมอร์ 2550F/2718R สามารถระบุเพศนกได้จำนวน 59 สายพันธุ์

ในการระบุเพศนกในระดับโมเลกุลด้วยเทคนิคพีซีอาร์ นิยมใช้ไพรเมอร์ 3 คู่ (คู่ไพรเมอร์ P2/P8, 1237L/1272H และ 2550F/2718R) แต่อย่างไรก็ตามมีการรายงานว่ามีบางสปีชีส์มีอัลลีล *CHD-Z* และ *CHD-W* ที่มีขนาดเท่ากัน จำเป็นต้องอาศัยเทคนิคทางโมเลกุลอื่นมาช่วยในการระบุเพศ ได้แก่ เทคนิคอาร์เอฟแอลพี (Restriction fragment length polymorphism: RFLP) ซึ่งเป็นการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะเข้ามาช่วยในการแยกความแตกต่างของขึ้นดีเอ็นเอ ดังเช่น Sacchi และคณะ (2004) ระบุเพศเหยี่ยวนิ้วสั้น (*Circaetus gallicus*) โดยเพิ่มจำนวนอัลลีล *CHD-W* และ *CHD-Z* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ P2/P8 พบว่าเกิดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ 1 แถบ มีขนาดขึ้นดีเอ็นเอประมาณ 380 คู่เบส ในทุกตัวอย่าง จากนั้นทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของอัลลีลทั้งสองพบว่าอัลลีล *CHD-W* ยาวกว่าอัลลีล *CHD-Z* อยู่เพียง 9 คู่เบส (387 และ 378 คู่เบส ตามลำดับ) ซึ่งมีความแตกต่างกันน้อยมาก เมื่อนำมาวิเคราะห์ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสทำให้เพศผู้และเมีย เกิดผลผลิตพีซีอาร์ 1 แถบ ทำให้ไม่สามารถระบุเพศได้ จึงอาศัยเทคนิคอาร์เอฟแอลพี ในการระบุเพศเหยี่ยวนิ้วสั้น โดยใช้เอนไซม์ 2 ชนิด ได้แก่ เอนไซม์ *HaeIII* และเอนไซม์ *Asp700I* โดยเมื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยอิเล็กโทรโฟรีซิสพบว่าเอนไซม์ *HaeIII* มีความจำเพาะกับอัลลีล *CHD-Z* ทำให้เกิดความแตกต่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาค้นคว้าเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของขนาดชิ้นดีเอ็นเอ คือเพศผู้เกิดผลผลิตพีซีอาร์ 2 แถบ (303 และ 75 คู่เบส) เพศเมียเกิดผลผลิตพีซีอาร์ 3 แถบ (387, 303 และ 75 คู่เบส) ส่วนเอนไซม์ *Asp700I* มีความจำเพาะกับอัลลิล *CHD-W* ทำให้เกิดความแตกต่างของขนาดชิ้นดีเอ็นเอ คือเพศผู้เกิดผลผลิตพีซีอาร์ 1 แถบ (378 คู่เบส) และเพศเมียเกิดผลผลิตพีซีอาร์ 3 แถบ (378, 280 และ 107 คู่เบส) ดังนั้นการใช้เอนไซม์ *HaeIII* และเอนไซม์ *Asp700I* มาช่วยย่อยผลผลิตพีซีอาร์จากไพรเมอร์ P2/P8 ทำให้เกิดความแตกต่างของชิ้นดีเอ็นเอที่สามารถระบุเพศนกได้ รวมทั้งงานวิจัยของ Costantini และคณะ (2008) พบปัญหาเช่นเดียวกันในการระบุเพศนกแพนกวินฮัมโบลด์ (*Spheniscus humboldti*) จากการตรวจสอบยีน *CHD* ด้วยไพรเมอร์ P2/P8 ผลการทดลองพบว่าเพศผู้เกิดผลผลิตพีซีอาร์ 1 แถบ (370 คู่เบส) เพศเมียเกิด 2 แถบ (370 และ 380 คู่เบส) ทำให้เกิดความคลุมเครือ เนื่องจากขนาดชิ้นดีเอ็นเอมีความแตกต่างกันน้อย จึงใช้เทคนิคอาร์เอฟแอลพีที่ใช้เอนไซม์ 2 ชนิด คือ เอนไซม์ *HaeIII* (310, 60 และ 380 คู่เบส) และเอนไซม์ *Asp700I* (370, 270 และ 110 คู่เบส) ทำให้แยกความแตกต่างของเพศผู้และเพศเมียได้ดียิ่งขึ้น นอกจากนั้นแล้วยังมีการพัฒนาเทคนิคอื่นๆ เช่น เทคนิคอาร์เอฟดี (Random amplified polymorphic DNA: RAPD) (Wu และคณะ, 2007) รวมทั้งการใช้เทคนิค Real time รวมทั้งการวิเคราะห์ melting curve ที่สามารถแยกผลผลิตพีซีอาร์ที่มีความแตกต่างกันจากค่าของ T_m (melting temperatures) โดยนำมาใช้ในการระบุเพศนกจากการตรวจสอบอัลลิล *CHD-Z* และ *CHD-W* ที่มีค่า T_m ต่างกัน ซึ่งวิธีการระบุเพศนกด้วยเทคนิคนี้เป็นวิธีที่มีความรวดเร็ว แต่มีข้อจำกัดระวังคือการเลือกไพรเมอร์ต้องมีความเหมาะสม (Morinha และคณะ, 2012)

2.4 การเก็บตัวอย่าง

ในงานวิจัยและการทดลองในระดับโมเลกุลต้องอาศัยดีเอ็นเอที่มีทั้งคุณภาพและปริมาณที่เหมาะสมกับงานวิจัย การได้มาซึ่งดีเอ็นเอของนกคือการใช้ตัวอย่างจากเลือด (Ellegren, 1996; Wang และคณะ, 2007) เพื่อใช้ในการสกัดดีเอ็นเอทำให้นักได้รับการบาดเจ็บและเกิดภาวะเครียด แม้ว่าจะมีการหลีกเลี่ยงการใช้ตัวอย่างจากเลือดแล้วก็ตาม เช่น การใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากขนนก (Jensen และคณะ, 2003; Sacchi และคณะ, 2004; Costantini และคณะ, 2008) เนื้อเยื่อ (Kahn และคณะ, 1998; Fridolfsson และ Ellegren, 1999; Wang และคณะ, 2007) เส้นเลือดบริเวณเปลือกไข่ (Jensen และคณะ, 2003) และอุจจาระ (Robertson และคณะ, 1999; Idaghdour และคณะ, 2003) ซึ่งเป็นวิธีที่นกไม่ได้รับการบาดเจ็บ ถึงแม้ว่าเลือดจะเป็นแหล่งตัวอย่างที่เหมาะสม แต่ต้องใช้ในปริมาณมากพอสำหรับการสกัดดีเอ็นเอ ซึ่งมีปริมาตรประมาณ 80-100 ไมโครลิตร (Harvey และคณะ, 2006; Wang และคณะ, 2007) ส่วนใหญ่ต้องเจาะจากบริเวณปีกทำให้นักได้รับบาดเจ็บและเกิดภาวะเครียดได้ นอกจากนั้นแล้วยังต้องใช้การสกัดดีเอ็นเอโดยวิธีมาตรฐาน คือการใช้ lysis buffer และ phenol/chloroform ที่ต้องใช้เวลาในการสกัด แม้ว่าจะมีการนำ Chelex มาใช้ในการสกัด รวมทั้งชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูปที่มีความสะดวก และรวดเร็วมากยิ่งขึ้น แต่ยังคงมีค่าใช้จ่ายสูง

ปัจจุบันมีการนำกระดาษสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูปหรือกระดาษ FTA (Fast Technology Analysis Card : FTA@card) มาใช้ในการเก็บตัวอย่าง ซึ่งเป็นวิธีที่ง่าย สะดวกรวดเร็วในการเก็บตัวอย่าง และยังพบว่าในหลายงานวิจัยที่นำมาใช้กับเทคนิคในระดับโมเลกุล เพื่อการตรวจสอบและวิจัยงานต่างๆ ดังเช่น Smith และ Burgoyne (2004) พบว่ากระดาษ FTA@card สามารถใช้ในการเก็บตัวอย่างดีเอ็นเอของตัวอย่างสัตว์ป่าได้ ซึ่งดีเอ็นเอที่ได้มีความบริสุทธิ์ สามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคทางโมเลกุลได้ การนำ FTA@card มาใช้เก็บตัวอย่างเลือด เพื่อลดปริมาตรของเลือด โดยใช้เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นอนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพียงประมาณ 1-2 หยด จากการเจาะด้วยเข็มเบอร์ 26 หรือเมื่อหยดเลือดลงบนกระดาษแล้วมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางไม่น้อยกว่า 2 มิลลิเมตร ในงานวิจัยเกี่ยวกับนกมีการนำกระดาษ FTA@card มาใช้ในการเก็บตัวอย่าง เช่น Garcia และคณะ (2008) ที่เก็บตัวอย่างเลือดด้วยกระดาษ FTA@card และเก็บตัวอย่างขนมาสกัดดีเอ็นเอตามวิธีปกติทั่วไป เพื่อใช้ในการระบุเพศนกแร้งเครา (*Gypaetus barbatus*) พบว่าการใช้กระดาษ FTA@card ให้ผลการวิเคราะห์ที่ดีเหมือนกับการสกัดดีเอ็นเอแบบทั่วไป แต่มีความรวดเร็วและมีราคาถูกกว่าการสกัดดีเอ็นเอแบบปกติทั่วไป รวมทั้ง Kocijan และคณะ (2011) ใช้กระดาษ FTA@card ในเก็บตัวอย่างเลือดของแร้งกริฟฟอน (*Gyps fulvus*) รวมทั้งสุพัตรา และคณะ (2012) ที่ใช้ระบุเพศในนกแก้ว ซึ่งสะดวกและง่ายกว่าการเจาะเลือดใส่หลอดทดลอง ดังนั้นจึงสามารถเก็บตัวอย่างได้คราวละจำนวนมาก และการใช้ FTA@card ระบุเพศนกจะใช้เวลารวดเร็ว เนื่องจากสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยตรงจากกระดาษ โดยไม่ต้องผ่านขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอแบบมาตรฐานที่ใช้ระยะเวลาานาน มีเพียงขั้นตอนการล้างที่ทำให้ดีเอ็นเอบน FTA@card บริสุทธิ์เท่านั้น แต่มีคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอเพียงพอในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิคพีซีอาร์ นอกจากนี้การเก็บรักษาและการขนส่งจากภาคสนามไปยังห้องปฏิบัติการก็เป็นไปอย่างสะดวกประหยัดพื้นที่ และรวดเร็ว และสามารถจัดส่งทางไปรษณีย์ได้ (Gutiérrez-Corcherо et al., 2002) และสามารถเก็บตัวอย่างได้ที่อุณหภูมิห้อง

ซึ่งนอกพพที่สนใจศึกษาครั้งนี้เพศผู้และเพศเมียมีลักษณะสัณฐานแตกต่างกันเล็กน้อย ทำให้ยากต่อการระบุเพศ ดังนั้นจึงต้องอาศัยเทคนิคทางโมเลกุลเพื่อการระบุเพศนก โดยการเปรียบเทียบความแตกต่างของยีน *CHD* (*chromosome-helicase-DNA-binding*) ที่อยู่บนโครโมโซมเพศ ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์ชนิดต่างๆ

บทที่ 3

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

3.1 แหล่งที่มาของตัวอย่างนก

เก็บตัวอย่างนกสกุลหัวโตเล็ก (Genus *Charadrius*) ร่วมกับสถานีวิจัยสัตว์ป่าบึงบอระเพ็ด กลุ่มงานวิจัยสัตว์ป่า กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพันธุ์พืช ภายใต้การทำงานของโครงการติดตามเส้นทางอพยพของนกโดยการติดเครื่องหมายติดตามตัว และเฝ้าระวังโรคอุบัติใหม่ โดยเก็บตัวอย่างนกสกุลหัวโตเล็ก จาก 3 พื้นที่ คือ บริเวณนาเกลือสมุทรณิรัตน์ จังหวัดสมุทรสาคร บริเวณแหลมผักเบี้ย จังหวัดเพชรบุรี และบริเวณปากแม่น้ำกั้นตัง จังหวัดตรัง ช่วงเดือนกันยายน - พฤศจิกายน พ.ศ. 2556 โดย 3 พื้นที่นี้เป็นพื้นที่ที่นกชายเลนมาพักอาศัยอยู่เป็นประจำในช่วงฤดูอพยพเป็นจำนวนมาก โดยเป็นพื้นที่ที่เป็นแหล่งอาหารของนก และมีพื้นที่สำหรับพักในช่วงน้ำทะเลขึ้นสูง (ฉัตร สอนสา และคณะ, 2553)

3.2 อุปกรณ์ และเครื่องมือ

- 3.2.1 กระดาษ FTA (FTA Card): Whatman
- 3.2.2 เข็ม (Needle) ขนาดเบอร์ 26
- 3.2.3 ถุงมือยาง (Glove)
- 3.2.4 หัวเจาะกระดาษ FTA (Puncture) ขนาด 2 มิลลิเมตร
- 3.2.5 ชุดไมโครปิเปต (Micropipettes) และทิวป์ (Micropipette tips) ขนาดต่างๆ
- 3.2.6 หลอดทดลอง (Microcentrifuge Tube) ขนาด 0.2, 0.5 และ 1.5 มิลลิลิตร
- 3.2.7 เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลอง (thermal cycler): Eppendorf Mastercycler® ep Gradient S
- 3.2.8 เครื่องแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า (Agarose gel electrophoresis)
- 3.2.9 เครื่องวิเคราะห์เจลอิเล็กโทรโฟริซิส (Gel documentation): SYNGENE InGenius Bio imaging พร้อมโปรแกรม Genesnap
- 3.2.10 กระดาษปรีน รุ่น UPP-110HG: Sony
- 3.2.11 เครื่องเขย่าผสมสารละลาย (Vortex mixer)
- 3.2.12 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge): Hettich รุ่น Mikro 22R
- 3.2.13 เครื่องปั่นตก (Spin down)
- 3.2.14 ไมโครเวฟ (Microwave)
- 3.2.15 เครื่องให้ความร้อน (Heat box)
- 3.2.16 เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยแรงดันไอน้ำ (Autoclave)
- 3.2.17 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)
- 3.2.18 เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
- 3.2.19 ขวดแก้วบรรจุสารเคมี (Solvent dispenser) ขนาด 500 มิลลิลิตร
- 3.2.20 ปีกเกอร์ (Beaker) ขนาด 100, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร
- 3.2.21 กระบอกตวง (Cylinder) ขนาด 50, 100, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร
- 3.2.22 ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 125 และ 250 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารต้นฉบับที่จัดทำขึ้นเพื่อใช้ในการศึกษาวิจัยเท่านั้น ไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.2.23 อุปกรณ์สำหรับใส่หลอดทดลอง (Rack) ขนาด 0.2 และ 1.5 มิลลิลิตร
- 3.2.24 ตู้เย็น (Refrigerator) 4 และ -20 องศาเซลเซียส
- 3.2.25 เครื่องชั่ง (Balance) ชนิดละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง
- 3.2.26 ปากคีบ (Forceps)
- 3.2.27 คอมพิวเตอร์ (Computer) พร้อมโปรแกรมต่างๆ เช่น Notepad, BioEdit,
- 3.2.28 วัสดุและอุปกรณ์ที่ส่งต่ายสำหรับดักนก

3.3 สารเคมี

- 3.3.1 สารละลาย FTA Purification reagent: Whatman, US
- 3.3.2 Tris base: Vivantis
- 3.3.3 กรดบอริก (Boric acid)
- 3.3.4 กรดเอททิลีนไดอะมีนเตตระอะซีเตต (Ethylenediaminetetraacetate; EDTA)
- 3.3.5 2 x Taq Master Mix: Vivantis
- 3.3.6 น้ำปราศจากไอออน (Nuclaease free water): Vivantis
- 3.3.7 อะกาโรสเจล (Agarose gel): Vivantis
- 3.3.8 สีย้อม (Loading Dye): Biolabs
- 3.3.9 ดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA maker) ขนาด 50 คู่เบส: Biolabs และ 100 คู่เบส: Vivantis
- 3.3.10 สารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ (Ethidium bromide): Vivantis
- 3.3.11 ชุดน้ำยาสำหรับทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ (GF-1 Ambiclean kit (PCR&Gel): Vivantis
- 3.3.12 ไพรเมอร์ (primer) ที่ใช้ในเทคนิค PCR ส่งเคราะห์จากบริษัท 1st BASE Custom Oligos ลำดับนิวคลีโอไทด์ดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 แสดงชนิดไพรเมอร์ ลำดับนิวคลีโอไทด์ ตำแหน่ง และเอกสารอ้างอิงของไพรเมอร์

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	ตำแหน่งยีน	อ้างอิง
2550F	5'-GTTACTGATTCGTCTACGAGA-3'	CHD	Fridolfsson และ
2718R	5'-ATTGAAATGATCCAGTGCTTG-3'	CHD	Ellegren, 1999
P2	5'-TCTGCATCGCTAAATCCTTT-3'	CHD	Griffiths และคณะ,
P8	5'-CTCCCAAGGATGAGRAAYTG-3	CHD	1998
1237L	5'-GAGAACTGTGCAAAACAG-3'	CHD	Kahn และคณะ, 1998
1272H	5'-TCCAGAATATCTTCTGCTCC-3'	CHD	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 การขออนุญาตเก็บตัวอย่าง

เนื่องจากตัวอย่างนกสกุลนกหัวโตเล็กเป็นสัตว์ป่าคุ้มครอง ต้องได้รับอนุญาตจากกรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพันธุ์พืช ในการเก็บตัวอย่างเพื่อการศึกษาหรือวิจัย ในชื่อโครงการ การวิเคราะห์พันธุกรรมและการตรวจสอบเพศในระดับโมเลกุลของนกสกุลหัวโต (*Charadrius*)

3.4.2 การเก็บตัวอย่างนก

เก็บตัวอย่างนกสกุลหัวโตเล็กด้วยเทคนิคการจับนกด้วยท่อส่งตาข่าย (cannon net) ซึ่งท่อส่งตาข่ายเป็นอุปกรณ์ที่ใช้ในการจับนกที่สามารถจับนกได้ครั้งละมากๆ โดยที่นกไม่เป็นอันตราย (ทิจู และคณะ, 2554) โดยในขั้นตอนแรกจะต้องสำรวจพื้นที่ที่นกบินมารวมกลุ่มกัน จากนั้นทำการติดตั้งอุปกรณ์ท่อส่งตาข่าย ในการเลือกพื้นที่สำหรับติดตั้งอุปกรณ์จะเลือกพื้นที่ที่นกมาอาศัยพักอยู่เป็นจำนวนมาก พร้อมติดตั้งชุดท่อส่งตาข่ายโดยชุดหลุมเพื่อฝังท่อส่งตาข่าย และพลาจอุปกรณ์ให้กลมกลืนกับพื้นที่เพื่อให้หมกมิดสังเกตน้อยที่สุด โล่กด้านหน้าตาข่าย เมื่อนกเข้ามาในพื้นที่ที่จับที่ตั้งตาข่ายไว้และนกทุกตัวอยู่ในระยะปลอดภัย จึงดำเนินการยิงตาข่ายเพื่อจับนก และรีบเก็บนกอย่างปลอดภัย พร้อมจำแนกชนิด นำนกใส่กรงผ้าที่เตรียมไว้ เพื่อรอขั้นตอนในการเก็บข้อมูลชีวสัณฐานของนก และใส่เครื่องหมายติดตามตัว แสดงดังรูปที่ 3.1 A-D โดยการเก็บตัวอย่างนกสกุลหัวโตเล็กที่อพยพมาในประเทศไทย อยู่ภายใต้การทำงานของหัวหน้าและเจ้าหน้าที่สถานีวิจัยสัตว์ป่าบึงบอระเพ็ด กลุ่มงานวิจัยสัตว์ป่า กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม ในโครงการติดตามเส้นทางอพยพของนกโดยการติดเครื่องหมายติดตามตัวและเฝ้าระวังโรคอุบัติใหม่

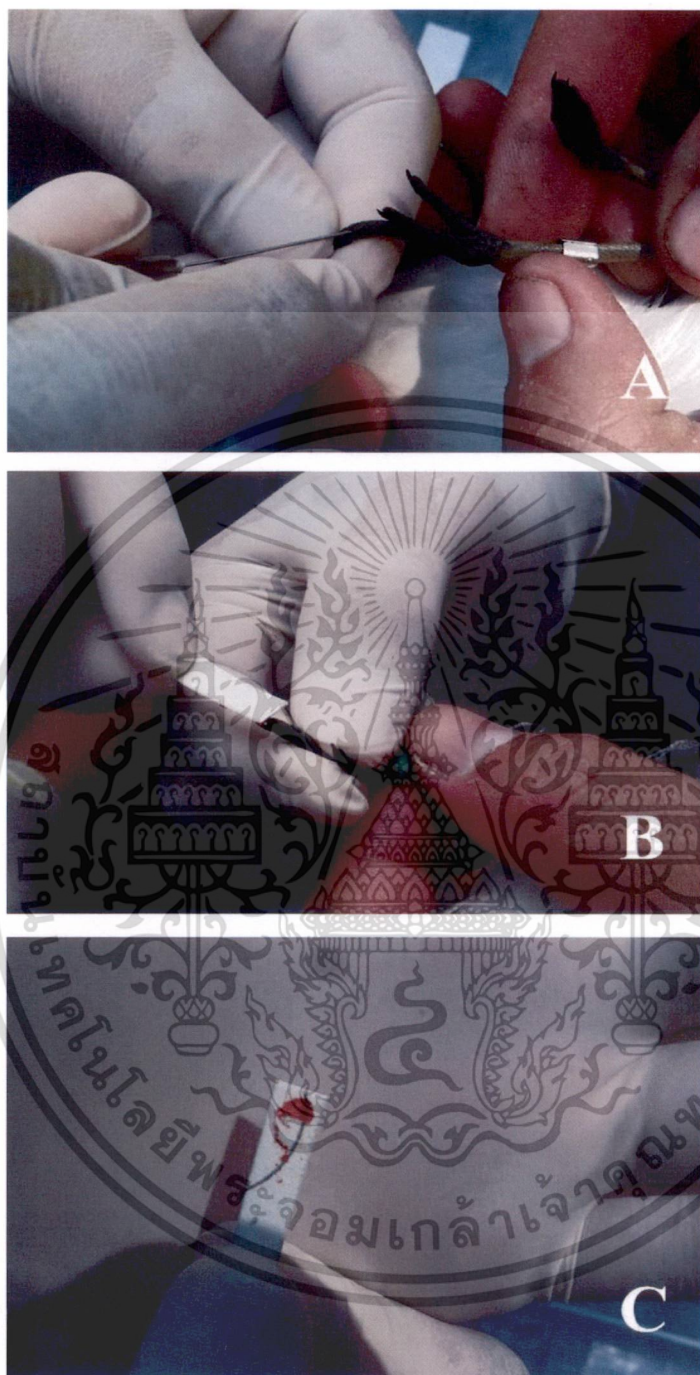
3.4.3 การเก็บตัวอย่างเลือดนก

หลังการเก็บข้อมูลชีวสัณฐานของนก และใส่เครื่องหมายติดตามตัวแล้ว จะจดบันทึกรหัสห่วงขานกและเก็บตัวอย่างเลือดนก โดยการเจาะเลือดที่บริเวณส่วนปลายนิ้วเท้าด้วยเข็มเบอร์ 26 หลังการทำความสะอาดนิ้วเท้าของนกด้วยแอลกอฮอล์ จากนั้นใช้กระดาษ FTA ซับหรือป้ายที่หยดเลือดเพื่อเก็บตัวอย่าง และห้ามเลือด ขั้นตอนการเก็บตัวอย่างเลือดนกแสดงดังรูปที่ 3.2 A-C และเก็บกระดาษ FTA ที่มีตัวอย่างเลือดไว้ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปิดฝาทิ้งไว้ให้ตัวอย่างแห้ง และหลังจากเลือดหยุดไหล ทำการปล่อยนกกลับคืนสู่ธรรมชาติในบริเวณเดียวกับที่ดักจับ นำหลอดตัวอย่างเก็บไว้ในกล่องที่มีซิลิกาเจลป้องกันความชื้น ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อนำไปในขั้นตอนต่อไป โดยการเก็บตัวอย่างทั้ง 3 พื้นที่ จะให้รหัสชื่อตัวอย่างที่เก็บได้จังหวัดสมุทรสาคร จะใช้รหัสขึ้นต้น SS จังหวัดเพชรบุรี ใช้รหัส PP และจังหวัดตรังใช้รหัส TT



รูปที่ 3.1 แสดงขั้นตอนการดักจับนกด้วยวิธีท่อนั่งตาข่าย (cannon net) (A) การติดตั้งตาข่ายดักจับนก (B) การเก็บตัวอย่างหลังการยิงท่อนั่งตาข่าย (C) การวัดความยาวหน้าแข้งในขั้นตอนการเก็บข้อมูลชีวสัณฐานของนก (D) การใส่เครื่องหมายติดตามตัวภาพโดย ณิชากัทร ชอบอาภรณ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3.2 แสดงขั้นตอนการเก็บตัวอย่างเลือดนกด้วยกระดาษ FTA ได้แก่ (A) การใช้เข็มเจาะบริเวณปลายนิ้วเท้าหลังการทำความสะอาดนิ้วเท้าของนกด้วยแอลกอฮอล์ (B) การใช้กระดาษ FTA ชั้หรือป้ายที่หยดเลือดเพื่อเก็บตัวอย่างเลือดนก (C) ตัวอย่างเลือดนกบนกระดาษ FTA

ภาพโดย ณิชภัทร ชอบอาภรณ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.4 การทำดีเอ็นเอบนกระดาษ FTA ให้บริสุทธิ์

ทำความสะอาดหัวเจาะกระดาษขนาด 2 มิลลิเมตร และนำไปเจาะบนกระดาษ FTA ในตำแหน่งที่ไม่มีตัวอย่างเลือด เพื่อเป็นการกำจัดเศษฝุ่นหรือสิ่งสกปรกที่ยังตกค้างบริเวณหัวเจาะ ก่อนจะเจาะในบริเวณที่มีตัวอย่างเลือดใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 0.2 มิลลิลิตร เพื่อทำขั้นตอนการทำดีเอ็นเอที่อยู่บนกระดาษให้บริสุทธิ์ (ดัดแปลงจากสุพัตรา และคณะ, 2555) โดยการเติมสาร FTA purification reagent (Whatman) ปริมาตร 125 ไมโครลิตร นำไป Vortex ซึ่งสาร FTA purification reagent จะมีคุณสมบัติในการชะล้างสิ่งสกปรกและเศษของเซลล์ที่ติดค้างบนกระดาษ FTA ให้หลุดออก แล้วนำไปปั่นด้วยเครื่อง Heatbox ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลานำไป vortex และดูดสารละลายออก และใส่สาร FTA purification reagent ปริมาตร 125 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาทีอีกครั้ง จากนั้นหยุดการทำงานของสาร FTA purification reagent ด้วยบัฟเฟอร์ TE ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 125 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ดูดสารละลายออก และใส่บัฟเฟอร์ TE ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 125 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 10 นาที ที่อุณหภูมิห้องอีกครั้ง จากนั้นดูดบัฟเฟอร์ TE ออกให้หมด ก่อนจะนำหลอดทดลองที่มีตัวอย่างซึ่งผ่านการทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์แล้ว ไปปั่นให้กระดาษตกด้วยเครื่อง Spindown แล้วนำไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง Heat box ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5-10 นาที หรือจนกว่าจะแห้งสนิท ซึ่งสังเกตได้จากเมื่อทำการดูดหลอดทดลองแล้วกระดาษจะมีการเคลื่อนที่ไปมา

3.4.5 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์

นำหลอดทดลองที่มีกระดาษ FTA ที่ผ่านขั้นตอนการทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ และทำให้แห้งแล้วมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ เพื่อใช้ในการระบุเพศนก และศึกษาหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ในการระบุเพศนกจะทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของยีน *CHD* ในการศึกษาเบื้องต้น เพื่อหาไพรเมอร์คู่ที่เหมาะสมในการระบุเพศนกจะใช้ไพรเมอร์ 3 คู่ หลังจากนั้นจะเลือกไพรเมอร์คู่ที่สามารถแยกความแตกต่างของเพศผู้และเพศเมียได้อย่างชัดเจนมาใช้ในการระบุเพศนกสกุลหัวโตเล็กต่อไป โดยไพรเมอร์ที่ใช้ทั้ง 3 คู่ ได้แก่ ไพรเมอร์ P2/P8 (Griffiths และคณะ, 1998) ไพรเมอร์ 1237L/1272H (Kahn และคณะ, 1998) และไพรเมอร์ 2550F/2718R (Fridolfsson และ Ellegren, 1999) ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจะใช้ปริมาตรสารทั้งหมดเท่ากับ 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย FTA[®] card ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 มิลลิเมตร ที่ผ่านขั้นตอนการทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์แล้วจำนวน 1 แผ่น ไพรเมอร์อย่างละ 0.8 พิโคโมล (ความเข้มข้น 20 พิโคโมลต่อไมโครลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร) และ 1x Taq Master mix (2x Taq Master mix ปริมาตร 12.5 ไมโครลิตร) จากนั้นปรับปริมาตรด้วย Nuclaease free water ปริมาตร 10.5 ไมโครลิตร นำใส่เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ที่ตั้งโปรแกรมอุณหภูมิในขั้นต่างๆ ดังนี้ การ Pre-Denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ Denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที Annealing ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที และ Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที จำนวน 35 รอบ และ Final Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที (Wang และคณะ, 2007)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.6 การวิเคราะห์ผลผลิตพีซีอาร์ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

การวิเคราะห์ผลผลิตพีซีอาร์ของยีน *CHD* นั้นจะตรวจสอบทั้งคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอ ด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส เพื่อการวิเคราะห์ทั้งจำนวน และขนาดชิ้นดีเอ็นเอ โดยจะเตรียมอะกาโรส เจลที่ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ในบัฟเฟอร์ Tris-borate EDTA buffer (TBE buffer) (ภาคผนวก ค) ความเข้มข้น 1X ทำให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกันโดยนำเข้าไมโครเวฟ จนสารละลายเป็นของเหลวใส จากนั้นรอจนกว่าอุณหภูมิจะลดลงจนสามารถใช้มือเปล่าสัมผัสขวดที่ใช้ละลายเจลได้ แล้วจึงนำมา เทลงถาดเทเจล (gel tray) ที่มีหัวเสียบเจล (sample combs) เพื่อทำให้เกิดหลุมสำหรับหยอดดีเอ็นเอ เมื่อเจลมีการแข็งตัวเรียบร้อยแล้ว ดึงหัวออกและนำไปใส่ลงในอ่างสำหรับรันเจล (chamber) ที่มี สารละลาย TBE buffer 1X อยู่ โดยบัฟเฟอร์นั้นจะมีปริมาตรท่วมผิวหน้าของแผ่นเจล จากนั้นจึง หยอดผลผลิตพีซีอาร์ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ที่ผสมกับ dye ความเข้มข้น 6X ปริมาตร 3 ไมโครลิตร ลงไปในหลุม เมื่อหยอดผลผลิตพีซีอาร์ครบทุกหลุม รวมทั้งดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 50 คู่เบส แล้ว ปลดสายกระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 50 โวลต์ เป็นระยะเวลาประมาณ 50-60 นาที นำแผ่นเจลไปย้อม ในสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นระยะเวลา 10 นาที แล้ว ล้างด้วยการแช่ในน้ำกลั่น เป็นระยะเวลา 10 นาที เพื่อล้างสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ส่วนเกินออก และนำไปวิเคราะห์ภาพเจลโดยใช้ชุดถ่ายภาพอะกาโรสเจล (gel documentary system) ที่ผ่าน เครื่องส่องแถบดีเอ็นเอ (UV transmission) เพื่อดูขนาดชิ้นดีเอ็นเอ และถ่ายรูปบันทึกผลการทดลอง

3.4.7 การทำให้ผลผลิตพีซีอาร์บริสุทธิ์

การทำให้ผลผลิตพีซีอาร์บริสุทธิ์ด้วยชุด GF-1 AmbiClean Kit (PCR & Gel): Vivantis ภายหลังจากการตรวจสอบแถบดีเอ็นเอของผลผลิตพีซีอาร์แล้ว การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากตำแหน่ง ยีน *CHD* ซึ่งตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมเพศ ดังนั้นจะเกิดผลผลิตพีซีอาร์ 2 อัลลีล คือ อัลลีล *CHD-Z* และอัลลีล *CHD-W* จะทำการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากดีเอ็นเอทั้ง 2 อัลลีล โดยใน กรณีต้องการเฉพาะอัลลีล *CHD-W* ให้นำผลผลิตพีซีอาร์มาแยกขนาดด้วยเทคนิคอะกาโรส เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส เมื่อการตรวจสอบแถบดีเอ็นเอโดยใช้ UV transilluminator แล้ว ใช้ใบมีดตัด เจลอะกาโรสบริเวณมีแถบดีเอ็นเอที่ต้องการขณะที่ทำการส่องแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำเจลไปซังน้ำหนัก โดยต้องชั่งน้ำหนักหลอดทดลองที่ใช้ไว้ ก่อน แล้วคำนวณหาเฉพาะน้ำหนักเจล เติบบัฟเฟอร์ DB (buffer DB) ปริมาตร 1: 1 โดยปริมาตร (เจลอะกาโรสน้ำหนัก 0.1 กรัม ใช้ปริมาตร 100 ไมโครลิตร) โดยจะต้องให้บัฟเฟอร์ท่วมเจล นำไปบ่ม ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จนกว่าเจลอะกาโรสจะละลายเป็นเนื้อเดียวกันกับบัฟเฟอร์ หรือในกรณี ต้องการทำให้ผลผลิตพีซีอาร์ในหลอดทดลองบริสุทธิ์ เช่นหลังการตรวจสอบด้วยเทคนิคอะกาโรส เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแล้วพบว่าไม่มีแถบดีเอ็นเอ เฉพาะอัลลีล *CHD-Z* เพียงแถบเดียว โดยนำผลผลิตพีซี อาร์มาปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้มีปริมาตรเป็น 100 ไมโครลิตร เติม buffer DB ปริมาตร 1: 1 โดยปริมาตร และผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมา เมื่อสารละลายเป็นเนื้อเดียวกันแล้ว ดูด สารละลายที่ได้ใส่ลงในคอลัมน์ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 7,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสที่อยู่ในที่รองรับด้านล่างทิ้ง ใส่ wash buffer ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 7,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสที่อยู่ในที่รองรับ ด้านล่างทิ้ง นำคอลัมน์ไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็วรอบ 7,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เพื่อ กำจัดเอทานอลที่เป็นส่วนผสมของ wash buffer ออก เปลี่ยนคอลัมน์ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ แล้วเติม elution buffer หรือ TE buffer ปริมาตร 50 - 60 ไมโครลิตร โดยให้ท่วมแผ่นเมมเบรน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 2 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที จะได้สารละลายดีเอ็นเออยู่ในหลอดทดลองด้านล่าง ตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์หลังจากการทำให้บริสุทธิ์ ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ก่อนจะส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป

3.4.8 การศึกษาหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากลำดับนิวคลีโอไทด์

นำผลผลิตพีซีอาร์ดังกล่าว ส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท 1st BASE DNA Sequencing Division ประเทศมาเลเซีย นำผลข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์แต่ละตัวอย่างมาวิเคราะห์เปรียบเทียบหาความคล้ายคลึงผ่านโปรแกรม BLAST (Altschul และคณะ, 1990) เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank และจัดจำแนกกลุ่ม โดยใช้โปรแกรม BioEdit version 7.0.5.2 ในการตรวจสอบและแก้ไขความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาทำการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างตัวอย่างแบบ multiple alignment ด้วยโปรแกรม ClustalX version 1.83 และสร้างแผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมตามวิธี neighbor-joining กำหนดค่า bootstrapping คือ 1000 ครั้ง โดยใช้โปรแกรม Mega 6 (Tamura และคณะ, 2013)

บทที่ 4

ผล และอภิปรายผลการทดลอง

4.1 แหล่งที่มาและตัวอย่างนกในสกุลหัวโตเล็ก

จากการเก็บตัวอย่างนกในสกุลหัวโตเล็ก (Genus *Charadrius*) ด้วยวิธีทอส่งตาข่ายจาก 3 พื้นที่ ได้แก่บริเวณนาเกลือสมุทรณิรัตน์ ตำบลบางหญ้าแพรก จังหวัดสมุทรสาคร, บริเวณแหลมผักเบี้ย ตำบลแหลมผักเบี้ย จังหวัดเพชรบุรี และบริเวณปากแม่น้ำกั้นตัง ตำบลกั้นตัง จังหวัดตรัง ในช่วงฤดูอพยพของนกมาประเทศไทย ระหว่างเดือนกันยายน - พฤศจิกายน พ.ศ. 2556 เก็บตัวอย่างนกสกุลหัวโตเล็กได้ทั้งหมด 5 สปีชีส์ มีรายละเอียดดังนี้

4.1.1 นกหัวโตทรายเล็ก (*Charadrius mongolus*)

นกหัวโตทรายเล็กเป็นนกขนาดเล็ก ปากมีสีดำ ขาและนิ้วสีดำ จะอพยพมาประเทศไทย ช่วงนอกฤดูผสมพันธุ์ที่มีลักษณะขนคลุมลำตัวด้านบนสีน้ำตาลอมเทา ขนคลุมหน้าผากจะมีสีน้ำตาลอ่อน และมีขีดคล้ายคิ้วสีขาวลากเหนือตาไปถึงตอนบนของขนคลุมหู มีแถบสีน้ำตาลลากจากโคนปาก ลากผ่านใต้ตาไปจนถึงขนคลุมหู หน้าอกมีแถบคาดอกสีน้ำตาล แต่ไม่ต่อกันตรงกลาง ด้านล่างใต้คอถึงอกตอนบน และท้องลงไปจนถึงขนคลุมใต้หางสีขาว ปีกมีสีน้ำตาลเทา แต่ขนปลายปีกจะมีสีดำ ช่วงนอกฤดูผสมพันธุ์มีลักษณะรูปร่างและสีขนคล้ายกับนกหัวโตทรายใหญ่ ต่างกันในส่วนของความยาวปากจะสั้นและเล็กกว่า ดังแสดงในรูปที่ 4.1 สามารถพบนกนี้ได้บ่อยและมีปริมาณมาก



รูปที่ 4.1 แสดงลักษณะของนกหัวโตทรายเล็ก (*Charadrius mongolus*)

ภาพโดย: ณิชภัทร ขอบอารณ์

4.1.2 นกหัวโตทรายใหญ่ (*Charadrius leschenaultii*)

นกหัวโตทรายใหญ่เป็นนกขนาดเล็ก ปากมีสีดำ ขาและนิ้วสีเทา จะอพยพมาประเทศไทย ช่วงนอกฤดูผสมพันธุ์ที่มีลักษณะขนคลุมลำตัวด้านบนสีน้ำตาลอมเทา ขนคลุมหน้าผากจะมีสีน้ำตาลอ่อน และมีขีดคล้ายคิ้วสีขาวลากเหนือตาไปถึงตอนบนของขนคลุมหู มีแถบสีน้ำตาลลากจากโคนปาก ลากผ่านใต้ตาไปจนถึงขนคลุมหู หน้าอกมีแถบคาดอกสีน้ำตาล แต่ไม่ต่อกันตรงกลาง ด้านล่างใต้คอถึง

เอกสารนี้เป็นเอกสารหลังพิมพ์ในเล่มสำหรับแจกจ่ายเท่านั้น เมื่ออยู่ใต้เห็นไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ออกตอนบน และท้องลงไปจนถึงขนคลุมใต้หางสีขาว ปีกมีสีน้ำตาลเทา แต่ขนปลายปีกจะมีสีดำ แสดงดังรูปที่ 4.2 นกหัวโตทรายใหญ่อาศัยอยู่ตามชายเลนและชายหาด อาจอยู่ร่วมกับนกชนิดเดียวกันหรือต่างชนิดกัน พบบ่อยและมีปริมาณมาก



รูปที่ 4.2 แสดงลักษณะของนกหัวโตทรายใหญ่ (*Charadrius leschenaultii*)

ภาพโดย: ณิชภัทร ขอบอาภรณ์

4.1.3 นกหัวโตชาดำ (*Charadrius alexandrinus*)

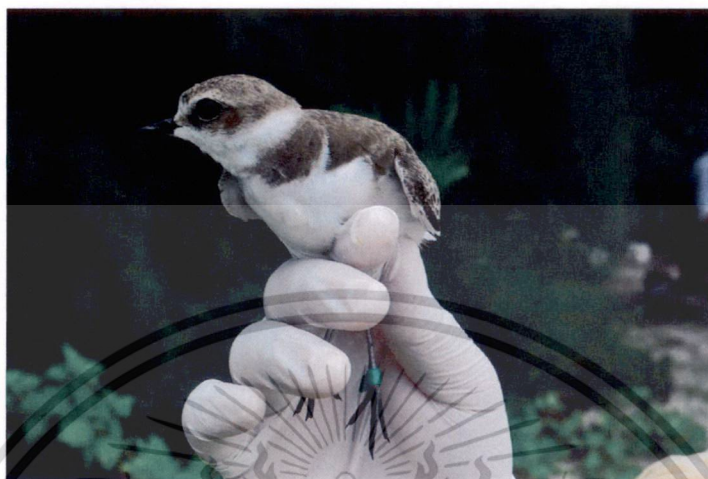
นกหัวโตชาดำเป็นนกขนาดเล็กมาก (15 ซม.) แตกต่างจากนกหัวโตอื่นๆ ตรงที่มีขนาดเล็ก หลังโค้ง ลำตัวบนสีจางกว่า ออกไม่มีแถบสี ปากสีดำ ขาและนิ้วเท้ามีสีเทาเข้ม มีวงรอบคอขาวแต่สั้น ช่วงนอกฤดูผสมพันธุ์กระหม่อมและส่วนที่เป็นสีดำจะเป็นสีน้ำตาล ดังรูปที่ 4.3 ตัวเมียและตัวผู้เต็มวัยจะมีลักษณะคล้ายกับตัวผู้ช่วงนอกฤดูผสมพันธุ์ นกหัวโตชาดำเป็นนกที่อยู่ตามชายเลนและชายหาด เป็นนกอพยพที่มายังประเทศไทยช่วงนอกฤดูผสมพันธุ์ พบบ่อยและมีปริมาณปานกลาง โอภาส (2543) รายงานว่าทั่วโลกมี 6 สปีชีส์ย่อย ประเทศไทยพบ 2 สปีชีส์ย่อย คือ นกหัวโตชาดำ (*C. alexandrinus alexandrines*) และนกหัวโตหน้าขาว (*Charadrius alexandrinus dealbatus*)

4.1.4 นกหัวโตหน้าขาว (*Charadrius alexandrinus dealbatus*)

นกหัวโตหน้าขาวลักษณะใกล้เคียงกับนกหัวโตชาดำ แต่ขนาดเล็กกว่าและลำตัวด้านบนสีจางกว่า สีขาวที่หน้าผากกว้าง หัวตาขาว คิ้วและใบหน้าขาว คาดตาสีน้ำตาลจางๆ หรือไม่มี ลำตัวด้านล่างสีขาว ขาสีน้ำตาลอมชมพูจางๆ ฤดูผสมพันธุ์ ตัวผู้มีกระหม่อมสีส้มแกมน้ำตาล ปากจะหนากว่าหัวโตชาดำและโคนปากกลางเหลือเล็กน้อย ดังรูปที่ 4.4 ซึ่ง Kupper (2009) รายงานว่านกหัวโตชาดำ สามารถแบ่งกลุ่มได้ 2 กลุ่มใหญ่ คือกลุ่ม Snowy ที่อาศัยอยู่บริเวณทางตอนเหนือและใต้ของทวีปอเมริกา ประกอบไปด้วย 3 สปีชีส์ย่อย คือ *C. alexandrinus nivosus*, *C. alexandrinus tenuirostris* และ *C. alexandrinus occidentalis* และกลุ่ม Kentish ที่อาศัยอยู่บริเวณทวีปยุโรปและเอเชีย หรือเรียกว่าทวีปยูเรเชีย ประกอบไปด้วย 3 สปีชีส์ย่อย คือ *C. alexandrinus alexandrinus*, *C. alexandrinus dealbatus* และ *C. alexandrinus seebohmi* นอกจากนี้หลายการศึกษาพบว่า *C. alexandrinus* เป็น superspecies กับ *C. marginatus*, *C. ruficapillus*,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

C. javanicus และ *C. peronii* เนื่องจากมีความใกล้เคียงกันมาก ซึ่งอาจเรียกรวมกันว่า *C. alexandrinus* complex (Rheindt และคณะ, 2011)



รูปที่ 4.3 แสดงลักษณะของนกหัวโตสีดำ (*Charadrius alexandrinus*)
ภาพโดย: ณิชภัทร ขอบอภรณ์



รูปที่ 4.4 แสดงลักษณะของนกหัวโตหน้าขาว (*Charadrius alexandrinus dealbatus*)
ภาพโดย: ณิชภัทร ขอบอภรณ์

4.1.5 นกหัวโตมลายู (*Charadrius peronii*)

นกหัวโตมลายูซึ่งเป็นนกขนาดเล็ก เป็นนกที่พบอยู่โดดเดี่ยวหรือเป็นคู่ ไม่อยู่รวมกับนกหัวโตเล็กชนิดอื่นๆ อาศัยอยู่ตามหาดทรายบริเวณชายฝั่งทะเล ในประเทศไทยพบว่าเป็นนกประจำถิ่น มีปริมาณปานกลางตามชายทะเลทุกภาค ลักษณะหน้าผากสีดำ คิ้วขาว กระหม่อมสีน้ำตาลแดง อยู่ในกลุ่มมีรอบคอขาว หลังมีแถบสีดำคาลงมาถึงอก และขาสีเนื้อ ดังรูปที่ 4.5 ตัวเมียสีสันทคล้ายตัวผู้มาก เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.5 แสดงลักษณะของนกหัวโตมลายู (*Charadrius peronii*)

ภาพโดย: ณิชภัทร ขอบอภรณ์

ในการศึกษาครั้งนี้สามารถเก็บตัวอย่างนกสกุลหัวโตเล็กได้ทั้งหมดจำนวน 177 ตัวอย่าง แบ่งเป็น นกหัวโตทรายเล็ก (*C. mongolus*) จำนวน 114 ตัว นกหัวโตทรายใหญ่ (*C. leschenaultii*) จำนวน 41 ตัว นกหัวโตขาดำ (*C. alexandrinus*) จำนวน 18 ตัว นกหัวโตหน้าขาว (*C. alexandrinus dealbatus*) จำนวน 3 ตัว และนกหัวโตมลายู (*C. peronii*) จำนวน 1 ตัว แสดงรายละเอียดตัวอย่างที่เก็บได้ในแต่ละพื้นที่ดังตารางที่ 4.1 ในการเลือกศึกษาใน 3 พื้นที่นี้เนื่องจากเป็นพื้นที่ที่นกชายเลนเป็นจำนวนมากมาพักอาศัยอยู่เป็นประจำในช่วงฤดูอพยพ เพราะเป็นพื้นที่ที่เป็นแหล่งอาหารของนก และมีพื้นที่สำหรับพักในช่วงน้ำทะเลขึ้นสูง (ศิริ สอนสา และคณะ, 2553) แต่อย่างไรก็ตามบริเวณแหลมผักเบี้ย จังหวัดเพชรบุรี เป็นนาเกลือที่มีพื้นที่กว้างทำให้มีการกระจายของนก เป็นสาเหตุทำให้เก็บตัวอย่างได้จำนวนน้อยกว่า 2 พื้นที่ สำหรับบริเวณปากแม่น้ำกันตัง จังหวัดตรัง สามารถดักจับนกได้ถึง 5 สปีชีส์ และในการศึกษาครั้งนี้สปีชีส์ที่สามารถเก็บตัวอย่างได้มากที่สุด คือ นกหัวโตทรายเล็ก และตัวอย่างนกที่เก็บได้น้อยที่สุด คือ นกหัวโตมลายู ซึ่งสอดคล้องกับ โอภาส (2543) ที่ได้รายงานไว้ว่านกหัวโตทรายเล็กเป็นนกอพยพที่พบบ่อยและมีปริมาณมาก มีการดำรงชีวิตโดยรวมกันอยู่เป็นฝูง และมีการรวมกลุ่มอยู่กับนกสปีชีส์อื่นๆ โดยอาศัยอยู่ทั้งบริเวณที่เป็นพื้นที่ชายเลนและชายหาด ซึ่งพบได้ทั้ง 3 พื้นที่ที่ทำการศึกษา จึงสามารถสุ่มจับนกสปีชีส์นี้ได้จำนวนมาก ซึ่งแตกต่างจากนกหัวโตมลายูที่เก็บตัวอย่างได้น้อย เนื่องจากเป็นนกที่มีการดำรงชีวิตแบบอยู่โดดเดี่ยวหรือเป็นคู่ ไม่รวมกับนกสปีชีส์อื่นๆ และจะอาศัยอยู่ตามชายหาดทราย ซึ่งในงานวิจัยนี้พบได้น้อยเพียง 1 ตัวอย่าง จากพื้นที่เก็บตัวอย่างจังหวัดตรังที่มีสภาพพื้นที่เป็นแบบหาดทราย และในงานวิจัยนี้สามารถเก็บตัวอย่างได้เพียง 4 สปีชีส์ และ 1 สปีชีส์ย่อย คือ นกหัวโตหน้าขาว จากที่มีรายงานไว้ว่านกสกุลหัวโตเล็กในประเทศไทยพบ 8 สปีชีส์ (โอภาส, 2543) ส่วนอีก 4 สปีชีส์ที่ไม่สามารถเก็บตัวอย่างได้ คือ นกหัวโตปากยาว (*C. placidus*) นกหัวโตขาสีส้ม (*C. hiaticula*) และนกหัวโตขาขาว (*C. veredus*) ซึ่งในประเทศไทยพบในจำนวนน้อย และนกหัวโตขาเหลือง (*C. dubius*) ที่พบในประเทศไทยในปริมาณมาก แต่ไม่สามารถเก็บตัวอย่างได้ด้วยวิธีทอส่งตาข่าย เพราะมีการดำรงชีวิตแบบอยู่โดดเดี่ยวหรือเป็นคู่ จึงดักจับได้ยากกว่านกที่มีการรวมกลุ่มเป็นฝูง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 แสดงจำนวนตัวอย่างของนกแต่ละสปีชีส์ในสกุลหัวโตเล็ก จากการเก็บตัวอย่าง 3 พื้นที่

Common name (Scientific name)	Locations and numbers of bird			Total
	Samut Sakhon Province	Phetchaburi Province	Trang Province	
1. นกหัวโตทรายเล็ก (<i>C. mongolus</i>)	62	17	35	114
2. นกหัวโตทรายใหญ่ (<i>C. leschenaultii</i>)	13	1	27	41
3. นกหัวโตชาดำ (<i>C. alexandrinus</i>)	-	-	18	18
4. นกหัวโตหน้าขาว (<i>C. alexandrinus dealbatus</i>)	-	-	3	3
5. นกหัวโตมลายู (<i>C. peronii</i>)	-	-	1	1
Sum	75	18	84	177

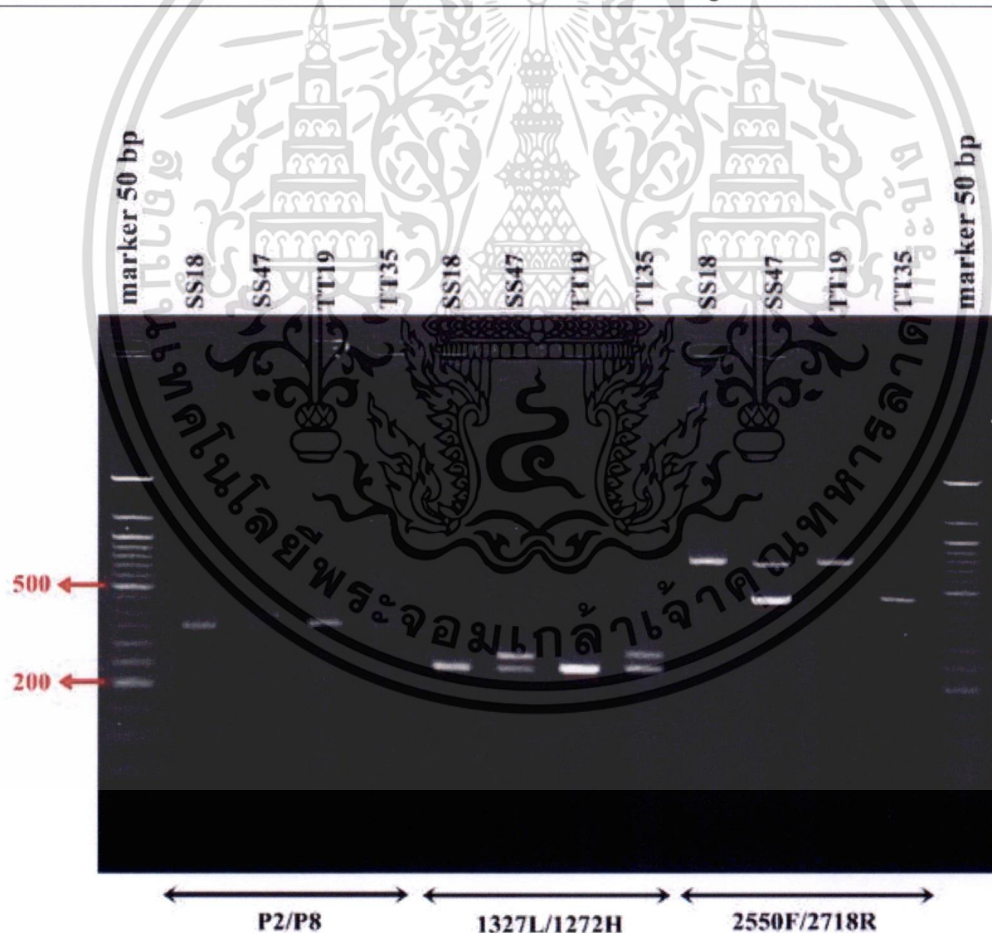
4.2 การระบุเพศนกสกุลนกหัวโตเล็ก

4.2.1 ไพร์เมอร์ที่เหมาะสมในการระบุเพศนกสกุลหัวโตเล็ก

การระบุเพศนกโดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในตำแหน่งยีน *CHD* (*Chromo-helicase-DNA binding protein*) ในขั้นตอนแรกจะทำการระบุเพศนกหัวโตทรายเล็กและนกหัวโตทรายใหญ่ เนื่องจากเป็นตัวอย่างที่สามารถเก็บได้ในช่วงแรกของการเก็บตัวอย่าง และเพื่อการศึกษาเบื้องต้นในการหาไพร์เมอร์ที่เหมาะสมในการระบุเพศนกในสกุลหัวโตเล็ก การระบุเพศนกจะทำการเพิ่มปริมาณยีน *CHD* ด้วยการใส่ไพร์เมอร์ 3 คู่ ได้แก่ ไพร์เมอร์ P2/P8, 1237L/1272H และ 2550F/2718R ที่เป็นไพร์เมอร์ universal ในการหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในแต่ละไพร์เมอร์ พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในช่วง annealing คือ 56, 54 และ 50 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.2 เมื่อนำผลผลิตพีซีอาร์ไปวิเคราะห์ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสโดยใช้เจลอะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์ พบว่าไพร์เมอร์ทั้ง 3 คู่ สามารถใช้ในการระบุเพศนกในสกุลนี้ได้ โดยนกเพศผู้เกิดขึ้นดีเอ็นเอ 1 แถบ จากอัลลีล *CHD-Z* นกเพศเมียเกิดขึ้นดีเอ็นเอ 2 แถบ จากอัลลีล *CHD-Z* และ *CHD-W* ดังรูปที่ 4.6

ตารางที่ 4.2 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ และอุณหภูมิ annealing ของไพรเมอร์แต่ละชนิดที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในตำแหน่งยีน *CHD* ที่นำมาใช้ในการระบุเพศนก

Primers	Nucleotide sequence	Source	Annealing temperature
P2	5'-TCTGCATCGCTAAATCCTTT-3'	Griffiths et al.,	56 °C
P8	5'-CTCCCAAGGATGAGRAAYTG-3'	1998	
1237L	5'-GAGAAACTGTGCAAAACAG-3'	Kahn et al.,	54 °C
1272H	5'-TCCAGAATATCTTCTGCTCC-3'	1998	
2550F	5'-GTTACTGATTCTGCTACGAGA-3'	Fridolfsson and	50 °C
2718R	5'-ATTGAAATGATCCAGTGCTTG-3'	Ellegren, 1999	



รูปที่ 4.6 แสดงผลการวิเคราะห์ผลผลิตพีซีอาร์ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (เจลอะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์) จากการระบุเพศนกสกุลหัวโตเล็กด้วยไพรเมอร์ 3 คู่ ได้แก่ ไพรเมอร์ P2/P8 (ช่อง 2-5) 1237L/1272H (ช่อง 6-9) และไพรเมอร์ 2550F/2718R (ช่อง 10-13) เปรียบเทียบกับ Marker DNA 50 คู่เบส (ช่อง 1 และ 14) (M คือ เพศผู้ และ F คือ เพศเมีย)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการวิเคราะห์ผลผลิตพีซีอาร์ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส ที่ความเข้มข้นอะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์ โดยไพรเมอร์ทั้ง 3 คู่ ให้ขนาดขัณฑ์เอ็นเอของอัลลิล *CHD-Z* และ *CHD-W* ที่แตกต่างกัน ดังนี้ ไพรเมอร์ P2/P8 อัลลิล *CHD-Z* ให้ขนาดขัณฑ์เอ็นเอประมาณ 350 คู่เบส และอัลลิล *CHD-W* ให้ขนาดขัณฑ์เอ็นเอประมาณ 400 คู่เบส ไพรเมอร์ 1237L/1272H ให้ขนาดขัณฑ์เอ็นเอของอัลลิล *CHD-Z* ประมาณ 250 คู่เบส และขนาดขัณฑ์เอ็นเอของอัลลิล *CHD-W* ประมาณ 300 คู่เบส โดยทั้ง ไพรเมอร์ P2/P8 และ 1237L/1272H ให้ขัณฑ์เอ็นเอของอัลลิล *CHD-Z* และ *CHD-W* ที่มีขนาดขัณฑ์เอ็นเอแตกต่างกันประมาณ 50 คู่เบส และขนาดขัณฑ์เอ็นเอของอัลลิล *CHD-Z* มีขนาดสั้นกว่าอัลลิล *CHD-W* สำหรับไพรเมอร์ 2550F/2718R ให้อัลลิล *CHD-Z* ที่มีขนาดขัณฑ์เอ็นเอ 650 คู่เบส และอัลลิล *CHD-W* มีขนาดขัณฑ์เอ็นเอ 450 คู่เบส ความแตกต่างของขัณฑ์เอ็นเอของอัลลิล *CHD-Z* และ *CHD-W* เท่ากับ 200 คู่เบส และขนาดขัณฑ์เอ็นเออัลลิล *CHD-Z* มีขนาดยาวกว่าอัลลิล *CHD-W* ซึ่งไพรเมอร์ 2550F/2718R เหมาะสมในการระบุเพศนกในสกุลหัวโตเล็ก เนื่องจากสามารถแยกความแตกต่างของนกเพศผู้และเพศเมียได้ดีที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับ Wakisaka และคณะ (2006) ที่ศึกษานกกระแตหัวสีเทา (*Vanellus cinereus*) ซึ่งเป็นนกสกุลใกล้เคียงกับนกสกุลหัวโตเล็ก ที่ระบุเพศโดยใช้ไพรเมอร์ 2550F/2718R พบว่านกเพศผู้เกิด 1 แถบ ขนาดขัณฑ์เอ็นเอ 600 คู่เบส (*CHD-Z*) เพศเมียเกิด 2 แถบ ขนาดขัณฑ์เอ็นเอ 600 และ 450 คู่เบส (*CHD-Z* และ *CHD-W*) ซึ่งอัลลิล *CHD-Z* และ *CHD-W* มีขนาดขัณฑ์เอ็นเอแตกต่างกันประมาณ 150 คู่เบส และสอดคล้องกับ Cheng และคณะ (2006) ที่ระบุเพศนกปากช้อนหน้าดำ (*Platalea minor*) ซึ่งเป็นนกน้ำประจำถิ่นของเอเชียด้วยไพรเมอร์ 2550F/2718R พบว่าอัลลิล *CHD-Z* มีขนาดขัณฑ์เอ็นเอ 600 คู่เบส และอัลลิล *CHD-W* มีขนาดขัณฑ์เอ็นเอ 450 คู่เบส ซึ่งมีความแตกต่างของขัณฑ์เอ็นเอประมาณ 150 คู่เบส เช่นกัน นอกจากนี้แล้วจากการทดลองพบว่าไพรเมอร์ 2550F/2718R สามารถแยกความแตกต่างระหว่างเพศผู้และเพศเมียได้ชัดเจนมากกว่าการใช้ไพรเมอร์ P2/P8 ให้ผลสอดคล้องกับงานวิจัยของ Vucicevic และคณะ (2012) ที่ศึกษาจากตัวอย่างนกจำนวน 58 สปีชีส์ พบว่าไพรเมอร์ 2550F/2718R สามารถระบุเพศนกได้ดีกว่าไพรเมอร์ P2/P8 โดยไพรเมอร์ 2550F/2718R สามารถระบุเพศนกได้ 50 สปีชีส์ และทำให้อัลลิล *CHD-Z* และ *CHD-W* มีขนาดขัณฑ์เอ็นเอแตกต่างกันอย่างชัดเจน โดยจากการระบุเพศนกได้ทั้งหมด 50 สปีชีส์ จะให้ความแตกต่างของขนาดอัลลิล *CHD-Z* และ *CHD-W* อยู่ในช่วง 150 - 250 คู่เบส ซึ่งสามารถแยกความแตกต่างขัณฑ์เอ็นเอด้วยวิธีเจลอะกาโรสอิเล็กโทรโฟรีซิส

จากผลการทดลองการระบุเพศนกด้วยไพรเมอร์ P2/P8 และไพรเมอร์ 1237L/1272H ให้ความแตกต่างขัณฑ์เอ็นเอระหว่างอัลลิล *CHD-Z* และ *CHD-W* ที่เท่ากัน คือ 50 คู่เบส และพบว่าอัลลิล *CHD-Z* มีขนาดสั้นกว่าอัลลิล *CHD-W* ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับ Jensen และคณะ (2003) ที่ระบุเพศนกทั้งหมด 47 สปีชีส์ โดยใช้ไพรเมอร์ 2 คู่ คือไพรเมอร์ P2/P8 และไพรเมอร์ 1237L/1272H พบว่าให้ความแตกต่างของขนาดขัณฑ์เอ็นเอระหว่างอัลลิล *CHD-Z* และ *CHD-W* ที่เท่ากัน เช่นการระบุเพศในนกแก้วหัวสีม่วง (*Psittacula cyanocephala*) พบผลผลิตพีซีอาร์จากการเพิ่มปริมาณยีน *CHD* โดยใช้ไพรเมอร์ P2/P8 ให้ขนาดขัณฑ์เอ็นเอ 370 คู่เบส (*CHD-Z*) และ 410 คู่เบส (*CHD-W*) ส่วนไพรเมอร์ 1237L/1272H ให้ขนาดขัณฑ์เอ็นเอ 260 คู่เบส (*CHD-Z*) และ 300 คู่เบส (*CHD-W*) การใช้ไพรเมอร์ 2 คู่นี้ ให้ความแตกต่างของขนาดขัณฑ์เอ็นเอที่เท่ากัน คือ 40 คู่เบส และให้ขนาดขัณฑ์เอ็นเอของอัลลิล *CHD-Z* สั้นกว่าอัลลิล *CHD-W* แต่อย่างไรก็ตาม Jensen และ

คณะ (2003) พบว่าไพรเมอร์ P2/P8 สามารถใช้ในการระบุเพศได้ดีกว่า เนื่องจากมีความจำเพาะกับ ยีน CHD มากกว่า

ในการแยกความแตกต่างของชนิดเอ็นเอระหว่างอัลลีล CHD-Z และ CHD-W อาจทำให้เกิด ปัญหาในกรณีที่ขนาดชนิดเอ็นเอมีความแตกต่างกันน้อย ดังเช่นจากงานวิจัยของ Watson และคณะ (2004) ที่ระบุเพศนกกินหอยปากแดง (*Haematopus ostralegus*) ด้วยไพรเมอร์ P2/P8 พบว่าอัลลีล CHD-Z มีขนาดชนิดเอ็นเอ 380 คู่เบส อัลลีล CHD-W มีขนาดชนิดเอ็นเอ 400 คู่เบส โดยมีขนาด ชนิดเอ็นเอที่แตกต่างกันเพียง 20 คู่เบส จากการระบุเพศด้วยไพรเมอร์ P2/P8 ซึ่งอาจจะเป็นปัญหา ในการแยกความแตกต่างของขนาดชนิดเอ็นเอระหว่างเพศผู้และเพศเมียด้วยวิธีเจลอะกาโรสอิเล็กโตรโฟรีซิส เมื่อ Conway และคณะ (2014) ศึกษาการแยกเพศนกหัวโตขาดำ (*C. alexandrinus*) ซึ่งเป็นนกในสกุลหัวโตเล็ก พบว่าอัลลีล CHD-Z และ CHD-W มีขนาดชนิดเอ็นเอแตกต่างกันไม่เกิน 15 คู่เบส ซึ่งไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างเพศผู้และเพศเมียได้ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส จึงปรับเปลี่ยนโดยใช้เจลอะคริลาไมด์ในการแยกความแตกต่างชนิดเอ็นเอและได้ประยุกต์การใช้เทคนิค Capillary electrophoresis ในการวิเคราะห์ความแตกต่างของชนิดเอ็นเอได้ดียิ่งขึ้น นกบางสปีชีส์มีขนาดชนิดเอ็นเอของอัลลีล CHD-Z และ CHD-W ที่เท่ากัน เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธีเจลอะกาโรสอิเล็กโตรโฟรีซิส นกเพศผู้และเพศเมียจะเกิดดีเอ็นเอเพียง 1 แถบ จึงไม่สามารถระบุเพศได้ จำเป็นต้องตรวจสอบหรือแก้ไข ดังเช่นการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะเพื่อช่วยแยกความแตกต่างของชนิดเอ็นเอ โดยเอนไซม์ที่นิยมใช้ได้แก่ เอนไซม์ *HaellI* ที่มีบริเวณตัดจำเพาะบนอัลลีล CHD-Z และเอนไซม์ *Asp700I* ที่มีบริเวณตัดจำเพาะบนอัลลีล CHD-W ดังเช่นงานวิจัยที่ระบุเพศนกในนกเหยี่ยว นิวส์ัน (*Circaetus gallicus*) (Sacchi และคณะ, 2004) นกแร้งเครา (*Gypaetus barbatus*) (Garcia และคณะ, 2008) และนกแพนกวินฮัมโบลด์ (*Spheniscus humboldti*) (Costantini และคณะ, 2008) เป็นต้น

การใช้ไพรเมอร์ชนิดต่างๆในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในตำแหน่งยีน CHD จะให้ขนาดผลผลิตพีซีอาร์ที่แตกต่างกันนั้นขึ้นอยู่กับวิธีการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับตำแหน่งบนยีน CHD และความจำเพาะของไพรเมอร์ในแต่ละสปีชีส์ ดังนั้นการเลือกใช้ไพรเมอร์จึงเป็นสิ่งสำคัญในการระบุเพศนก อีกหนึ่งปัจจัยที่สำคัญคือความแตกต่างขนาดชนิดเอ็นเอของอัลลีล CHD-Z และ CHD-W จำเป็นต้องมีความแตกต่างกันชัดเจน เพื่อระบุเพศนกได้อย่างถูกต้อง (Wang และคณะ, 2007) การใช้ไพรเมอร์หลายชุดเพื่อป้องกันข้อผิดพลาดที่เกิดขึ้นในการระบุเพศนก ซึ่งตรงกับคำแนะนำของ Casey และคณะ (2009) ที่พบปัญหาจากการระบุเพศนก *Bartramia longicauda* โดยพบว่าอัลลีล CHD-Z เกิดลักษณะ polymorphisms ทำให้ผลการวิเคราะห์ผลผลิตพีซีอาร์ผิดพลาด ซึ่งโดยปกติ นกเพศผู้จะเกิดชนิดเอ็นเอเพียงหนึ่งขนาดและเมื่อนำมาวิเคราะห์ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส จะปรากฏเพียง 1 แถบ แต่ให้ผล 2 แถบ ในเป็นเพศเมีย แต่เนื่องจากเพศผู้เกิด heteroduplex ของอัลลีล CHD-Z ที่เบสบางตำแหน่งเกิดการหายไป ทำให้เพศผู้เกิดชนิดเอ็นเอมากกว่าหนึ่งชิ้นส่งผลต่อการระบุเพศผิดพลาดขึ้น ดังนั้นควรมีการหาไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการระบุเพศนกในแต่ละสปีชีส์ ก่อนการวิจัย เช่นการศึกษาจาก universal primers ที่สามารถนำมาใช้ในการระบุเพศนก ได้แก่ P2/P8 (Griffiths et al., 1998), 1237L/1272H (Kahn et al., 1998) และ 2550F/2718R (Fridolfsson and Ellegren, 1999)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.2 ผลการระบุเพศนกสกุลหัวโตเล็ก

การระบุเพศนกโดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในตำแหน่งยีน *CHD* ในงานวิจัยนี้เลือกใช้ไพรเมอร์ 2550F/2718R ในการระบุเพศนกสกุลนกหัวโตเล็ก เนื่องจากสามารถแยกความแตกต่างชนิดดีเอ็นเอของนกเพศผู้และเพศเมียได้อย่างชัดเจนมากที่สุด คือให้ชนิดดีเอ็นเอของอัลลีล *CHD-Z* และ *CHD-W* แตกต่างกันประมาณ 200 คู่เบส โดยผลจากการระบุเพศนกสามารถระบุเพศนกสกุลหัวโตเล็กทั้งหมด 5 สปีชีส์ ได้แก่ นกหัวโตทรายเล็ก (*C. mongolus*) นกหัวโตทรายใหญ่ (*C. leschenaultii*) นกหัวโตชาดำ (*C. alexandrinus*) นกหัวโตหน้าขาว (*C. alexandrinus dealbatus*) และนกหัวโตมลายู (*C. peronii*) โดยผลจากการแยกขนาดชนิดดีเอ็นเอด้วยวิธีเจลอะกาโรสอิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่านกเพศผู้เกิดชนิดดีเอ็นเอ 1 แถบ ที่มีขนาด 650 คู่เบส (*CHD-Z*) เพศเมียเกิดชนิดดีเอ็นเอ 2 แถบ ที่มีขนาด 650 และ 450 คู่เบส (*CHD-Z* และ *CHD-W*) ซึ่งนกทั้ง 5 สปีชีส์ มีขนาดชนิดดีเอ็นเอของอัลลีล *CHD-Z* และ *CHD-W* ที่ไม่แตกต่างกัน ดังรูปที่ 4.7



รูปที่ 4.7 แสดงผลการระบุเพศนกโดยใช้ไพรเมอร์ 2550F/2718R ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสที่ความเข้มข้นของอะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์ ของนกจำนวน 5 สปีชีส์ ได้แก่ นกหัวโตทรายเล็ก (*C. mongolus*) (ช่อง 2-5) นกหัวโตทรายใหญ่ (*C. leschenaultii*) (ช่อง 6-9) นกหัวโตชาดำ (*C. alexandrinus*) (ช่อง 10-12) นกหัวโตหน้าขาว (*C. a. dealbatus*) (ช่อง 13-15) นกหัวโตมลายู (*C. peronii*) (ช่อง 16) และ marker DNA 50 คู่เบส (ช่อง 1 และ 17)

จากผลการระบุเพศนกสกุลหัวโตเล็กจากตัวอย่างที่เก็บได้ทั้ง 3 จังหวัดในปี พ.ศ. 2556 จำนวนทั้งหมด 177 ตัว สามารถระบุเพศนกได้ 174 ตัว ได้เป็นเพศผู้ 111 เพศเมีย 63 ตัว ซึ่งรายละเอียดของผลการระบุเพศนกในสกุลหัวโตเล็กแสดงดังตารางที่ 4.3 จากตารางพบว่านกหัวโตทรายเล็กจากจังหวัดสมุทรสาครและเพชรบุรีมีอัตราส่วนนกเพศผู้มากกว่านกเพศเมีย โดยจังหวัดสมุทรสาครและจังหวัดเพชรบุรีมีอัตราส่วนเพศผู้ต่อเพศเมียเท่ากับ 3:1 และ 16:1 ตามลำดับ ซึ่งเมื่อเทียบกับผลการระบุเพศนกหัวโตทรายเล็กที่เก็บตัวอย่างได้จากจังหวัดตรังพบอัตราส่วนนกเพศผู้ต่อเพศเมียในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน โดยอัตราส่วนเพศผู้ต่อเพศเมียเท่ากับ 1:1 ส่วนอัตราส่วนเพศของนกสปีชีส์อื่นจากตัวอย่างที่เก็บได้ทั้ง 3 จังหวัด มีจำนวนน้อยมาก โดยเฉพาะตัวอย่างที่เก็บจากจังหวัดเพชรบุรี จึงไม่สามารถนำมาวิเคราะห์หาอัตราส่วนเพศได้ จากข้อมูลอัตราส่วนระหว่างเพศเป็นเพียงแนวโน้มที่จะศึกษาอัตราส่วนเพศของนกต่อความสัมพันธ์ทางนิเวศวิทยาของนก เช่น การกระจายตัวของนกอพยพในแต่ละพื้นที่ ลักษณะทางสัณฐานของนก และพฤติกรรมการรวมกลุ่มและการหากิน เนื่องจากบริเวณที่เก็บตัวอย่างในจังหวัดสมุทรสาครส่วนใหญ่เป็นพื้นที่นาเกลือ ซึ่งแตกต่างจากตัวอย่างที่เก็บในจังหวัดตรังซึ่งเป็นพื้นที่หาดทราย โดยทั้งสองบริเวณมีความแตกต่างกัน ข้อมูลอัตราส่วนเพศของนกอพยพและการกระจายตัวของนกอพยพในเส้นทางอพยพเอเชียตะวันออกเฉียง-ออสเตรเลียยังมีข้อมูลน้อย ซึ่งจากการรายงานของ Nebel (2007) พบว่าเพศอาจจะส่งผลต่อระยะทางการบินอพยพของนก จากข้อมูลนกชายเลนอพยพในประเทศออสเตรเลียพบว่านกชายเลนปากโค้ง (*Calidris ferruginea*) เพศผู้จะบินอพยพได้ไกลกว่าเพศเมีย ส่วนนกอีก้อยสะโพกสีน้ำตาล (*Numenius madagascariensis*) เพศเมียจะอพยพได้ไกลกว่าเพศผู้ แต่ข้อมูลยังมีจำนวนน้อยไม่สามารถสนับสนุนสมมติฐานนี้ได้ จำเป็นต้องศึกษาและเก็บข้อมูลเพิ่มเติม ดังนั้นผลจากการศึกษาในงานวิจัยนี้จึงเป็นแนวทางในการศึกษาอัตราส่วนเพศนกเพิ่มเติม เพื่อเป็นข้อมูลประชากรนกอพยพในช่วงนอกฤดูผสมพันธุ์ สามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลด้านเพศของประชากรนกอพยพ และเป็นข้อมูลในการใช้หาความสัมพันธ์กับลักษณะทางสัณฐานวิทยานกของสถานีวิจัยสัตว์ป่าบึงบอระเพ็ด กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพันธุ์พืชต่อไป

จากผลการระบุเพศนกในสกุลหัวโตเล็กที่เก็บตัวอย่างได้จำนวนทั้งหมด 177 ตัว สามารถระบุเพศนกได้ 114 ตัว และไม่สามารถระบุเพศนกได้ 3 ตัว คิดเป็น 1.7 เปอร์เซ็นต์ อาจเนื่องจากปัญหาในการเก็บตัวอย่างเลือดที่มีปริมาณเลือดมากเกินไป ทำให้ไม่สามารถกำจัดเศษเซลล์หรือส่วนประกอบของเลือดที่รบกวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้หมด ซึ่งไพรเมอร์ไม่สามารถเข้าไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้จากประสบการณ์ในการเก็บตัวอย่างควรเก็บเลือดลงกระดาษ FTA ปริมาณเพียง 20-50 ไมโครลิตร โดยทำการซับหรือป้ายหยุดเลือดให้กระจายทั่วกระดาษ โดยไม่ให้ซึมผ่านกระดาษ FTA อีกด้านเพื่อให้ปริมาณเลือดกับสาร lysis ที่เคลือบบนผิวกระดาษ FTA ทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ เมื่อนำกระดาษ FTA ที่มีตัวอย่างมาทำให้บริสุทธิ์ จะสามารถกำจัดเศษเซลล์และส่วนประกอบของเลือดให้ออกได้ง่ายขึ้น

ตารางที่ 4.3 แสดงผลการระบุเพศนกในตำแหน่งยืน CHD ด้วยไพรเมอร์ 2550F/2718R ในสกุลหัวโตเล็กจำนวน 5 สปีชีส์ จากการเก็บตัวอย่าง 3 พื้นที่

Common name	Species	Locations and numbers of bird					
		Samut Sakhon		Phetchaburi		Trang	
		Province		Province		Province	
		F	M	F	M	F	M
Lesser Sand Plover	<i>C. mongolus</i>	14	48	1	16	18	17
Greater Sand Plover	<i>C. leschenaultii</i>	5	5	1	-	13	14
Kentish Plover	<i>C. alexandrinus</i>	-	-	-	-	10	8
White-faced Plover	<i>C. alexandrinus dealbatus</i>	-	-	-	-	1	2
Malaysian Plover	<i>C. peronii</i>	-	-	-	-	-	1

4.3 ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งยืน CHD

4.3.1 การยืนยันความถูกต้องในการระบุเพศนก

จากผลการระบุเพศนกในสกุลหัวโตเล็ก โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในตำแหน่งยืน CHD ด้วยไพรเมอร์ 2550F/2718R เมื่อสุ่มเลือกตัวอย่างนกมาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งอัลลีล CHD-Z และ CHD-W เพื่อใช้ยืนยันความถูกต้องในการระบุเพศนก และการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยวิเคราะห์ตัวอย่างอัลลีล CHD-W จากนกทั้งหมด 4 สปีชีส์ ได้แก่ นกหัวโตทรายเล็ก นกหัวโตทรายใหญ่ นกหัวโตชาดำ และนกหัวโตหน้าขาว อย่างละ 1 ตัวอย่าง ยกเว้นนกหัวโตมลายู เนื่องจากเก็บตัวอย่างได้เพียง 1 ตัวอย่างและเป็นนกเพศผู้ อัลลีล CHD-Z จากนกทั้งหมด 5 สปีชีส์ ได้แก่ นกหัวโตทรายเล็ก นกหัวโตทรายใหญ่ นกหัวโตชาดำ นกหัวโตหน้าขาว และนกหัวโตมลายู โดยการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของ CHD-Z และ CHD-W ไปวิเคราะห์เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank ใน NCBI ซึ่งผลการวิเคราะห์พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของ CHD-Z ในนกสกุลหัวโตเล็กทุกสปีชีส์ตรงกับข้อมูล CHD-Z ของนกสปีชีส์ *Charadrius morinellus* (AY178113) มากที่สุด ซึ่งเป็นนกในสกุลเดียวกัน โดยมีความคล้ายคลึงกับนกหัวโตทรายใหญ่มากที่สุด มีค่า identity เท่ากับ 95 เปอร์เซ็นต์ E-Value เท่ากับ 0 และผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ CHD-W ตรงกับข้อมูล CHD-W ของนกกระสาขาวตะวันออก (*Ciconia boyciana*) (EU814915) มากที่สุด โดยมีความคล้ายคลึงกับนกหัวโตทรายเล็กและนกหัวโตชาดำ และมีค่า identity เท่ากับ 95 เปอร์เซ็นต์ E-Value เท่ากับ 0 ดังนั้นผลการจากเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank ขึ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการระบุเพศนกในสกุลหัวโตเล็กโดยใช้ไพรเมอร์ 2550F/2718R ในงานวิจัยนี้เป็นอัลลีลของ CHD-Z และ CHD-W ทำให้มีความเชื่อมั่นในการระบุเพศนกกว่าถูกต้องและแม่นยำ

4.3.2 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างอัลลีล *CHD-Z* และ *CHD-W*

การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างอัลลีล *CHD-Z* และ *CHD-W* ของนกสกุลหัวโตเล็กเพื่อหาความแตกต่างระหว่างอัลลีล *CHD-Z* และ *CHD-W* ซึ่งเป็นอัลลีลที่ใช้ในการระบุเพศและแยกความแตกต่างระหว่างเพศผู้และเพศเมีย โดยศึกษาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของอัลลีล *CHD-Z* ในนกสกุลหัวโตเล็ก 5 สปีชีส์ ได้แก่ นกหัวโตทรายเล็ก นกหัวโตทรายใหญ่ นกหัวโตชาดำ นกหัวโตหน้าขาว และนกหัวโตมลายู ส่วนลำดับนิวคลีโอไทด์ของอัลลีล *CHD-W* จำนวน 4 สปีชีส์ ได้แก่ นกหัวโตทรายเล็ก นกหัวโตทรายใหญ่ นกหัวโตชาดำ และนกหัวโตหน้าขาว โดยไม่ได้นำนกหัวโตมลายูมาวิเคราะห์เนื่องจากมีตัวอย่างเพียง 1 ตัว ซึ่งเป็นนกเพศผู้ โดยในการวิเคราะห์และจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของอัลลีล *CHD-Z* และ *CHD-W* ด้วยโปรแกรม BioEdit สามารถหาตำแหน่งจับของไพรเมอร์ 2550F/2718R ได้ ซึ่งแสดงตำแหน่งการจับดังรูปที่ 4.8 และสามารถทราบขนาดที่แน่นอนของลำดับนิวคลีโอไทด์อัลลีล *CHD-Z* และ *CHD-W* ของนกแต่ละสปีชีส์ได้ โดยรวมลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์แล้ว พบว่านกหัวโตทรายเล็กและนกหัวโตทรายใหญ่มีลำดับนิวคลีโอไทด์อัลลีล *CHD-Z* มีความยาวเท่ากัน คือ 634 คู่เบส นกหัวโตชาดำ นกหัวโตหน้าขาว และนกหัวโตมลายูมีลำดับนิวคลีโอไทด์ยาวเท่ากัน คือ 621 คู่เบส และลำดับนิวคลีโอไทด์อัลลีล *CHD-W* ของนกทุกสปีชีส์ (ไม่ได้วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของอัลลีล *CHD-W* ของนกหัวโตมลายู) มีความยาวเท่ากัน คือ 458 คู่เบส และเมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างอัลลีล *CHD-Z* และ *CHD-W* พบว่านกหัวโตทรายเล็กและนกหัวโตทรายใหญ่มีความยาวของอัลลีล *CHD-Z* และ *CHD-W* แตกต่างกัน 176 คู่เบส แต่นกหัวโตชาดำ และนกหัวโตหน้าขาวมีความยาวของอัลลีล *CHD-Z* และ *CHD-W* แตกต่างกัน 163 คู่เบส โดยจากการตรวจสอบขนาดผลผลิตพีซีอาร์ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส ที่เจลอะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์ ให้อัลลีล *CHD-Z* ที่มีขนาดขึ้นดีเอ็นเอ 650 คู่เบส และอัลลีล *CHD-W* มีขนาดขึ้นดีเอ็นเอ 450 คู่เบส มีความแตกต่างของขึ้นดีเอ็นเอของอัลลีล *CHD-Z* และ *CHD-W* ประมาณ 200 คู่เบส และขนาดขึ้นดีเอ็นเออัลลีล *CHD-Z* มีขนาดยาวกว่าอัลลีล *CHD-W* ซึ่งแนวโน้มข้อแตกต่างในนกหัวโตมลายูน่าจะเป็นเช่นเดียวกันกับนกหัวโตชาดำและนกหัวโตหน้าขาว

ผลจากการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์อัลลีล *CHD-Z* และ *CHD-W* พบว่าสามารถหาตำแหน่งอินทรอน (intron) ของอัลลีล *CHD-Z* และ *CHD-W* ของนกสกุลหัวโตเล็กได้ โดยอัลลีล *CHD-Z* ของนกหัวโตทรายเล็กและนกหัวโตทรายใหญ่พบอินทรอนแทรกอยู่ระหว่างแอกซอนในช่วงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 113-577 และของนกหัวโตชาดำ นกหัวโตหน้าขาว และนกหัวโตมลายู มีช่วงอินทรอนแทรกอยู่ในช่วงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 113-564 สำหรับอัลลีล *CHD-W* ของนกในสกุลหัวโตเล็กทุกสปีชีส์มีอินทรอนอยู่ในตำแหน่งเดียวกัน โดยแทรกในช่วงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 113-401 ซึ่งรูปแบบอินทรอนของอัลลีล *CHD-Z* และ *CHD-W* ในงานวิจัยนี้ตรงตามทฤษฎีรูปแบบอินทรอนที่พบในสัตว์มีกระดูกสันหลังทั่วไปที่รายงานว่ารูปแบบลำดับนิวคลีโอไทด์ของอินทรอนจะต่อจากปลายแอกซอนที่ลงท้ายด้วยเบส AG จุดเริ่มต้นปลาย 5' ของอินทรอนจะขึ้นต้นด้วยเบส GU หรือ GT และปลาย 3' ของอินทรอนจะเริ่มต้นด้วยกลุ่มเบสไพริมิดีนประมาณ 10 เบสแล้วลงท้ายด้วยเบส AG (Rogers และ Wall, 1980) รูปแบบอินทรอนของอัลลีล *CHD-Z* และ *CHD-W* แสดงดังรูปที่ 4.9

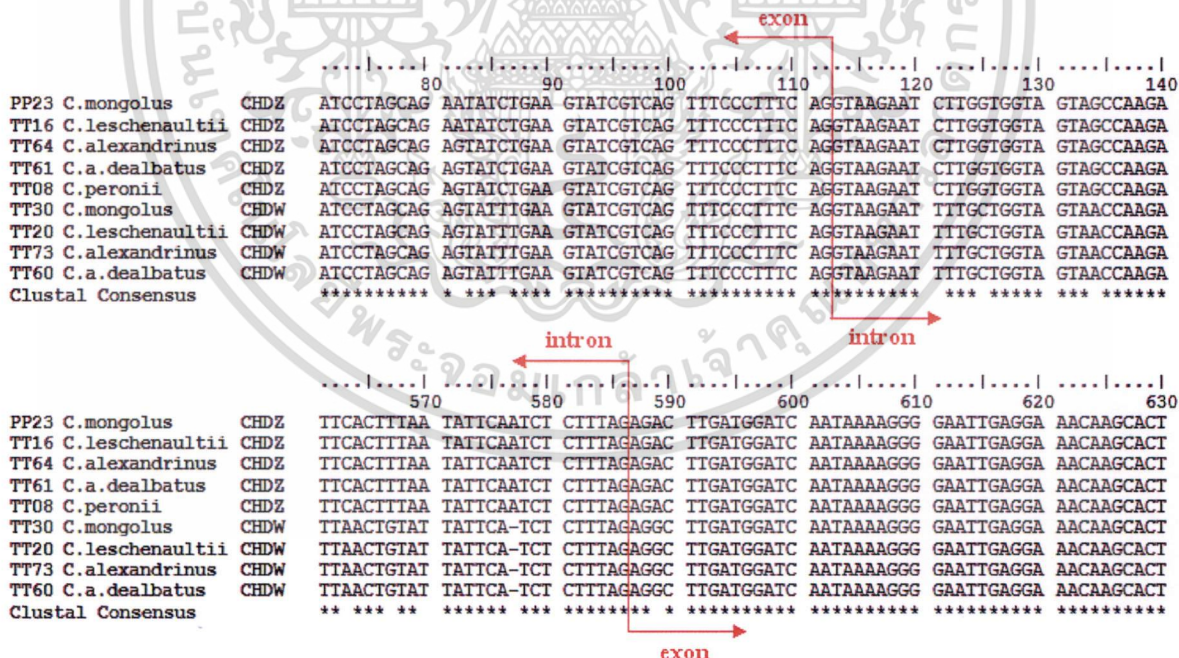
PP23 <i>C. mongolus</i>	CHDZ	GTTACTGATT	CGTCTACGAGA	ACGTGGCAAC	CAGAGT	TCTGATTT	CTCACAGAT	GGTGAG
TT16 <i>C. leschenaultii</i>	CHDZ	GTTACTGATT	CGTCTACGAGA	ACGTGGCAAC	CAGAGT	TCTGATTT	CTCACAGAT	GGTGAG
TT64 <i>C. alexandrinus</i>	CHDZ	GTTACTGATT	CGTCTACGAGA	ACGTGGCAAC	CAGAGT	TCTGATTT	CTCACAGAT	GGTGAG
TT61 <i>C. a. dealbatus</i>	CHDZ	GTTACTGATT	CGTCTACGAGA	ACGTGGCAAC	CAGAGT	TCTGATTT	CTCACAGAT	GGTGAG
TT08 <i>C. peronii</i>	CHDZ	GTTACTGATT	CGTCTACGAGA	ACGTGGCAAC	CAGAGT	TCTGATTT	CTCACAGAT	GGTGAG
TT30 <i>C. mongolus</i>	CHDW	GTTACTGATT	CGTCTACGAGA	ACGTGGCAAC	CAGAGT	ACTGATTT	CTTAGAT	GGTGAG
TT20 <i>C. leschenaultii</i>	CHDW	GTTACTGATT	CGTCTACGAGA	ACGTGGCAAC	CAGAGT	ACTGATTT	CTTAGAT	GGTGAG
TT73 <i>C. alexandrinus</i>	CHDW	GTTACTGATT	CGTCTACGAGA	ACGTGGCAAC	CAGAGT	ACTGATTT	CTTAGAT	GGTGAG
TT60 <i>C. a. dealbatus</i>	CHDW	GTTACTGATT	CGTCTACGAGA	ACGTGGCAAC	CAGAGT	ACTGATTT	CTTAGAT	GGTGAG
Clustal Consensus		*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****

primer 2550F

PP23 <i>C. mongolus</i>	CHDZ	AATAAAAGG	GAATTGAG	N(531)	GAAACAAGC	ACTGGATC	ATTTC	CAAT
TT16 <i>C. leschenaultii</i>	CHDZ	AATAAAAGG	GAATTGAG	N(531)	GAAACAAGC	ACTGGATC	ATTTC	CAAT
TT64 <i>C. alexandrinus</i>	CHDZ	AATAAAAGG	GAATTGAG	N(518)	GAAACAAGC	ACTGGATC	ATTTC	CAAT
TT61 <i>C. a. dealbatus</i>	CHDZ	AATAAAAGG	GAATTGAG	N(518)	GAAACAAGC	ACTGGATC	ATTTC	CAAT
TT08 <i>C. peronii</i>	CHDZ	AATAAAAGG	GAATTGAG	N(518)	GAAACAAGC	ACTGGATC	ATTTC	CAAT
TT30 <i>C. mongolus</i>	CHDW	AATAAAAGG	GAATTGAG	N(355)	GAAACAAGC	ACTGGATC	ATTTC	CAAT
TT20 <i>C. leschenaultii</i>	CHDW	AATAAAAGG	GAATTGAG	N(355)	GAAACAAGC	ACTGGATC	ATTTC	CAAT
TT73 <i>C. alexandrinus</i>	CHDW	AATAAAAGG	GAATTGAG	N(355)	GAAACAAGC	ACTGGATC	ATTTC	CAAT
TT60 <i>C. a. dealbatus</i>	CHDW	AATAAAAGG	GAATTGAG	N(355)	GAAACAAGC	ACTGGATC	ATTTC	CAAT
Clustal Consensus		*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****

primer 2718R

รูปที่ 4.8 แสดงตำแหน่งการจับของไพรเมอร์ 2550F/2718R บนลำดับนิวคลีโอไทด์ของอัลลีล CHD-Z และ CHD-W ในนกสกุลหัวโตเล็ก



รูปที่ 4.9 แสดงตำแหน่งอินทรอน (intron) ของอัลลีล CHD-Z และ CHD-W ในนกสกุลหัวโตเล็ก

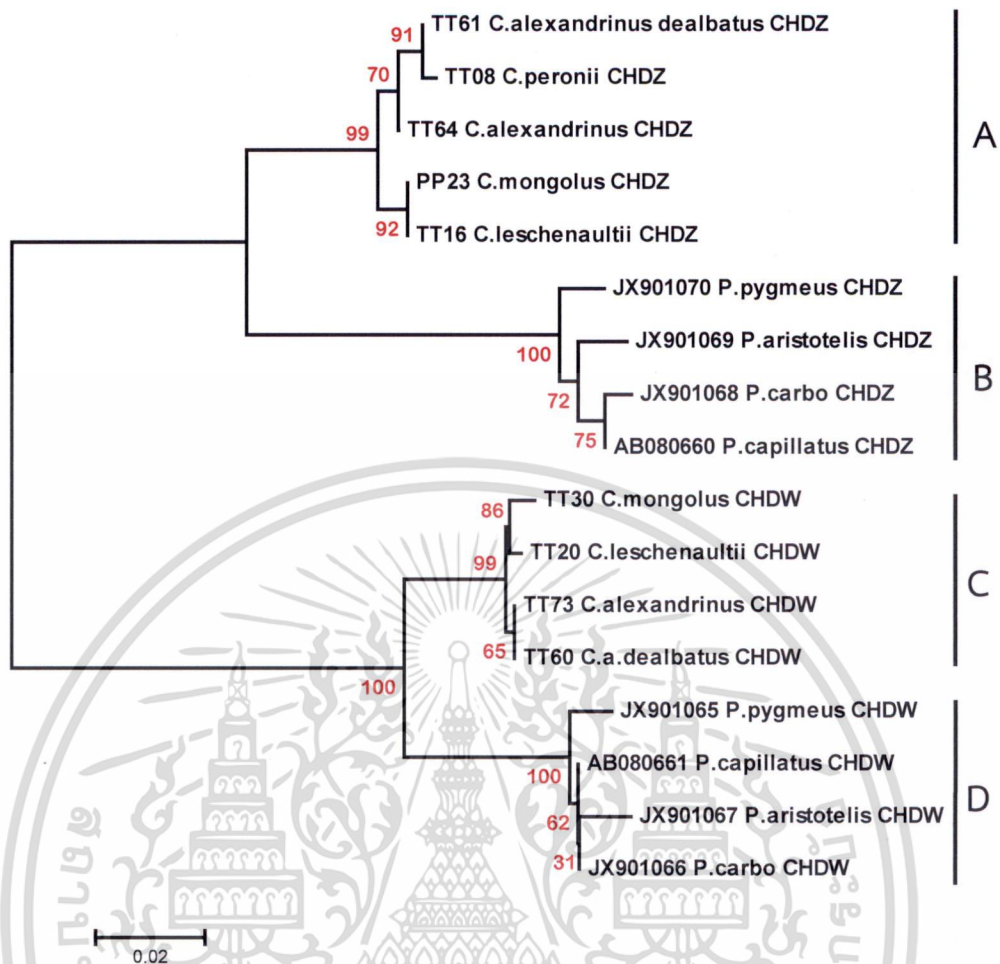
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของอัลลีล *CHD-Z* ของนกสกุลหัวโตเล็ก 5 สปีชีส์ ได้แก่ นกหัวโตทรายเล็ก นกหัวโตทรายใหญ่ นกหัวโตชาดำ นกหัวโตหน้าขาว และนกหัวโตมลายูอย่างละ 1 ตัวอย่าง และลำดับนิวคลีโอไทด์ของอัลลีล *CHD-W* ของนกสกุลหัวโตเล็ก 4 สปีชีส์ ได้แก่ นกหัวโตทรายเล็ก นกหัวโตทรายใหญ่ นกหัวโตชาดำ และนกหัวโตหน้าขาวอย่างละ 1 ตัวอย่าง เนื่องจากเก็บตัวอย่างนกหัวโตมลายูได้เพียง 1 ตัวอย่างและเป็นนกเพศผู้ร่วมกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของอัลลีล *CHD-Z* และ *CHD-W* ของนกนอกสกุล คือ สกุลนกกาน้ำ (Genus *Phalacrocorax*) จากฐานข้อมูล GenBank ได้แก่ accession number AB080661, JX901065, JX901066, JX901067, AB080660, JX901068, JX901069 และ JX901070 มาสร้าง phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม Mega 6.0 โดยใช้วิธี neighbor joining และใช้ค่า bootstrap เท่ากับ 1000 ผลจากวิเคราะห์ phylogenetic tree สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือกลุ่มที่เป็นอัลลีล *CHD-Z* (กลุ่ม A และกลุ่ม B) และกลุ่มที่เป็นอัลลีล *CHD-W* (กลุ่ม C และกลุ่ม D) หรือสามารถแบ่งเป็นกลุ่มย่อยได้ 4 กลุ่ม ซึ่งจะรวมกลุ่มกันตามชนิดของอัลลีลก่อนการแยกกลุ่มตามสปีชีส์ แสดงดังรูปที่ 4.10

4.3.3 ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของอัลลีล *CHD-W*

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของอัลลีล *CHD-W* ซึ่งพบได้เฉพาะนกเพศเมียเท่านั้น เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์อัลลีล *CHD-W* จำนวน 458 คู่เบส โดยสุ่มตัวอย่างนกสกุลหัวโตเล็ก 4 สปีชีส์ ได้แก่ นกหัวโตทรายเล็ก (*C. mongolus*) นกหัวโตทรายใหญ่ (*C. leschenaultii*) นกหัวโตชาดำ (*C. alexandrinus*) และนกหัวโตหน้าขาว (*C. alexandrinus dealbatus*) อย่างละ 1 ตัวอย่าง พบว่านกหัวโตทรายเล็กมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างจากนกสปีชีส์อื่นๆ 2 ตำแหน่ง คือตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 243 พบเบสอะดีนีน (A) แทนนิกอิก 3 สปีชีส์พบเบสกวานีน (G) และนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 346 นกหัวโตทรายเล็กพบเบสไทมีน (T) แต่นกอีก 3 สปีชีส์พบเบสกวานีน (G) อย่างไรก็ตามนกหัวโตชาดำและนกหัวโตหน้าขาวมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง 310 เป็นเบสไซโตซีน (C) ซึ่งแตกต่างจากนกหัวโตทรายเล็กและนกหัวโตทรายใหญ่ที่เป็นเบสไทมีน (T) ดังรูปที่ 4.11

เมื่อนำมาศึกษาหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยการสร้าง phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม Mega 6.0 วิเคราะห์ neighbor joining และมีค่า bootstrap เท่ากับ 1000 จากตัวอย่างนกสกุลหัวโตเล็กทั้ง 4 สปีชีส์ และลำดับนิวคลีโอไทด์ของอัลลีล *CHD-W* ของนกสกุลนกกาน้ำ (*Phalacrocorax*) จากฐานข้อมูล GenBank จำนวน 4 ตัวอย่าง ได้แก่ accession number AB080661, JX901065, JX901066 และ JX901067 สามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มตัวอย่างสกุลนกกาน้ำ และกลุ่มตัวอย่างนกสกุลหัวโตเล็กที่แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อย คือ กลุ่มย่อยนกหัวโตทรายเล็กและนกหัวโตทรายใหญ่ และกลุ่มย่อยนกหัวโตชาดำและนกหัวโตหน้าขาว ซึ่งจากข้อมูลดังกล่าวอาจกล่าวได้ว่านกหัวโตหน้าขาวและนกหัวโตชาดำมีลำดับนิวคลีโอไทด์ในอัลลีล *CHD-W* ไม่แตกต่างกัน แสดงดังรูปที่ 4.12

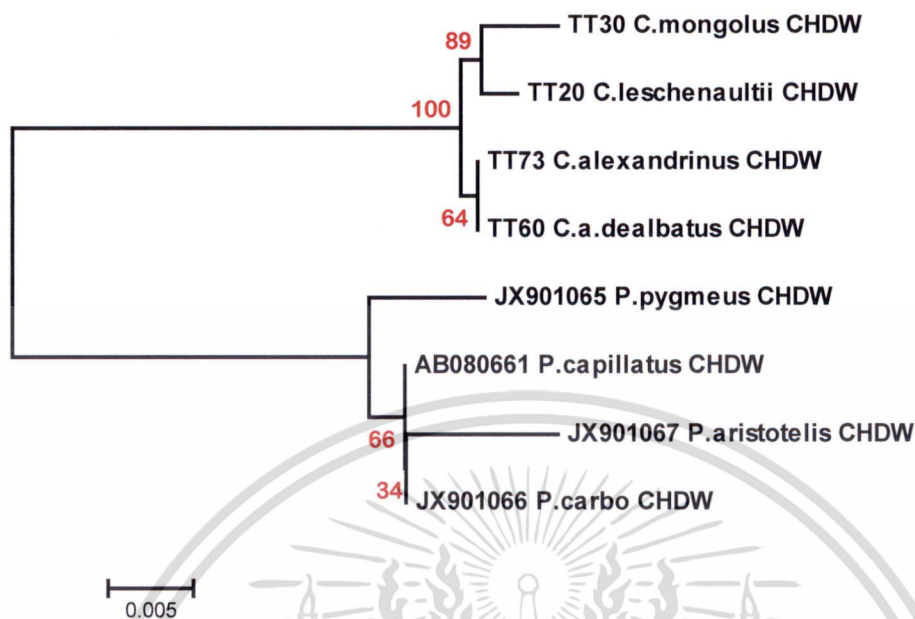


รูปที่ 4.10 แสดง phylogenetic tree จากลำดับนิวคลีโอไทด์ CHD-Z และ CHD-W ของตัวอย่างนกในสกุลหัวโตเล็ก (*Charadrius*) และสกุลนกกาหน้า (*Phalacrocorax*) ด้วยโปรแกรม Mega 6.0 โดยใช้วิธี neighbor joining และใช้ค่า bootstrap เท่ากับ 1000

		250	260	270	280	290	300
TT30 <i>C. mongolus</i>	CHDW	ATAC	AAATAGTATTTT	GAAATTA	AACTGATGA	AATTAGAAAGATGAAGT	GTTACATTACT
TT20 <i>C. leschenaultii</i>	CHDW	ATGCT	AAATAGTATTTT	GAAATTA	AACTGATGA	AATTAGAAAGATGAAGT	GTTACATTACT
TT73 <i>C. alexandrinus</i>	CHDW	ATGCT	AAATAGTATTTT	GAAATTA	AACTGATGA	AATTAGAAAGATGAAGT	GTTACATTACT
TT60 <i>C. a. dealbatus</i>	CHDW	ATGCT	AAATAGTATTTT	GAAATTA	AACTGATGA	AATTAGAAAGATGAAGT	GTTACATTACT
Clustal Consensus		*****	↑*****	*****	*****	*****	*****
		310	320	330	340	350	360
TT30 <i>C. mongolus</i>	CHDW	CTTATTTCT	CCCCCAATTG	TTTTGGCAATTG	AAGATTC	CAAGTTTCT	CCGATTAGAATA
TT20 <i>C. leschenaultii</i>	CHDW	CTTATTTCT	CCCCCAATTG	TTTTGGCAATTG	AAGATTC	CAAGTTTCT	CCGATTAGAATA
TT73 <i>C. alexandrinus</i>	CHDW	CTTATTTCT	CCCCCAATTG	TTTTGGCAATTG	AAGATTC	CAAGTTTCT	CCGATTAGAATA
TT60 <i>C. a. dealbatus</i>	CHDW	CTTATTTCT	CCCCCAATTG	TTTTGGCAATTG	AAGATTC	CAAGTTTCT	CCGATTAGAATA
Clustal Consensus		*****	*****	*****	*****	*****	*****

รูปที่ 4.11 แสดงการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของอัลลิล CHD-W ของนกสกุลหัวโตเล็ก โดยมีตำแหน่งที่แตกต่างกัน 3 ตำแหน่ง (ลูกศรชี้)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.12 แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างนกสกุลหัวโตเล็ก (*Charadrius*) และนกสกุลนกกาหน้า (*Phalacrocorax*) จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของอัลลีล *CHD-W* ด้วยโปรแกรม Mega 6.0 โดยใช้วิธี neighbor joining และใช้ค่า bootstrap เท่ากับ 1000

4.3.4 ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของอัลลีล *CHD-Z*

ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของอัลลีล *CHD-Z* ที่พบได้ทั้งในนกเพนกวินและนกเพนกวิน โดยการศึกษาตัวอย่างนกหัวโตเล็กทั้ง 5 สปีชีส์ รวมจำนวน 16 ตัวอย่าง ได้แก่ นกหัวโตทรายเล็ก (*C. mongolus*) จำนวน 7 ตัวอย่าง นกหัวโตทรายใหญ่ (*C. leschenaultii*) จำนวน 3 ตัวอย่าง นกหัวโตชาดำ (*C. alexandrinus*) จำนวน 3 ตัวอย่าง นกหัวโตหน้าขาว (*C. alexandrinus dealbatus*) จำนวน 2 ตัวอย่าง และนกหัวโตมลายู (*C. peronii*) จำนวน 1 ตัวอย่าง พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของนกทั้ง 5 สปีชีส์ มีความแตกต่างกัน 10 ตำแหน่ง และพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของนกหัวโตชาดำ นกหัวโตหน้าขาว และนกหัวโตมลายู หรือ *C. alexandrinus* complex มีตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 313-325 เกิดการเพิ่มหรือการหายไปของลำดับนิวคลีโอไทด์ (Indel) ไปจากนกหัวโตทรายเล็กและนกหัวโตทรายใหญ่ แสดงดังรูปที่ 4.13 ซึ่งจากการเปรียบเทียบนกทั้ง 3 สปีชีส์นี้ พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใกล้เคียงกันมาก โดยมีเพียง 2 ตำแหน่งที่แตกต่างกัน และเมื่อเปรียบเทียบเฉพาะนกหัวโตทรายเล็กและนกหัวโตทรายใหญ่ที่มีลักษณะสัณฐานที่ใกล้เคียงกัน พบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความใกล้เคียงกัน มีเพียง 2 ตำแหน่งที่มีความแตกต่างกัน คือ ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 201 นกหัวโตทรายเล็กพบเบสไทมีน (T) ส่วนนกหัวโตทรายใหญ่พบเบสไซโตซีน (C) และตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 313 นกหัวโตทรายเล็กพบเบสอะดีนีน (A) ส่วนนกหัวโตทรายใหญ่พบเบสกวานีน (G)

	290	300	310	320	330	340
SS37 <i>C. mongolus</i>	CTGAGTAGGAGAGTTAGAAAAGATGATCTCCAAAGGTC	CCCTCCCAACCTCAACTGTTTTGTATTATG				
PP23 <i>C. mongolus</i>	CTGAGTAGGAGAGTTAGAAAAGATGATCTCCAAAGGTC	CCCTCCCAACCTCAACTGTTTTGTATTATG				
PP25 <i>C. mongolus</i>	CTGAGTAGGAGAGTTAGAAAAGATGATCTCCAAAGGTC	CCCTCCCAACCTCAACTGTTTTGTATTATG				
PP26 <i>C. mongolus</i>	CTGAGTAGGAGAGTTAGAAAAGATGATCTCCAAAGGTC	CCCTCCCAACCTCAACTGTTTTGTATTATG				
PP28 <i>C. mongolus</i>	CTGAGTAGGAGAGTTAGAAAAGATGATCTCCAAAGGTC	CCCTCCCAACCTCAACTGTTTTGTATTATG				
PP29 <i>C. mongolus</i>	CTGAGTAGGAGAGTTAGAAAAGATGATCTCCAAAGGTC	CCCTCCCAACCTCAACTGTTTTGTATTATG				
TT46 <i>C. mongolus</i>	CTGAGTAGGAGAGTTAGAAAAGATGATCTCCAAAGGTC	CCCTCCCAACCTCAACTGTTTTGTATTATG				
SS71 <i>C. leschenaultii</i>	CTGAGTAGGAGAGTTAGAAAAGATGATCTCCAGAGGTC	CCCTCCCAACCTCAACTGTTTTGTATTATG				
TT16 <i>C. leschenaultii</i>	CTGAGTAGGAGAGTTAGAAAAGATGATCTCCAGAGGTC	CCCTCCCAACCTCAACTGTTTTGTATTATG				
TT15 <i>C. leschenaultii</i>	CTGAGTAGGAGAGTTAGAAAAGATGATCTCCAGAGGTC	CCCTCCCAACCTCAACTGTTTTGTATTATG				
TT64 <i>C. alexandrinus</i>	CTGAGTAGGAGAGTTAGAAAAGATGACCTCCA	ACCTCAACTGTTTTGTATTATG				
TT70 <i>C. alexandrinus</i>	CTGAGTAGGAGAGTTAGAAAAGATGACCTCCA	ACCTCAACTGTTTTGTATTATG				
TT71 <i>C. alexandrinus</i>	CTGAGTAGGAGAGTTAGAAAAGATGACCTCCA	ACCTCAACTGTTTTGTATTATG				
TT59 <i>C. a. dealbatus</i>	CTGAGTAGGAGAGTTAGAAAAGATGACCTCCA	ACCTCAACTGTTTTGTATTATG				
TT61 <i>C. a. dealbatus</i>	CTGAGTAGGAGAGTTAGAAAAGATGACCTCCA	ACCTCAACTGTTTTGTATTATG				
TT8 <i>C. peronii</i>	CTGAGTAGGAGAGTTAGAAAAGATGACCTCCA	ACCTCAACTGTTTTGTATTATG				
Clustal Consensus	*****	*****	*****	*****	*****	*****

รูปที่ 4.13 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของอัลลิล *CHD-Z* ที่เกิด Indel ในกลุ่ม *C. alexandrinus* complex เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์จากนกสกุลหัวโตเล็กจำนวน 5 สปีชีส์

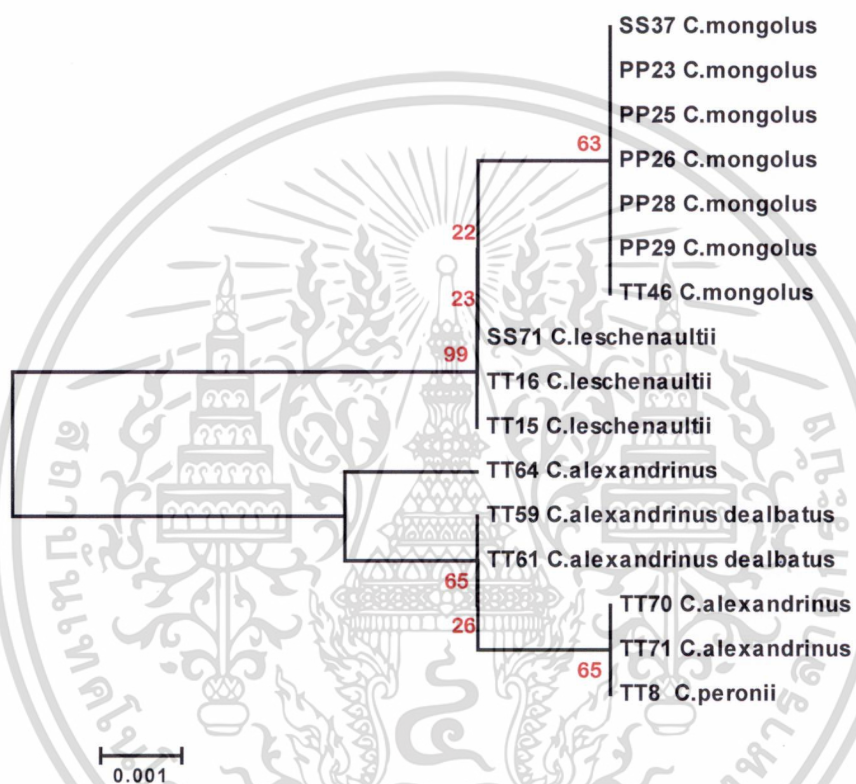
จากนั้นทำการหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ *CHD-Z* ของนกในสกุลหัวโตเล็กทั้ง 5 สปีชีส์จากตัวอย่างที่ได้กล่าวมาแล้ว นำไปสร้าง Phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม Mega 6.0 วิเคราะห์ Neighbor joining และ Bootstrap เท่ากับ 1000 ผลจากการวิเคราะห์ Phylogenetic tree สามารถแบ่งกลุ่มนกออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มนกหัวโตทราเยเล็ก (*C. mongolus*) และกลุ่มนกหัวโตทราเยใหญ่ (*C. leschenaultii*) ที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน แต่แยกกลุ่มระหว่างหัวโตทราเยเล็ก และหัวโตทราเยใหญ่อย่างชัดเจน แต่ไม่แสดงความสัมพันธ์กับพื้นที่ที่ใช้ในการเก็บตัวอย่าง แสดงดังรูปที่ 4.14 สำหรับอีกกลุ่มหนึ่งมีการรวมนก 3 สปีชีส์ไว้ด้วยกัน ได้แก่ นกหัวโตชาดำ (*C. alexandrinus*) นกหัวโตหน้าขาว (*C. alexandrinus dealbatus*) และนกหัวโตมลายู (*C. peronii*) ซึ่งมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน ดังนั้นทั้ง 3 สปีชีส์ ยังมีการรวมอยู่ในกลุ่มเดียวกันเป็นกลุ่ม *C. alexandrinus* complex โดยภาพรวมนกหัวโตชาดำแสดงความใกล้ชิดกับนกหัวโตมลายูมากกว่านกหัวโตหน้าขาว สอดคล้องกับงานวิจัยของ Rheindt และคณะ (2011) ที่พบว่านกหัวหน้าขาวเป็นสปีชีส์ย่อยของนกหัวโตชาดำ เนื่องจากมีการจัดกลุ่มปนอยู่ในกลุ่มนกหัวโตชาดำไม่แยกกลุ่มออกมาอย่างชัดเจน และพบว่านกหัวโตมลายูมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับนกหัวโตชาดำ

จากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง *CHD-Z* สามารถใช้ในการระบุสปีชีส์ได้เพียงอย่างเดียว ไม่สามารถวิเคราะห์ในระดับสปีชีส์ย่อยได้ หรือหาความสัมพันธ์ในความแตกต่างในระดับพื้นที่ได้ เนื่องจากเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีขนาดสั้นเพียง 621-634 คู่เบส จึงไม่สามารถหาความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ได้มากเพียงพอ และยีนตำแหน่ง *CHD* เป็นตำแหน่งยีนที่นิยมใช้ในการระบุเพศนก ซึ่งมีรายงานการเกิดความแปรผันของลำดับนิวคลีโอไทด์ในยีนตำแหน่งนี้ ดังเช่นงานวิจัยของ Lee และคณะ (2010) ที่ทำการระบุเพศนก 58 สปีชีส์โดยอาศัยยีน *CHD* พบว่าขนาดชิ้นดีเอ็นเอของยีน *CHD* มีความแตกต่างกันในแต่ละสปีชีส์ และพบความแปรผันของลำดับนิวคลีโอไทด์จากอัลลิล *CHD-Z* ในนกแต่ละสปีชีส์ 3 สปีชีส์ ได้แก่ *Alcippe morrisonia*, *Aegithalos concinnus* และ *Aegithalos nipalensis* จากงานวิจัยของ Chang และคณะ (2010) ทำการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของอัลลิล *CHD-Z* (293 คู่เบส) จากตัวอย่างนกในวงศ์ Pycnonotidae จำนวน 2 สายพันธุ์ คือ *Pycnonotus sinensis* (Chinese Bulbul) และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาค้นคว้า เปรียบเทียบหาประโยชน์ในการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Pycnonotus taivanus (Taiwan Bulbul) ที่มีการกระจายตัวอยู่ในประเทศไต้หวัน โดยเก็บตัวอย่างทั้งหมด 10 ตัว (สปีชีส์ละ 5 ตัว) เพื่อวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวนหนึ่งเบส หรือสโนปส์ (single nucleotide polymorphisms: SNPs) พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของอัลลีล *CHD-Z* มีการแปรผันของเบส 2 ตำแหน่ง โดยคิดเป็นความถี่การเกิดสโนปส์ทุกๆ 10 ตำแหน่ง ต่อ 1465 คู่เบส การเปลี่ยนแปลงคู่เบสของอัลลีล *CHD-Z* อยู่ในช่วง 0 ถึง 0.0034



รูปที่ 4.14 แสดง Phylogenetic tree ของนกสกุลหัวโตเล็ก จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของอัลลีล *CHD-Z* ด้วยโปรแกรม Mega 6.0 โดยใช้วิธี neighbor joining และใช้ค่า bootstrap เท่ากับ 1000 (SS เป็นตัวอย่างจากจังหวัดสมุทรสาคร PP เป็นตัวอย่างจากจังหวัดเพชรบุรี และ TT เป็นตัวอย่างจากจังหวัดตรัง)

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ

จากการเก็บตัวอย่างนกชายเลนอพยพสกุลหัวโตเล็ก (Genus *Charadrius*) ด้วยวิธีทอส่งตาข่าย จากบริเวณ 3 พื้นที่ ได้แก่ บริเวณนาเกลือสมุทรณิรัตน์ จังหวัดสมุทรสาคร บริเวณแหลมผักเบี้ย จังหวัดเพชรบุรี และบริเวณปากแม่น้ำกั้นตัง จังหวัดตรัง ในช่วงฤดูอพยพของนกมาประเทศไทย ระหว่างเดือนกันยายน-พฤศจิกายน พ.ศ. 2556 สามารถเก็บตัวอย่างนกสกุลหัวโตเล็กได้ทั้งหมด 177 ตัว แบ่งเป็น 5 สปีชีส์ ได้แก่ นกหัวโตทรายเล็ก (*C. mongolus*) จำนวน 114 ตัว นกหัวโตทรายใหญ่ (*C. leschenaultii*) จำนวน 41 ตัว นกหัวโตขาดำ (*C. alexandrinus*) จำนวน 18 ตัว นกหัวโตหน้าขาว (*C. alexandrinus dealbatus*) จำนวน 3 ตัว และนกหัวโตมลายู (*C. peronii*) จำนวน 1 ตัว โดยแบ่งเป็นจังหวัดสมุทรสาคร จังหวัดเพชรบุรี และจังหวัดตรัง อย่างละ 75, 18 และ 84 ตัว ตามลำดับ จากนั้นระบุเพศนกด้วยไพรมอร์ 3 คู่ พบว่าไพรมอร์ 2550F/2718R สามารถระบุเพศนกสกุลนกหัวโตเล็กได้ดีที่สุด เนื่องจากให้ขนาดอัลลีล *CHD-Z* และ *CHD-W* ที่มีขนาดแตกต่างกันประมาณ 163-176 คู่เบส ทำให้แยกความแตกต่างชนิดดีเอ็นเอของนกเพศผู้และเพศเมียได้อย่างชัดเจน และมีความถูกต้องแม่นยำ เนื่องจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *CHD-Z* และ *CHD-W* ในนกสกุลหัวโตเล็กตรงกับฐานข้อมูล และพบว่าอัลลีล *CHD-Z* และ *CHD-W* มีความจำเพาะกับนกในแต่ละสปีชีส์ การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์อัลลีล *CHD-W* (458 คู่เบส) จากนกสกุลหัวโตเล็ก 4 สปีชีส์ พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์แตกต่างกัน 3 ตำแหน่ง ส่วนการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ *CHD-Z* ของนกสกุลหัวโตเล็กทั้ง 5 สปีชีส์ พบว่ามีความแตกต่างกัน 10 ตำแหน่ง โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ *CHD-Z* ของนกหัวโตขาดำ นกหัวโตหน้าขาว และนกหัวโตมลายู นกทั้ง 3 สปีชีส์นี้มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายกัน โดยพบตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 313-325 ของนกสามสปีชีส์นี้เกิดการ indel ส่วนนกหัวโตทรายเล็กมีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายกับนกหัวโตทรายใหญ่ มีเพียง 2 ตำแหน่งที่แตกต่างกัน เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ *CHD-Z* ทั้ง 5 สปีชีส์ หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยสร้าง Phylogenetic tree สามารถแบ่งนกสกุลหัวโตเล็กออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ได้แก่ กลุ่มของนกหัวโตทรายเล็ก (*C. mongolus*) และนกหัวโตทรายใหญ่ (*C. leschenaultii*) ซึ่งแยกออกเป็น 2 กลุ่มย่อยตามสปีชีส์อย่างชัดเจน และกลุ่มของ *C. alexandrinus* complex ที่ประกอบด้วย 3 สปีชีส์ คือ นกหัวโตขาดำ (*C. alexandrinus*) นกหัวโตหน้าขาว (*C. alexandrinus dealbatus*) และนกหัวโตมลายู (*C. peronii*)

จากศึกษาวิจัยนี้สามารถระบุเพศและระบุสปีชีส์ของนกสกุลหัวโตเล็กด้วยเทคนิคระดับโมเลกุล และสามารถหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของนกในสกุลนี้ได้ เพื่อเป็นฐานข้อมูลประชากรนก ในการศึกษาประชากรนกอพยพและการศึกษาเส้นทางการอพยพของสกุลหัวโตเล็กต่อไป การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของนกสกุลหัวโตเล็ก พบว่าการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งยีน *CHD* สามารถศึกษาได้เพียงระดับสปีชีส์เท่านั้น ซึ่งไม่เพียงพอในการศึกษาระดับต่ำกว่าสปีชีส์ หรือสปีชีส์ย่อยจำเป็นต้องศึกษาตำแหน่งยีนอื่นๆเพิ่มมากขึ้น หรือใช้เทคนิคในระดับโมเลกุลในเชิงลึกเพื่อวิเคราะห์รายละเอียดทางพันธุกรรมได้มากขึ้น อีกทั้งจำเป็นต้องศึกษาข้อมูลลักษณะทางสัณฐานและนิเวศวิทยาเปรียบเทียบกับข้อมูลทางพันธุกรรม เพื่อหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและวิวัฒนาการได้ถูกต้องแม่นยำมากยิ่งขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

- ทิจู สอนสา ไกรรัตน์ เอี่ยมอำไพ และสมชาย นิ่มนวล. 2554. เทคนิคการจับนกด้วยท่อส่งตาข่าย (Cannon net) ในประเทศไทย. ผลงานวิจัยและรายงานความก้าวหน้างานวิจัยประจำปี ประจำปี 2553. กรุงเทพฯ : กลุ่มงานวิจัยสัตว์ป่า สำนักอนุรักษ์สัตว์ป่า กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช. 113-123.
- ทิจู สอนสา สมชาย นิ่มนวล ไกรรัตน์ เอี่ยมอำไพ ดวงรัตน์ โพธิ์เที่ยง กุลทิตา อิทธิพร และมงคล โมรา. 2554. การจับนกขายเลนติดเครื่องหมายเพื่อศึกษาเส้นทางการอพย โดยการใช้เทคนิคท่อส่งตาข่าย (Cannon netting) บริเวณพื้นที่ปากแม่น้ำท่าจีน จังหวัดสมุทรสาคร. ผลงานวิจัยและรายงานความก้าวหน้างานวิจัยประจำปี ประจำปี 2553. กรุงเทพฯ: กลุ่มงานวิจัยสัตว์ป่า สำนักอนุรักษ์สัตว์ป่า กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช. 125-135.
- วัลยา ชนิดดาววงศ์ และมงคล ไชยภักดี. 2548. นกอพยพในประเทศไทย (Migratory Birds of Thailand). ผลงานวิจัยและรายงานความก้าวหน้างานวิจัยประจำปี ประจำปี 2548. กรุงเทพฯ : กลุ่มงานวิจัยสัตว์ป่า สำนักอนุรักษ์สัตว์ป่า กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช. 207-233.
- สมิทธิ์ สุติบุตร. 2552. คู่มือจำแนกชนิดนกชายเลนและนกทะเล. พิมพ์ครั้งที่ 30. องค์การพื้นที่ชุ่มน้ำนานาชาติประจำประเทศไทย. 6-11.
- สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม ณิชากัทร ชอบอาหารณ์ ตฤณเศรษฐ์ วีระพันธุ์ นาสุดา พุทธารักษ์ และอนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม. 2012. การระบุเพศในนกแก้วบางชนิด. Thai Journal of Genetics. 5: 94-202.
- โอภาส ขอบเขตต์. 2543. นกในเมืองไทย เล่ม 3. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์สารคดีในนาม บริษัทวิริยะธุรกิจ จำกัด.
- Bermúdez-Humarán, L.G., García-García, A., Leal-Garza, C.H., Riojas-Váldez, V., Jaramillo-Rangel, G. and Montes-de-Oca-Luna, R. 2002. Molecular sexing of monomorphic endangered *Ara* birds. Journal of Experimental Zoology. 292: 677-680.
- Casey, A.E., Jones, K.L., Sandercock, B.K. and Wisely S.M. 2009. Heteroduplex molecules cause sexing errors in a standard molecular protocol for avian sexing. Molecular ecology resources. 9: 61-65.
- Cerit, H. and Avanus, K. 2007. Sex identification in avian species using DNA typing methods. World's poultry science journal. 63: 91-99.
- Cheng, Y.H., Kuo, T.F., Lee, D.N. and Weng C.F. 2006. Sex identification of the black faced spoonbill (*Platalea minor*). Zoological studies. 45: 104-113.
- Christian, P.D., Christidis, L. and Schodde, R. 1992. Biochemical systematics of the Charadriiformes (Shorebirds): relationships between the Charadrii, Scolopaci and Lari. Australian Journal of Zoology. 40: 291-302.
- Chu, P.C. 1995. Phylogenetic reanalysis of Strauch's osteological data set for the Charadriiformes. The Condor. 97: 174-196.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Oyler-McCance, S.J., John J. St., Knopf F.L. and Quinn, T.W. 2005. Population genetic analysis of Mountain Plover using mitochondrial DNA sequence data. *The Condor*. 107(2): 353-362.
- Rheindt, F.E., Szekely, T., Edwards, S.V., Lee, P.L.M., Burke, T., Kennerley, P.R., Bakewell, D.N., Alrashidi, M., Kosztolanyi, A., Weston, M.A., Liu, W.T., Lei, W.P., Shigeta, Y., Javed, S., Zefania, S. and Kupper, C. 2011. Conflict between genetic and phenotypic differentiation: the evolutionary history of a 'lost and rediscovered' shorebird. *Plos one*. 6: 1-9.
- Robertson, B.C., Minot, E.O. and Lambert, D.M. 1999. Molecular sexing of individual kakapo, *Strigops habroptilus* Aves, from faeces. *Mol Ecol* 8: 1349–1350.
- Rogers, J. and Wall, R. 1980. A mechanism for RNA splicing. *Proceedings of the national academy of sciences* . 77: 1877-1879.
- Sacchi, P., Soglia, D., Maione, S., Meneguz, G., Camporab, M. and Rasero, R. 2004. A non-invasive test for sex identification in short-toed eagle (*Circaetus gallicus*). *Molecular and cellular probes*. 18: 193-196.
- Smith, L.M. and Burgoyne, L.A. 2004. Collecting, archiving and processing DNA from wildlife samples using FTA databasing paper. *BMC ecology*. 4: 1-11.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. and Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular evolution genetics analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution*. 30: 2725-2729.
- Verkuil, Y.I., Piersma, T. and Baker, A.J. 2010. A novel mitochondrial gene order in shorebirds (Scolopacidae, Charadriiformes). *Molecular phylogenetics and evolution*. 57: 411-416.
- Vucicevic, M., Pavlovic, M.S., Stevanovic, J., Bosnjak, J., Gajic, B., Aleksic, N. and Stanimirovic, Z. 2012. Sex determination in 58 bird species and evaluation of *CHD* gene as a universal molecular marker in bird sexing. *Zoo biology*. 00: 1-13.
- Wang, L.C., Severinghaus, L.L., Chen, C.T., Liu, L.Y., Pan C.H., Huang D., Lee, H.Y., Lir, J.T., Chin, S.C., Pu, C.E. and Wang C.H. 2007. Sexing a wider range of avian species based on two *CHD1* introns with a unified reaction condition. *Zoo biology*. 26: 425-431.
- Watson, H.K., Mogg, R. J., Bond, J.M., and Durell, S.A. L. D. 2004. Sexing Eurasian Oystercatchers *Haematopus ostralegus* from breast feathers collected when ringing. *Wader study group bull*. 105: 87-89.

- Gutie'rrrez-Corchero, F., Arruga, M.V., Sanz, L., Garc'ia, C., Herna'ndez, M.A. and Campos, F. 2002. Using FTA® cards to store avian blood samples for genetic studies. Their application in sex determination. *Molecular Ecology Notes*: 75–77.
- Harvey, M.G., Bonter, D.N., Stenzler, L.M. and Lovette, I.J. 2006. A comparison of plucked feathers versus blood samples as DNA sources for molecular sexing. *Journal of field ornithology*. 77: 136–140.
- Hirschfeld, E., Roselaar, C.S. and Shirihi, H. 2000. Identification, taxonomy and distribution of greater and lesser sand plovers. *British birds*. 93: 162-189.
- Idaghdour, Y., Broderick, D. and Korrida, A. 2003. Faeces as a source of DNA for molecular studies in a threatened population of great bustards. *Conservation Genetic*. 4: 789–792.
- Jensen, T., Pernasetti, F.M., and Durrant, B. 2003. Conditions for rapid sex determination in 47 avian species by PCR of genomic DNA from blood, shell-membrane blood vessels, and feathers. *Zoo biology*. 22: 561-571.
- Joseph, L., Lessa, E.P. and Christidis, L. 1999. Phylogeny and biogeography in the evolution of migration: shorebirds of the *Charadrius* complex. *Journal of biogeography*. 26: 329-342.
- Julia, M. I.B, Michael, M. and Bruce C.R. 2013. Phylogenetic position and subspecies divergence of the endangered new zealand dotterel (*Charadrius obscurus*). *Plos one*. 8: 1-6.
- Kahn, N.W., John, J.S. and Quinn, T.W. 1998. Chromosome-specific intron size differences in the avian *CHD* gene provide an efficient method for sex identification in birds. *The auk*. 115: 1074-1078.
- Kocijan I., Dolenc P., Inko T., Nenadic, D.D., Pavokovic G. and Dolennec Z. 2011. Sex-typing bird species with little or no sexual dimorphism: an evaluation of molecular and morphological sexing. *Journal of biological research-hessaloniki*. 15: 145-150.
- Kupper, C., Augustin, J., Kosztolanyi, A., Burke, T., Figuerola, J. and Szekely, T. 2009. Kentish versus snowy plover: phenotypic and genetic analyses of *Charadrius alexandrinus* reveal divergence of eurasian and american subspecies. *The auk*. 126: 839-852.
- Morinha, F. Cabral, J.A. and Bastos E. 2012. Molecular sexing of birds: a comparative review of polymerase chain reaction (PCR)-based methods. *Theriogenology*. 78: 703-714.
- Ong, A.H. and Vellayan, S. 2008. An evaluation of CHD-specific primer sets for sex typing of birds from feathers. *Zoo Biology*. 27: 62-69.

- Clements, J.F. 2000. Birds of the world: a checklist, fifth edition Ibis Publishing Company, Temecula, CA.
- Conway, W.C., Wickliffe, J.K., Hoffmann, F.G., Baker, R.J. and Smith, L.M. 2004. An improved PCR based method for gender identification in birds. Occasional papers museum of Texas Tech university.
- Costantini, V., Guaricci A.C., Laricchiuta P., Rausa F. and Lacalandra G.M. 2008. DNA sexing in Humboldt Penguins (*Spheniscus humboldti*) from feather samples. Animal reproduction science. 106: 162-167.
- Dalton, D.L., Kotzé, A. and Howitt, M. 2010. Assessment of CHD-specific primers for gender determination in Red-billed Oxpeckers *Buphagus erythrorhynchus*. Ostrich. 81: 251-257.
- Dawson, D.A., Darby, S., Hunter, F.M. Krupa, A.P. Jones, I.L. and Burke, T. 2001. A critique of avian CHD-based molecular sexing protocols illustrated by a Z-chromosome polymorphism detected in auklets. Molecular Ecology Notes. 1: 201-204.
- Dubiec, A. and Neubauer, M.Z. 2006. Molecular techniques for sex identification in birds. Biological letters. 43: 3-12.
- Ellegren, H. 1996. First gene on the avian W chromosome (CHD) provides a tag for universal sexing of non-ratite birds. Proceedings of the Royal Society of London Series B Biological Sciences, 263: 1635-1641.
- Ellegren, H. and Sheldon, B.C. 1997. New tools for sex identification and the study of sex allocation in birds. Tree. 12: 255-259.
- Fridolfsson, A.K. and Ellegren, H. 1999. A Simple and universal method for molecular sexing of non ratite birds. Journal of avian biology. 30: 116-121.
- Funk, W.C., Mullins, T.D. and Haig S.M. 2007. Conservation genetics of snowy plovers (*Charadrius alexandrinus*) in the Western Hemisphere: population genetic structure and delineation of subspecies. Conservation genetics. 8: 1287-1309.
- Garcia, C.B., Insausti, J.A., Gil, J.A., Frutos, A.D., Alcantara, M., Gonzalez, J., Cortes, M.R., Bonafonte, J.I.B. and Arruga, M.V. 2008. Comparison of different procedures of DNA analysis for sex identification in the endangered bearded vulture (*Gypaetus barbatus*). European journal of wildlife research. 55: 309-312
- Griffiths, R. and Tiwari, B. 1995. Sex of the last wild Spix's macaw. Nature 375: 454.
- Griffiths, R. and Korn R.M. 1997. A *CHD1* gene is Z chromosome linked in the chicken *Gallus domesticus*. Gene. 197: 225-229.
- Griffiths, R., Double, M.C., Orr, K. and Dawson, R.J. 1998. A DNA test to sex most birds. Molecular ecology resources. 7: 1071-1075.
- Griffiths, R. and Phil, D. 2000. Sex Identification in birds. Seminars in avian and exotic pet medicine. 9: 14-26.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



INTERNATIONAL JOURNAL

OF ARTS AND SCIENCES

ISSN: 1944-6934 www.UniversityPublications.net

CONTENTS

2014, VOLUME 07, NUMBER 02

From Classroom to Career: Articulating and Operationalizing the Liberal Arts Advantage for the Career Readiness of College Students <i>James Simon, Aaron Perkus and Robbin D. Crabtree</i>	1-9
Demystifying Academic Reading and Writing <i>Mary Hatakka</i>	11-17
Cognitive Development, Teaching Methods and Techniques of Foreign Language Learning <i>Tanja Nedimović and Jelena Prtljaga</i>	19-25
Deformation - Analogical - Metamorphic Approach To The Understanding Of Design With Architecture Students <i>Özlem Şenyiğit, Gamze Atay, Altay Çolak and Tolga Uzun</i>	27-34
Economic Achievements of Hungarian City-Network and its Employment Potential <i>Judit Berkes and Ádám Páthy</i>	35-45
Consumers' Perception of Corporate Social Responsibility (CSR) and their Attitude Toward Retailers - Its Significance for Creating Retailers' Competitive Advantage <i>Magdalena Stefańska and Tomasz Wanat</i>	47-58
The Information Asymmetry and the Social Responsibility on the Food Market <i>Renata Nestorowicz</i>	59-68
The Relations between the Internal Communication Conditionings and its Effectiveness <i>Anna Rogala</i>	69-77
The Determination of Preschool Teachers' Awareness Related to Shared Reading <i>Hatice Kefeli and Ayşegül Bayraktar</i>	79-88
Negative Effects of Personalization In Direct Marketing <i>Aleksandra Kaniewska-Sęba and Bogna Pilarczyk</i>	89-98
Creativity Techniques in Marketing - Managers' Expertise Compared to its Practical Application <i>Ewa Jerzyk</i>	99-106

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ii Contents

Epicism in Bertolt Brecht's <i>The Elephant Calf and He Who Says Yes</i> , A Marxist Approach <i>Mona F. Hashish</i>	107-118
A Fuzzy Logic based Expert System for Quality Assurance of Document Image Collections <i>Roman Graf, Alexander Schindler and Reinhold Huber-Mörk</i>	119-131
"Surprising" Fountains in 15 th Century Sieneese Treatises <i>Adriana de Miranda</i>	133-154
A Hierarchical-Subgrouping Approach for the Determination of Significant Moderators Influencing the Relationship Between Favourable Organizational Climate and Job Attitude: The Reporting of Results (Series 3) <i>Nitin Arora</i>	155-165
The Study of Acceptance for Hydropower Development in Yom River Basin <i>Varinthorn Boonying, Narongsak Noosorn and Thanach Kanokthet</i>	167-177
Teaching and Learning Higher-Order Thinking <i>Shouhong Wang and Hai Wang</i>	179-187
The Influences of Research Environment within a University on Research Productivity of Academic Staff – A Case Study in a Research-Oriented University in Vietnam <i>Quy H. Nguyen and Christopher J. Klopper</i>	189-197
The Use of Review of System Assessment Guide on the Nursing Students' Self-Reported Competence, Self-Reported Confidence and Directly-Observed Competence on Health Assessment <i>Genecar G. Pe Benito, Rowena L. Escolar-Chua and Marie Ann Vvargas</i>	199-231
Prospective Classroom Teachers' Intentions to Integrate Health Education Across the Curriculum <i>Seidu Sofo, Emmanuel Thompson, Amy Freshwater and Catherine Krebs</i>	233-240
The Use of Mass Media in Training Brokerage and the Clientele Experience in Nigeria <i>Moshood Ayinde Hassan</i>	241-258
International Development Cooperation in the Field of Corporate Social Responsibility Institutionalisation <i>Okorochkova Anastasia</i>	259-264
Occupational Stress and Personality Factors of Substance Abusing Employees of Business Process Outsourcing/Information Technology Sector <i>Madhumita Mohanty and Om Prakash Chowdhury</i>	265-286
Teacher, It's Not Cheating – It's Cooperation! Academic Dishonesty in the Arabian Gulf <i>Kathy O'Sullivan</i>	287-295
English Langugae Learner Remediation through an Adaptive Learning Platform <i>Virginia McCormack</i>	297-303

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Foucauldian Panopticism: The Attitudes of Pre-Service English Teachers in ELT Department Towards Learner-Centered and Teacher-Centered Approach <i>Dilek Tufekci Can</i>	305–329
Active Vibration Control of Automobile Chassis by Optimal Hydraulic Controller <i>R. Venkatachalam and A. Bala Raju</i>	331–346
Game Design Principles and Motivation <i>Aimee Oxarart, Jennifer Weaver, Adel Al-Bataineh and Mohamed T. Al Bataineh</i>	347–359
Servant Leadership in Finance – Contradiction or Symbiosis? <i>Karl Zehetner and Peter Steinkellner</i>	361–372
Improvisation as a Viable Strategy for Architectural Composition. Control, Chance and Choice in Contemporary Creativity <i>Agnieszka Rumieź</i>	373–380
The Three Neurogenetic Phases of Human Consciousness: The Possibility of Transhuman and Posthuman Consciousness <i>John K. Grandy</i>	381–394
A Time Series Analysis of the Determinants of Domestic Private Investment in Iraq (1970-2010) <i>Jwan S. Hussein and James K.A. Benhin</i>	395–412
Risk Management in Public Expenditure Management and Aid – A Comparison of the World Bank and Government of Malaysia under the Educational Sector Support Project (ESSP) <i>Sulaiman Aris</i>	413–424
Components of Remuneration and Employee Satisfaction: The Impact of Effort Rewards and Career Advancement <i>Abdelhadi Naji</i>	425–436
The Four Eastern European Countries' Democratic Political Systems and their Executives <i>Kasim Karagoz and Saban Akca</i>	437–468
Learning through Student Created, Content Videos <i>Henry Greene</i>	469–478
Potential of Robotic Mannequin System and Digital Body-Mapping for Apparel Industry <i>C.K. Chan, J. Yang and A. Luximon</i>	479–486
Construction of Collocations in the Writing of Postgraduate Students <i>Firooz Namvar and Noraini Ibrahim</i>	487–497
Strategies for Education Reform <i>Anwar Dawood and Juliette Hirst</i>	499–510
Developing the Right Reading Comprehension Modules for the Right Reason with the Help of Reads <i>Lin Siew Eng, Abdul Rashid Mohamed, Shaik Abdul Malik Mohamed Ismail and Muhammad Javed</i>	511–519

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Religion and its Impact Upon Purchase Behavior: A Study of Indian Consumers <i>Sujata Khandai, Bhawna Agarwal and Shweta Bajpai</i>	521–534
Housing Stability Determinants as Informed by Previously Homeless Individuals: Having a Roof is only the Beginning <i>Andreas E. Tomaszewski, Tracy L. Powell, Sonya L. Jakubec and Joseph Osuji</i>	535–544
Types of Grammar Errors Found in Thai EFL Students' Business Writing <i>Tanom Tiensawangchai</i>	545–555
Factors Affecting Graduate Students' Decisions To Drop Out <i>Pracharee Amartayakul</i>	557–566
Gender Identification in Some Plover using <i>CHD</i> Gene <i>Supattra Poeaim, Nichapat Chobarporn, Krairat Eiamampai, Somchai Nimnuan and Thiti Sornsa</i>	567–572
Didactic Substantiation for the use of Critical Thinking Methods in the Chemistry Course of Medical Education <i>Irina Kazuša</i>	573–584
Ethics, Globalization and Cultural Disintegration <i>Blaine T. Garfalo and Barbara L'Huillier</i>	585–592
The Specifics of Teaching Architecture at an International Chinese-UK University <i>Ganna Andrianova</i>	593–608
Online Frontiers in Education: Leadership's Role <i>Sandra Lee Gupton</i>	609–616
The Impact of a System-Wide Community College Professional Development Program on Pedagogical Practice: An Assessment of Faculty Perspectives <i>Yvonne Williams-McMillan and Gregory M. Hauser</i>	617–627
Author index	629–630

Conference of the International Journal of Arts & Sciences is not responsible for the content of the individual manuscripts.

All correspondence should be mailed to the Associate Editor: Dr. Joseph Bonnici, Vance Hall, 4th Floor, Central Connecticut State University, 1615 Stanley Street, PO Box 4010, New Britain, CT 06050-4010, USA.

The manuscripts contained in this volume were double blind refereed.



GENDER IDENTIFICATION IN SOME PLOVER USING *CHD* GENE

Supattra Poeaim and Nichapat Chobarporn

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Thailand

Krairat Eiamampai, Somchai Nimnuan and Thiti Sornsra

Department of National Parks, Wildlife and Plant Conservation, Thailand

Charadrius spp. are migratory shorebirds in Thailand during the non-breeding season in which adult plumages are not clearly sexually dimorphic. Examining the sex ratio and population structure of plover, the molecular approach was used to determine the gender. Amplification of intron length polymorphisms in *chromo-helicase-DNA-binding* (*CHD*) genes on both Z and W chromosomes of six *Charadrius* spp. included Lesser Sand Plover (*Charadrius mongolus*), Greater Sand Plover (*C. leschenaultii*), Kentish Plover (*C. alexandrinus*), White-faced Plover (*C. alexandrinus dealbatus*), Malaysian Plover (*C. peronii*) and Grey Plover (*Pluvialis squatarola*). The resulting PCR products from P2/P8, 1237L/1272H and 2550F/2718R primers showed fragments on a conventional agarose gel electrophoresis with size differences ranging from 50, 50 and 200 bp between Z and W allele, respectively. For 2550F/2718R primer, males were identified by the presence of a single band about 650 bp (*CHD-Z*) and heterogametic females were identified by the presence of a second additional fragment length of approximately 450 bp (*CHD-W*). The results of molecular sexing will also have implications for shorebird conservation.

Keywords: Gender identification, *Chromo-Helicase-DNA binding* (*CHD*) gene, *Charadrius* spp., Plover.

Introduction

Shorebirds are members of the order Charadriiformes which is a large and diverse group of bird species. The most species of migratory shorebird are the Scolopacidae (sandpipers and allies) and the Charadriidae (lapwings and plovers). In Thailand, the estimated populations of at least 5 species (Long-toed Stint, Little Ringed Plover, Broad-billed Sandpiper, Lesser Sand Plover and Common Greenshank) exceed 5% of the East Asian–Australasian (EAA) Flyway estimate in the non-breeding period (Bamford et al. 2008). Most of the non-breeding sex-ratio data have, however, been collected in Europe and the Americas and very little is known in the EAA Flyway. Only 4 species of shorebirds (Curlew Sandpiper, Eastern Curlew, Bar-tailed Godwit and Sanderling) have been reported for sex-ratio data from the non-breeding season in the EAA Flyway (Nebel, 2007). Sex-ratio is an important understanding behavior, social structure, breeding system dynamics, mechanisms and patterns of migration and estimating extinction risk.

Identification of the sex of individuals or determination of sex ratio in an avian population is often difficult. Many bird species are morphologically monomorphic for external characters that would differentiate the sexes. *Charadrius* is a genus of plovers, a group of wading birds. They are found throughout the world. During the breeding season, researchers are able to sexing. However, during the non-breeding season, male and female plovers are similar in appearance (sexually monomorphic). Therefore, sex identification is difficult to observe in timing of migration.

Nowadays, molecular technique is a more reliable method for identifying the sex of birds which are monomorphic in their plumage. The technique was revolutionized by discovering the chromo-helicase-DNA binding protein 1 (*CHD-1*) gene located on the W sex chromosome (Griffiths and Tiwari, 1995) and Z sex chromosome (Griffiths and Korn, 1997). In birds, unlike in mammals, the sexes can be distinguished because females carry two types of sex chromosomes or heterogametic sex (WZ) containing the CHD-W and CHD-Z genes. Male birds are homogametic sex (ZZ) that has two copies of the Z chromosome containing only the CHD-Z gene. Two genes share relatively conserved exons while carrying highly polymorphic introns, often in different nucleotide lengths (Griffiths and Tiwari, 1995; Ellegren, 1996; Griffiths and Korn, 1997). Sex specific DNA primers take advantage of size differences in the CHD-Z and CHD-W genes such as P2/P8 (Griffiths et al., 1998) 1237L/1272H (Kahn et al., 1998) and 2550F/2718R (Fridolfsson and Ellegren, 1999) primer. So, post PCR (polymerase chain reaction) amplification a single band is observed in males and two bands in females (Griffiths et al. 1998).

Genetic sex determination in birds involves extracting DNA from feathers (Jensen et al., 2003; Sacchi et al., 2004; Costantini et al., 2008) tissue (Kahn et al., 1998; Fridolfsson and Ellegren, 1999; Wang et al., 2007) blood (Ellegren, 1996; Wang et al., 2007) and shell-membrane blood vessels (Jensen et al., 2003). Although blood is highly recommended for DNA extraction, the birds become injuries and stress during the handling and sampling process. FTA technology is used for the collection, transport, stabilization and storage from a wide variety of biological samples and widely used in human forensic analysis (Hedman et al., 2008). The aim of this study was to use the utility of Finders Technology Associates (FTA) cards for sex identification from blood samples of migratory plover, providing a large-scale method. Furthermore, we tested different primers (P2/P8, 1237L/1272H and 2550F/2718R) to determine the best sets for sex typing in *Charadrius*. Materials and methods.

Materials and Methods

Sample collection

To capture the shorebirds during the non-breeding season during September to November 2013, we were used cannon-nets which have the potential to capture a larger number of birds at once. The plovers were captured and identified to species based on morphological characters by the staff of the wildlife research division, department of national parks, wildlife and plant conservation, Thailand. The plover used in this study were from 3 places: 1. Bang Ya Phraek Sub-district, Mueang Samut Sakhon District, Samut Sakhon Province, Central of Thailand, 2. Laem Phak Bia Sub-district, Ban Laem District, Phetchaburi Province, West of Thailand and 3. Kantang River Estuary, Kantang District, Trang Province, South of Thailand. At first capture, we banded each plover with a numbered metal band and a unique combination of color plastic bands. Only a small amount of blood (about 10-20 μ l) is required, it is recommended that the vein be punctured with a 26 gauge or smaller needle and blood collected directly onto small size (1 X 3 cm) of Whatman FTA® cards (GE Healthcare, UK). The cards with the blood samples were put into plastic bags or microcentrifuge tube and air-dried at room temperature.

Purification of DNA using FTA® Card

A discs of the dried blood sample (approximately 2 mm diameter) was punched using a micro punches with cutting mat. Place each disc in a 0.2 ml microcentrifuge tube and washed two times with 125 μ l

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

FTA Purification Reagent (GE Healthcare, UK). Each time the sample was mixed by pipetting up and down several times and incubated at 65°C for 10 min after which the liquid was removed. The sample was washed two times with 125 μ L 0.1 M TE buffer (pH 8.0) and incubated at room temperature for 10 min. Carefully remove as much liquid as possible at the end of the second wash and then dried in heat box at 65°C.

PCR Amplification

Three pairs of primers, P2/P8 (Griffiths et al., 1998), 1237L/1272H (Kahn et al., 1998) and 2550F/2718R (Fridolfsson and Ellegren, 1999) targeting two different CHD1 introns, were used in this study. The reaction mix (master mix) was added to the sample tube containing the purified and immobilized DNA. The amplification was carried out in 25 μ L reaction volume containing 12.5 μ L of 2 X Taq master mix (Vivantis, Selangor, Malaysia) and 1 μ L of each 20 pM/ μ L primer and 10.5 μ L nuclease free water. To optimize the PCR conditions, a gradient PCR program involving temperatures ranging from 50°C to 60°C was employed using the Eppendorf Mastercycler EP Gradient S. The thermal profile for amplification was 95°C for 3 min, and followed by 35 cycles of 95°C for 45 sec, 56°C (P2/P8); 54°C (1237L/1272H) or 50°C (2550F/2718R) for 45 sec and 72°C for 45 sec and finished by a final extension of 72°C for 10 min. PCR products were separated by gel electrophoresis through a 1.5% agarose gel (Vivantis, Selangor, Malaysia), run in 1 X TBE (Tris-borate-EDTA) at 100 V for 45 min. The gel was visualized under UV light after ethidium bromide staining and photographed. A commercial 50 bp DNA Ladder (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) was used as size markers which have increased intensity as reference points at 200 and 500 base pair (bp) in order to judge whether Z and W bands were obtained.

Results and Discussion

While some birds have conspicuous sexual variation in plumage, plover have monomorphic plumage and are difficult to sex by direct observation. In the present study, determining the gender of sexually monomorphic birds by molecular sexing techniques is considered to be more reliable than morphometric analysis which can be influenced by age and season. Based on the fact that male birds have 2 identical sex chromosomes (ZZ), whereas females are heterogametic (ZW), Griffiths' et al. (1998) suggested a method using a single set of PCR primers to amplify CHD genes, incorporating introns, which usually vary in size. This method is very simple and is therefore widely used. However, this approach to sexing is not applicable to all avian species. Sex determination have been identified in some plover such as Kentish plover (*C. alexandrinus*) (Szekely et al., 2004; Küpper et al., 2009), Crab Plovers (*Dromas ardeola*) (De Marchi et al., 2012). So, this is gender determination among closely related species of plover. Gender determination was attempted in 178 samples originating from 6 species: 114 Lesser Sand Plover (*C. mongolus*), 41 Greater Sand Plover (*C. leschenaultia*), 18 Kentish Plover (*C. alexandrinus*), 3 White-faced Plover (*C. alexandrinus dealbatus*), 1 Malaysian Plover (*C. peronii*) and 1 Grey Plover (*P. squatarola*). In order to select primer sequences applicable for PCR-based sex identification of a variety of plover, we used three common primer pairs developed from the CHD1 gene, including P2/P8 (Griffiths et al., 1998), 1237L/1272H (Kahn et al., 1998) and 2550F/2718R (Fridolfsson and Ellegren, 1999) that shown nucleotide sequences and annealing temperatures of oligonucleotide primers in table 1.

Three primer sets, the resulted in a single band in male plover and two bands in females (Fig. 1). The P2/P8 primers and the 1237L/1272H primers flank the same intron. Therefore, the size difference in the fragments from the Z and W chromosomes is identical (Jensen et al. 2003). The resulting PCR products from these primers showed fragments on a conventional agarose gel electrophoresis with size differences ranging from 50 bp between CHD-Z and CHD-W allele which very small and potentially creating difficulty in sexing. Including, the P2/P8 and the 1237L/1272H primers have the possible disadvantage that the PCR product from the CHD-Z allele is smaller than that from the CHD-W, and so it may be amplified preferentially. This can lead to the females being mistyped as males, especially when the

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

amplification is weak (Dawson et al. 2001). The P2/P8 has been a commonly used primer set for sex identification in plover: Kentish plover (Szekely et al., 2004) and Crab Plovers (De Marchi et al., 2012), however, length differences between the CHD-Z and CHD-W introns may be necessary to use a polyacrylamide gel or the higher percentage of agarose gel if such differences are to be limited (Dawson et al., 2001; Jensen et al., 2003; Szekely et al., 2004). For 2550F/2718R primer, all females had two PCR products of 650 bp and 450 bp while males shared a single product of 450 bp. The reduced PCR products by 200 bp enhanced the relative size contract between the two PCR amplicons with easy and clear resolution in routine 1.5% agarose gel (Fig.2). In general, the difference in size between CHD-Z and CHD-W fragments amplified with the 2550F/2718R primers ranges from 150 to 250 bp, while for the P2/P8 primers, from 10 to 80 bp (Fridolfsson and Ellegren, 1999; Jensen et al. 2003; De Marchi et al., 2012). In contrast, the design of the 2550F/2718R primers is such that the amplified W fragment is the smaller one, so avoiding the amplified preferentially potential problem. Therefore, sex determination with primers 2550F and 2718R is only applicable for those species.

Table 1. Nucleotide sequences primer sets amplified *CHD* gene and their respective annealing temperatures for PCR condition applied to sex identification

Primers	Nucleotide sequence	Source	Annealing temperature
P2	5'-TCTGCATCGCTAAATCCTT-3'	Griffiths et al., 1998	56 °C
P8	5'-CTCCAAGGATGAGRAAYTG-3'		
1237L	5'-GAGAACTGTGCAAAACAG-3'	Kahn et al., 1998	54 °C
1272H	5'-TCCAGAATATCTTCTGCTCC-3'		
2550F	5'-GTTACTGATTCGTCTACGAGA-3'	Fridolfsson and Ellegren, 1999	50 °C
2718R	5'-ATTGAAATGATCCAGTGCTT-3'		

Table 2. Summary of sex identification by PCR detected using the 2550F and 2718R sexing primers for CHD gene in six species of plover.

Common name	Species	Locations and numbers of bird					
		Samut Sakhon Province		Phetchaburi Province		Trang Province	
		F	M	F	M	F	M
Lesser Sand Plover	<i>C. mongolus</i>	14	48	1	16	18	17
Greater Sand Plover	<i>C. leschenaultii</i>	5	5	1	-	13	14
Kentish Plover	<i>C. alexandrinus</i>	-	-	-	-	10	8
White-faced Plover	<i>C. alexandrinus dealbatus</i>	-	-	-	-	1	2
Malaysian Plover	<i>C. peronii</i>	-	-	-	-	-	1
Grey Plover	<i>P. squatarola</i>	-	-	-	-	-	1

All blood samples collected from three locations in Thailand were sexed and the results are given in Table 2. Only three samples of Greater Sand Plover from Samut Sakhon Province failure to amplify. Efficiency of PCR-based sex determination methods will providing the correct sex for each individual.

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Beside of correctly primer, the non invasive and rapid procedure for the sampling and collecting the sample is necessary. Blood or feathers could be the source for DNA extraction. Furthermore, DNA extraction by using blood or feather reduces the stress of the bird and avoids excessive blood loss (Cerit and Avanus 2006). This study demonstrated the efficacy of using FTA card for the purpose of sex identification in plover. This method has several advantages over other procedure in migrate plover such as small amount of blood has minimal effect on the bird, storage and shipment of papers is easy since they can be kept at room temperature and DNA has a good stability in dried samples and DNA sample that was immobilized on the paper matrix can be rapidly purified, without the need for a long extraction process.

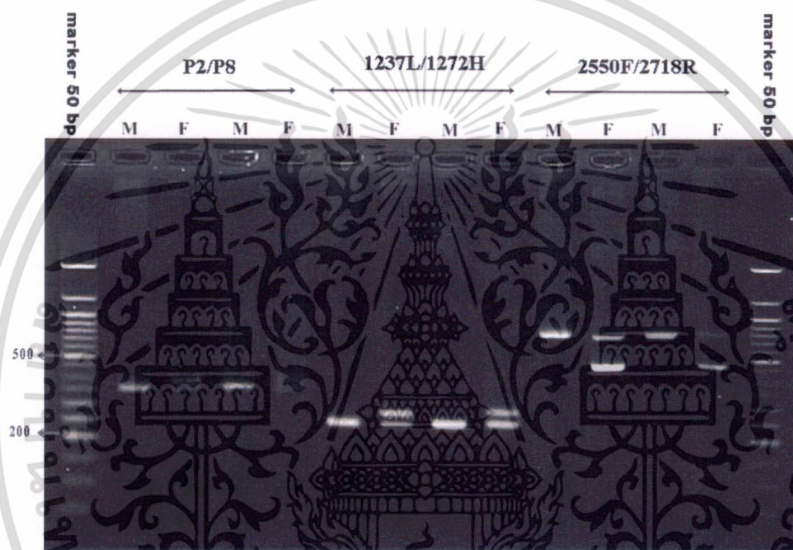


Figure 1. Comparison of PCR products in genus *Charadrius* from three universal primer sets by electrophoresis (agarose 1.5%) including P2/P8 primer (lane 2-5), 1237L/1272H primer (lane 6-9), 2550F/2718R primer (lane 10-13) and 50 base pairs marker (lane 1 and 14) (M = male and F = female)



Figure 2. Sex identification in genus *Charadrius* with 2550F/2718R primer for *CHD* gene. The PCR products were separated on 1.5% agarose gel. Female have two band (about 450 and 650 bp) and males have one band (650 bp) including *C. mongolus* (lane 2-5), *C. leschenaultii* (lane 6-9), *C. alexandrinus* (lane 10-12), *C. alexandrinus dealbatus* (lane 13-15), *C. peronii* (lane 16) and marker DNA 50 base pairs (lane 1) ข้อมูลนี้เป็นเอกสารราชการ

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Acknowledgements

This work was supported by a grant from King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang for fiscal year 2014. We are also grateful to officer from Wildlife Research Division, Wildlife Conservation Office, Department of National Parks, Wildlife and Plant Conservation, Bangkok, Thailand for sampling the plover. We thank anonymous reviewers for their helpful comments on the manuscript.

References

- Bamford, M.J., Watkins, D.G., Bancroft, W., Tischler, G. & Wahl, J. (2008). Migratory shorebirds of the East Asian-Australasian Flyway; Population Estimates and important Sites. Wetlands International, Oceania.
- Cerit, H. and Avanus, K. 2007. Sex identification in avian species using DNA typing methods. World's Poultry Science Journal, 63, 91-99.
- Dawson, D.A., Darby, S., Hunter, F.M., Krupa, A.P., Jones, I.L. & Burke, T. (2001). A critique of avian CHD-based molecular sexing protocols illustrated by a Z-chromosome polymorphism detected in auklets. Molecular Ecology Notes, 1(3), 201-204.
- De Marchi, G., Fasola, M., Chiozzi, G., Bellati, A. & Galeotti, P. (2012). Sex Discrimination of Crab Plovers (*Dromas ardeola*) by morphometric traits. Waterbirds, 35(2), 332-337.
- Ellegren, H. (1996) First gene on the avian W chromosome (CHD) provides a tag for universal sexing of non-ratite birds. Proceedings of the Royal Society of London Series B Biological Sciences, 263, 1635-1641.
- Ellegren, H. and Sheldon, B. (1997). New tools for sex identification and the study of sex allocation in birds. Trends in Ecology and Evolution. 12, 255-259.
- Fridolfsson, A.K. and Ellegren, H. (1999). A Simple and universal method for molecular sexing of non ratite birds. Journal of Avian Biology, 30, 116-121.
- Griffiths, R. and Tiwari, B. (1995). Sex of the last wild Spix's macaw. Nature, 375, 454.
- Griffiths, R. and Korn, R.M. (1997). A *CHD1* gene is Z chromosome linked in the chicken *Gallus domesticus*. Gene, 197, 225-229.
- Griffiths, R., Double, M.C., Orr, K. & Dawson, R.J. (1998). A DNA test to sex most birds. Molecular Ecology, 7, 1071-1075.
- Hedman, J., Albinsson, L., Ansell, C., Tapper, H., Hansson, O., Holgersson, S. & Ansell, R. 2008. A fast analysis system for forensic DNA reference samples. Forensic Science International: Genetics, 2, 184-189.
- Jensen, T., Pernasetti, F.M. & Durrant, B. (2003) Conditions for rapid sex determination in 47 avian species by PCR of genomic DNA from blood, shell-membrane blood vessels, and feathers. Zoo Biology, 22, 561-571.
- Kahn, N.W., John, J.S. & Quinn, T.W. (1998). Chromosome-specific intron size differences in the avian *CHD1* gene provide an efficient method for sex identification in birds. Auk, 115, 1074-1078.
- Kupper, C., Augustin, J., Kosztolanyi, A., Burke, T., Figuerola, J. & Szekely, T. (2009). Kentish versus snowy plover: phenotypic and genetic analyses of *Charadrius alexandrinus* reveal divergence of Eurasian and American subspecies. Auk, 126, 839-852.
- Nebel, S. (2007). Differential migration of shorebirds in the East Asian-Australasian Flyway. Emu, 107, 14-18.
- Sacchi, P., Soglia, D., Maione, S., Meneguz, G., Campora, M. & Rasero, R. (2004). A non-
- invasive test for sex identification in Short-toed Eagle (*Circaetus gallicus*). Molecular and Cellular Probes, 18, 193-196.
- Szekely, T., Cuthill, I. C., Yezerinac, S., Griffiths, R. & Kis, J., (2004). Brood sex ratio in the Kentish plover. Behavioral Ecology, 15(1), 58-62.
- Wang, L.C., Severinghaus, L.L., Chen, C.T., Liu, L.Y., Pan, C.H., Huang, D., Lee, H.Y., Lir, J.T., Chin, S.C., Pu, C.E. & Wang, C.H. (2007). Sexing a wider range of avian species based on two *CHD1* introns with a unified reaction condition. Zoo Biology, 26, 425-431.

เอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้