สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การระบุเพศและความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกในสกุลตีนเทียน

SEX IDENTIFICATION AND GENETIC DIVERSITY OF BIRDS IN GENUS *Himantopus*

T141263

วิภารัตน์ ศิริพงษ์

WIPARAT SIRIPONG

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

วน.
วิทยา
2559

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 141263
วัน.เดือน.ปี 8 มิ.ย. 2559

.b 12751947
.i.....

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2558

KMITL-2015-SC-M-020-062

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

SEX IDENTIFICATION AND GENETIC DIVERSITY OF BIRDS IN GENUS *Himantopus*

WIPARAT SIRIPONG

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY
DEPARTMENT OF BIOLOGY
FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
2015

KMITL-2015-SC-M-020-062

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

COPYRIGHT 2015

FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์ "การระบุเพศและความหลากหลายทางพันธุกรรมของนก ในสกุลตีนเทียน"
"SEX IDENTIFICATION AND GENETIC DIVERSITY OF BIRDS IN GENUS *Himantopus*"

ชื่อนักศึกษา นางสาววิภารัตน์ ศิริพงษ์
รหัสประจำตัว 56605022
ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา ชีววิทยา
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พฤกษ์ ประธานกรรมการ	
ผศ.ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม อาจารย์บัณฑิตประจำ (ในสาขาวิชาที่เกี่ยวข้อง)	
ผศ.ดร.ประทีป ด้วงแค ผู้ทรงคุณวุฒิจากภายนอกสถาบันฯ	
ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	

วัน/ เดือน/ ปี ที่สอบ 16 พฤศจิกายน พ.ศ. 2558 เวลา 09.00 - 12.00 น.
สถานที่สอบ ณ ห้อง 306 อาคารปฏิบัติการหลังใหม่

คณะวิทยาศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์ ดร.ดุษณี ธนะบริพัฒน์)
คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
วันที่ ๒๕ **เดือน** ธ.ค. **พ.ศ.** ๕๘

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การระบุเพศและความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกในสกุลตีนเทียน
ชื่อนักศึกษา	วิภารัตน์ ศิริพงษ์
รหัสประจำตัว	56605022
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
ภาควิชา	ชีววิทยา
พ.ศ.	2558
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม

บทคัดย่อ

นกตีนเทียน (*Himantopus himantopus*) เป็นนกที่ไม่สามารถระบุเพศได้จากลักษณะภายนอก และเป็นนกที่มีลักษณะสีขนบริเวณกระหม่อมและท้ายทอยหลากหลายรูปแบบ งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อระบุเพศ และศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกในสกุลตีนเทียน โดยในการระบุเพศนกใช้ตำแหน่งยีน *chromo-helicase DNA binding protein* (*CHD* gene) ด้วยไพรเมอร์ 2550F/2718R ตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์พบว่าเพศเมียมีแถบดีเอ็นเอ 2 แถบ ที่มีชิ้นดีเอ็นเอขนาด 461 คู่เบส (*CHD-W*) และขนาด 620 คู่เบส (*CHD-Z*) และนกเพศผู้มีแถบดีเอ็นเอเพียง 1 แถบของอัลลีล *CHD-Z* จากตัวอย่างนกตีนเทียนจำนวน 277 ตัวอย่าง พบว่าเป็นเพศผู้ 144 ตัวอย่าง เพศเมีย 130 ตัวอย่าง และไม่สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมได้จำนวน 3 ตัวอย่าง ในการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *CHD* และยีน *cytochrome c oxidase I* (*COI*) พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณอัลลีล *CHD-Z* เกิด single nucleotide polymorphism (SNP) จำนวน 2 ตำแหน่ง และไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างเพศกับลักษณะสีขนบริเวณกระหม่อมและท้ายทอยของนก สำหรับยีน *COI* สามารถใช้ในการระบุสปีชีส์ของนกในสกุลตีนเทียนได้ นอกจากนี้การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค inter-primer binding site (iPBS) จากการทดสอบไพรเมอร์จำนวน 40 ไพรเมอร์ พบว่ามีเพียงไพรเมอร์จำนวน 5 ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจนและสามารถนับได้ คือ 2224 2240 2251 2272 และ 2415 เมื่อนำไพรเมอร์ดังกล่าวไปทดสอบกับตัวอย่างจำนวน 36 ตัวอย่าง ซึ่งสุ่มเลือกจากลักษณะสีขนบริเวณกระหม่อมและท้ายทอยที่แบ่งเป็น 6 ลักษณะ เมื่อนำข้อมูลมาสร้าง dendrogram พบว่าสามารถแบ่งตัวอย่างออกเป็น 2 กลุ่ม ซึ่งไม่สอดคล้องกับลักษณะสีขนบริเวณกระหม่อมและท้ายทอย แต่สามารถจำแนกนกในฤดูทำรังวางไข่ออกจากนกในฤดูอพยพได้

คำสำคัญ : นกตีนเทียน (*Himantopus himantopus*) เทคนิคไอพีบีเอส ลำดับนิวคลีโอไทด์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thesis Title	Sex Identification and genetic diversity of birds in genus *Himantopus*
Student Name	Wiparat Siripong
Student ID	56605022
Degree	Master of Science
Department	Biotechnology
Year	2015
Thesis Advisor	Asst. Prof. Dr. Supattra Poeaim

Abstract

Black-winged Stilts (*Himantopus himantopus*) are sexually monomorphic birds and vary considerably in pattern on their crown and hindneck. This research aimed to identify the gender and study genetic diversity of birds in genus *Himantopus*. For sex identification, *chromo-helicase DNA binding protein* (*CHD*) gene was amplified using 2550F/2718R primers. Two PCR products with a size of 461 bp for *CHD-W* allele and 620 bp for *CHD-Z* allele were obtained from all female samples whereas only one PCR product from *CHD-Z* allele was obtained from all male samples. In a total of 277 samples, 144 males and 130 females were determined, whereas *CHD* gene of the remaining 3 samples could not be amplified by PCR. Additionally, nucleotide sequence of *CHD*-Z allele and *cytochrome c oxidase I* (*COI*) gene were investigated. The *CHD-Z* allele nucleotide sequences revealed 2 single nucleotide polymorphisms (SNP). However, these sequences were not related to the crown and hindneck patterns. The nucleotide sequence of *COI* gene showed species differences between birds in genus *Himantopus*. Moreover, the genetic diversity was studied by using inter-primer binding site (iPBS) technique. Five iPBS primers (2224, 2240, 2251, 2272 and 2415), giving clear and easy countable bands, were selected from 40 iPBS primers. PCR amplification of 36 samples which were selected from 6 crown and hindneck patterns were investigated. The dendrogram showed that bird samples were divided in two groups which were not related to the crown and hindneck patterns but it can identify the genetic differentiation between the resident and the migratory birds.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Keywords : Black-winged Stilt (*Himantopus himantopus*), iPBS technique, nucleotide sequence

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี เนื่องจากได้รับความช่วยเหลือจากบุคคลหลายท่าน ซึ่งไม่อาจนำมากล่าวได้ทั้งหมด ทั้งนี้ ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม อาจารย์ที่ปรึกษา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่กรุณาให้คำแนะนำที่ดี และเสนอแนะแนวทางการแก้ไขปัญหาตลอดระยะเวลาในการทำงานวิจัย รวมถึงการตรวจวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร. สรัญญา พันธุ์พฤกษ์ ประธานกรรมการ ผศ.ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม อาจารย์บัณฑิตประจำสาขา และ ผศ.ดร. ประทีป ด้วงแค ผู้ทรงคุณวุฒิ ที่ให้คำปรึกษา และคำแนะนำในการแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณ กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพันธุ์พืช ที่อนุญาตให้เก็บตัวอย่างนกตีนเทียน รวมทั้งคุณดุสิต อาทิตยวาร หัวหน้าเขตห้ามล่าพันธุ์สัตว์ป่าบึงบอระเพ็ด จังหวัดนครสวรรค์ คุณไกรรัตน์ เอี่ยมอำไพ หัวหน้าสถานีวิจัยสัตว์ป่าบึงบอระเพ็ด จังหวัดนครสวรรค์ และเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือ และอนุเคราะห์ในการเก็บตัวอย่าง และในการวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนสนับสนุนบางส่วนจากเงินรายได้คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ประจำปีงบประมาณ 2558 จึงขอขอบคุณมา ณ ที่นี้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่นักวิทยาศาสตร์ที่เอื้ออำนวยความสะดวกเรื่องอุปกรณ์ เครื่องมือ และสารเคมี รวมถึงขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆภาควิชาชีววิทยาทุกท่าน ที่มีส่วนช่วยในการสนับสนุน และเป็นกำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์

สุดท้ายนี้ผู้จัดทำขอขอบพระคุณ บิดา มารดา และบุคคลในครอบครัวที่สนับสนุน และให้กำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์ จนสำเร็จตามที่คาดหวัง หากวิทยานิพนธ์เล่มนี้มีความผิดพลาดประการใด ขออภัยมา ณ ที่นี้

นางสาววิภารัตน์ ศิริพงษ์

ธันวาคม 2558

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ก

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ข

กิตติกรรมประกาศ ..... ง

สารบัญ ..... จ

สารบัญตาราง ..... ช

สารบัญรูป ..... ช

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ 1

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย 3

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย 3

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 3

บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 4

2.1 นกในสกุลตีนเทียน (genus *Himantopus*) 4

2.2 วิธีการดักจับนก 7

2.3 การระบุเพศนก 9

2.4 การสกัดดีเอ็นเอและระบุเพศนกโดยเทคนิคระดับโมเลกุล 11

2.5 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ 12

2.6 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค iPBS 13

บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย 15

3.1 การเก็บตัวอย่าง 15

3.1.1 การขออนุญาตเก็บตัวอย่าง 15

3.1.2 การเก็บตัวอย่าง 15

3.2 สารเคมี 18

3.3 อุปกรณ์และเครื่องมือ 21

3.4 วิธีการทดลอง 22

3.4.1 การทำให้ดีเอ็นเอในกระดาษ FTA บริสุทธิ์ 22

3.4.2 การสกัดดีเอ็นเอจากเลือด 22

3.4.3 การสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อบริเวณปลอกขน 23

3.4.4 การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอ 23

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

3.4.5 การระบุเพศนกด้วยเทคนิคระดับโมเลกุล 24
3.4.6 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน *cytochrome c oxidase I* (*COI*) 25
3.4.7 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ 25
3.4.8 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค iPBS 26
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล 28
4.1 ผลการเก็บตัวอย่างนกตีนเทียน 28
4.2 ผลการระบุเพศนกด้วยเทคนิคระดับโมเลกุล 31
4.2.1 การหาไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการระบุเพศนกตีนเทียน 31
4.2.2 ผลการหาตำแหน่งการจับของไพรเมอร์บริเวณยีน *CHD* 33
4.2.3 ผลการระบุเพศนก 36
4.2.4 ผลการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณอัลลีล *CHD-Z* 38
4.3 ผลการระบุสปีชีส์ด้วยยีน *COI* 41
4.4 ผลการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค iPBS 48
4.4.1 ผลการหาไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม 48
4.4.2 ผลการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกตีนเทียน 48
บทที่ 5 สรุปผลวิจัยและข้อเสนอแนะ 53
เอกสารอ้างอิง 54
ภาคผนวก 61
ภาคผนวก ก 62
ภาคผนวก ข 63
ภาคผนวก ค 69
ประวัติผู้เขียน 70

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
3.1	ไพรเมอร์ที่ใช้ในการระบุเพศและศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของนกตีนเทียน	19
3.2	ไพรเมอร์ที่ใช้ในเทคนิค iPBS	19
4.1	แสดงจำนวนและรูปแบบการเก็บตัวอย่างนกตีนเทียนในแต่ละฤดูกาล	29
4.2	แสดงผลการระบุเพศนกตีนเทียนในช่วงฤดูทำรังวางไข่ และฤดูนกอพยพ ในปีพุทธศักราช 2556-2558	37
4.3	แสดงผลการระบุเพศนกตีนเทียนในช่วงฤดูทำรังวางไข่ และฤดูอพยพ ในปีพุทธศักราช 2556-2558 โดยแยกตัวอย่างนกตีนเทียนออกเป็น 6 ลักษณะ ตามลักษณะสีขนบริเวณกระหม่อมและท้ายทอย	38
4.4	แสดงสปีชีส์ accession number ค่า identity และสถานที่ที่เก็บตัวอย่าง ของนกตีนเทียน จากฐานข้อมูล GenBank ใน NCBI	44
4.5	จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในนกตีนเทียน ด้วยเทคนิค iPBS จากไพรเมอร์จำนวน 5 ไพรเมอร์	50

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

2.1 แสดงลักษณะนกในสกุลตีนเทียน ก: *Himantopus himantopus* (black-winged stilt) ข: *H. leucocephalus* (white-headed stilt) ค: *H. melanurus* (white-backed stilt) ง: *H. novaezelandiae* (black stilt) จ: *H. mexicanus mexicanus* (black-necked stilt) และ ฉ: *H. mexicanus knudseni* (hawaiian stilt)..... 6

2.2 แสดงรูปการดักจับนกด้วยวิธี bow net..... 8

2.3 แสดงลักษณะการดักจับนกด้วยวิธีท่อส่งตาข่าย (cannon net)..... 8

3.1 แสดงการดักจับนกตีนเทียนในฤดูทำรังวางไข่ด้วยวิธี spring trap ก : หลักการการดักจับนกด้วยวิธี spring trap ข : การใช้ spring trap ดักจับนกบริเวณรังนก..... 16

3.2 แสดงการดักจับนกตีนเทียนในฤดูอพยพด้วยวิธี cannon net..... 16

3.3 แสดงการเก็บตัวอย่างนกตีนเทียน ก : แสดงการใส่รหัสห่วงขาและห่วงสี ข : การชับเลือดบริเวณปลายนิ้วเท้าด้วยกระดาษ FTA ค : การเจาะเลือดบริเวณหน้าแข้ง เพื่อเก็บตัวอย่างเลือดด้วย micro haematocrit tube ซึ่งปราศจาก Heparin ง : แสดงการดึงขนซึ่งมีเนื้อเยื่อบริเวณปลอกขน..... 17

4.1 แสดงลักษณะสีขนบริเวณกระหม่อม และท้ายทอยของนกตีนเทียน ซึ่งแบ่งออกเป็น 6 ลักษณะ คือ ก : กระหม่อมและท้ายทอยสีขาว ข : กระหม่อมและท้ายทอยสีขาว ปลายขนสีดำ ค : กระหม่อมสีขาว และท้ายทอยสีดำอ่อน ง : กระหม่อมสีขาว และท้ายทอยสีดำเข้ม จ : กระหม่อม และท้ายทอยสีเทา ฉ : กระหม่อม และท้ายทอยสีเทา บริเวณขอบตาสีเทาเข้ม..... 30

4.2 แสดงลักษณะสีบริเวณโคนปากของนกตีนเทียน ก : โคนปากดำ ข : โคนปากสีชมพู..... 30

4.3 แสดงผลการระบุเพศนกตีนเทียนด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (เจลอะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์) ของไพรเมอร์ 3 คู่ คือ ไพรเมอร์ P2/P8 (ช่องที่ 2-5), ไพรเมอร์ 1237L/1272H (ช่องที่ 6-9) และไพรเมอร์ 2550F/2718R (ช่องที่ 10-13) ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 50 คู่เบส (ช่องที่ 1 และ 14)..... 32

4.4 แสดงตำแหน่งจับของไพรเมอร์ P2/P8 ไพรเมอร์ 1237L/1272H และไพรเมอร์ 2550F/2718R บนอัลลีล *CHD-Z* ของนกตีนเทียน..... 34

4.5 แสดงตำแหน่งจับของไพรเมอร์ P2/P8 ไพรเมอร์ 1237L/1272H และไพรเมอร์ 2550F/2718R บนอัลลีล *CHD-W* ของนกตีนเทียน..... 35

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
4.6	ภาพจำลองการเข้าจับของไพรเมอร์ P2/P8 ไพรเมอร์ 1237L/1272H และไพรเมอร์ 2550F/2718R บริเวณยีน *CHD*	36
4.7	แสดงการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของอัลลีล *CHD-Z* และการเกิด SNP โดยบริเวณ ก : ลำดับนิวคลีไทด์ตำแหน่งที่ 383 เป็น SNP แบบ transition ข : ลำดับนิวคลีไทด์ตำแหน่งที่ 404 เป็น SNP แบบ transverion	40
4.8	แสดง phylogenetic tree ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณอัลลีล *CHD-Z* ของนกตีนเทียน ด้วยโปรแกรม MEGA6 โดยใช้พารามิเตอร์แบบ neighbor-joining และโมเดลของ Kimura 2-parameter โดยให้มีค่า bootstraping เท่ากับ 1000	41
4.9	แสดงผลการหาไพรเมอร์ที่เหมาะสมในเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน *COI* ตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (เจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์) ของไพรเมอร์ 3 คู่ คือ ช่องที่ 1 : ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส ช่องที่ 2-4 : ไพรเมอร์ BirdF1/BirdR1 ที่อุณหภูมิ 58, 59 และ 60 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ช่องที่ 5-7 : ไพรเมอร์ BirdF1/BirdR2 ที่อุณหภูมิ 58, 59 และ 60 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และ ช่องที่ 8-11 : ไพรเมอร์ BirdF1/BirdR3 ที่อุณหภูมิ 57, 58, 59 และ 60 องศาเซลเซียส ตามลำดับ	43
4.10	แสดงตำแหน่งจับของไพรเมอร์ BirdF1/BirdR1 ไพรเมอร์ BirdF1/BirdR2 และไพรเมอร์ BirdF1/BirdR3 บริเวณยีน *COI* ของนกตีนเทียน	45
4.11	แสดง phylogenetic tree จากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *COI* ของนกในสกุลตีนเทียน โดยใช้พารามิเตอร์แบบ neighbor-joining และโมเดลของ Kimura 2-parameter โดยให้มีค่า bootstaping เท่ากับ 1000	47

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
4.12	แสดงขนาดและแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ 2415 โดยตัวอย่างแบ่งตามลักษณะสีขนบริเวณกระหม่อม และท้ายทอยเป็น 6 ลักษณะ คือ กระหม่อมและท้ายทอยสีขาว (Hm83, Hm84, HHm54, HHm60, HH29, HH30, HH31, HH35, HHH03 และ HHH05) กระหม่อม และท้ายทอยสีขาวปลายขนสีดำ (Hm41, Hm58, HHm51, HHm58, HH33, HH34, HHH08 และ HHH13) กระหม่อมสีขาว และท้ายทอยสีดำอ่อน (Hm68, HHm84, HHm89, HH24, HH27, HHH04 และ HHH12) กระหม่อมสีขาว และท้ายทอยสีดำเข้ม (Hm45, HHm42, HH05 และ HH22) กระหม่อม และท้ายทอยสีเทา (Hm15, Hm23, HHm74 และ HHm76) กระหม่อม และท้ายทอยสีเทา บริเวณขอบตาสีเทาเข้ม (Hm70, Hm81 และ HHm16) และตัวแทนของแต่ละฤดู โดยฤดูทำรังวางไข่ ปี 2557 และ 2558 คือ HH และ HHH ตามลำดับ และฤดูนกอพยพ ปี2556 และ 2557 คือ Hm และ HHm ตามลำดับ	49
4.13	Dendrogram แสดงความสัมพันธ์ของนกตีนเทียนแต่ละตัวอย่าง จากข้อมูลแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค iPBS ด้วยไพรเมอร์จำนวน 5 ไพรเมอร์	51
4.14	แสดงแผนภาพการกระจายตัวของนกตีนเทียนจำนวน 35 ตัวอย่าง ด้วยโปรแกรม SPSS Statistics 17.0	52

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

นกในสกุลตีนเทียน (genus *Himantopus*) เป็นนกที่อยู่ในวงศ์นกตีนเทียน (Recurvirostridae) ลักษณะเด่นของนกในสกุลตีนเทียน คือ ปากยาวตรง และเรียว ปีกยาว ปลายปีกแหลม และขายาว โดยทั้งน่อง และแข้งยาว (โอภาส, 2543) การจัดจำแนกนกในสกุลตีนเทียนจะจำแนกตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา และถิ่นที่อยู่อาศัยที่พบ โดย International Ornithological Committee World Bird List version 5.1 (2015) แบ่งนกสกุลนี้ออกเป็น 5 สปีชีส์ คือ *Himantopus himantopus* พบอาศัยอยู่บริเวณทวีปยุโรป เอเชีย และแอฟริกา *H. leucocephalus* พบในประเทศออสเตรเลีย นิวซีแลนด์ และหมู่เกาะใกล้เคียงในมหาสมุทรแปซิฟิก *H. mexicanus* พบทางตอนใต้ของทวีปอเมริกาเหนือ *H. melanurus* พบบริเวณทวีปอเมริกาใต้ และ *H. novaezelandiae* พบเฉพาะในประเทศนิวซีแลนด์ ทั้งนี้จึงสนใจศึกษานกในสกุลตีนเทียนที่กระจายอยู่ในทวีปเอเชีย คือ *H. himantopus* ซึ่งในประเทศไทยพบเพียงการศึกษาของอภิษฎา และคณะ (2557) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการกระจายของรังนกตีนเทียนในบึงบอระเพ็ด สภาพพื้นที่ในการสร้างรังวางไข่ ลักษณะของรัง รูปร่างลักษณะของไข่ และพฤติกรรมการฟักไข่ของนกตีนเทียน

black-winged stilt (*H. himantopus*) ในประเทศไทยเรียกว่านกตีนเทียน เป็นนกที่มีขนาดเล็กถึงกลาง มีปากยาวสีดำ และเรียวแหลม ปีกยาวแหลมสีดำ ขายาวสีชมพู ลำตัวส่วนล่างเป็นสีขาว สะโพกและขนคลุมโคนหางสีขาว โดยตัวผู้จะมีบริเวณกระหม่อมและท้ายทอยเป็นสีขาว และตัวเมียมีสีเทา (โอภาส, 2543) นกตีนเทียนสามารถพบได้ทั่วไปบริเวณแหล่งน้ำ หรือพื้นที่ชุ่มน้ำ โดยเฉพาะบริเวณเขตห้ามล่าสัตว์ป่าบึงบอระเพ็ด จังหวัดนครสวรรค์ ที่พบว่ามีการทำรังวางไข่บริเวณนี้ครั้งแรกเมื่อปี พ.ศ. 2535 (วิเชียร, 2537) ในช่วงฤดูร้อนระหว่างเดือนเมษายนถึงเดือนมิถุนายน และยังพบว่ามีการทำรังวางไข่จนถึงปัจจุบัน (ไกรรัตน์, 2549) ทั้งนี้ยังมีนกตีนเทียนที่อพยพมาในช่วงฤดูหนาว (ปรางรัตน์ และคณะ, 2557) ระหว่างเดือนพฤศจิกายนถึงเดือนมกราคม จึงกล่าวได้ว่านกตีนเทียนที่พบในประเทศไทยมีทั้งนกประจำถิ่น และนกอพยพ และจากข้อมูลทางสัณฐานวิทยาสามารถระบุเพศจากสีของกระหม่อมและท้ายทอย ดังที่กล่าวมาแล้ว แต่จากการสำรวจลักษณะกระหม่อม และท้ายทอยของนกตีนเทียนในช่วงฤดูทำรังวางไข่ บริเวณเขตห้ามล่าสัตว์ป่าบึงบอระเพ็ด จังหวัดนครสวรรค์ พบว่าส่วนใหญ่มีสีขาว ทำให้ตั้งข้อสันนิษฐานว่าลักษณะสีขนบริเวณกระหม่อม และท้ายทอยไม่สามารถระบุเพศนกตีนเทียนได้อย่างชัดเจน

วิธีการในการระบุเพศนกมีหลากหลายวิธี เช่น การสังเกตพฤติกรรมของนก (behavior observation) การจับตะเกียบหรือกระดูกเชิงกราน (pelvic bone test) การผ่าดูอวัยวะภายใน (laparotomy) การส่องกล้องดูอวัยวะภายใน (laparoscopy) และการตรวจสอบโครโมโซม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(Morinha และคณะ, 2012) เป็นต้น แต่วิธีการข้างต้นใช้เวลานาน มีค่าใช้จ่ายสูง และบางครั้งทำให้นกได้รับบาดเจ็บ ทั้งนี้จึงจำเป็นต้องใช้เทคนิคระดับโมเลกุล (molecular technique) ที่รวดเร็วกว่าในการระบุเพศนก โดยเฉพาะเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) ซึ่งนิยมใช้ในการเปรียบเทียบความแตกต่างของยีน *chromosome-helicase-DNA-binding* (*CHD* gene) ที่อยู่บนโครโมโซมเพศของนก (Griffith และคณะ, 1998; Kahn และคณะ, 1998; Fridolfsson และ Ellegren, 1999) นอกจากยีน *CHD* แล้ว ปัจจุบันยังมียีนอื่นที่ใช้ในการระบุเพศนก เช่น ยีน *0.6 kb EcoRI* (*EE0.6*) ที่มีรายงานในการระบุเพศนกอีมู และนกระจอกเทศ (Ogawa และคณะ, 1997) ยีน *Drosophila Nipped-B homolog* (*NIPBL*) ใช้ระบุเพศนกจำพวก Neoave ซึ่งอยู่ในชั้นย่อย (subclass) Neornithes (Suh และคณะ, 2011) และ ยีน *RAS p21 protein activator 1 (RASA1)* ซึ่งใช้ระบุเพศนกในวงศ์ไก่ฟ้า และนกกระทา (Li และคณะ, 2012) เป็นต้น

นกในฤดูทำรังวางไข่ และฤดูอพยพ มีความผันแปรของสี และตำแหน่งสีบริเวณกระหม่อม และท้ายทอย ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Xeira (1987) ที่พบความหลากหลายของสีบริเวณกระหม่อมและท้ายทอยของนกตีนเทียนในประเทศโปรตุเกส และการสำรวจนกตีนเทียน (*H. himantopus*) ในประเทศอินเดีย พบว่านกตีนเทียนในช่วงฤดูหนาวมีสีขนบริเวณกระหม่อมเป็นสีดำ และจะไม่พบลักษณะกระหม่อมสีดำในฤดูร้อน (Parasharya และคณะ, 2010) จึงสนใจที่จะศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกตีนเทียนในประเทศไทย ทั้งในฤดูทำรังวางไข่ และฤดูอพยพ รวมทั้งเปรียบเทียบความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างสองฤดู โดยการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกนิยมศึกษาด้วยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) ในตำแหน่งต่างๆ เช่น *ATPase subunit 6/8* (Rheindt และคณะ, 2011) ยีน *small ribosomal subunit* (*12S rDNA*) ยีน *NADH dehydrogenase subunit 2* (*ND2* gene) และ ยีน *cytochrome b* (*cyt b*) (Pereira และ Baker, 2008) และยีน *cytochrome c oxidase I* (*COI*) ซึ่งนิยมใช้ในการจำแนกสปีชีส์ของสัตว์ (Hebert และคณะ, 2004) เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีเทคนิคอื่นที่ใช้ในการศึกษา เช่น เทคนิค random amplification of polymorphic DNA (RAPD) ศึกษาความหลากหลายของนก black francolin (*Francolinus francolinus*) (Riaz และคณะ, 2011) และนก guinea fowl (*Numida meleagris*) (Bawej และคณะ, 2012) เทคนิค amplfied fragment length polymorphism (AFLP) ศึกษาความหลากหลายในนก bluethroat (*Luscinia svecica*) (Questiau และคณะ, 1999) นกนางนวล (herring gull; *Larus argentatus*) (Knijff และคณะ, 2001) และนก wilson's warblers (*Wilsonia pusilla*) (Irwin และคณะ, 2011) นอกจากนี้ยังมีเทคนิค inter-primer biding site หรือ iPBS (Kalendar และคณะ, 2010) ที่มีรายงานการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในพืชหลากหลายชนิด เช่น การศึกษา *Saussurea esthonica* สายพันธุ์ลัตเวีย และเอสโตเนีย (Gailite และคณะ, 2011) การศึกษาพืชสกุลมะพลับ (*Diospyros*) (Raddova และคณะ, 2012) การศึกษาความหลากหลายของฝรั่ง (*Psidium guajava*) (Mehmood

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และคณะ, 2013) และการศึกษาความหลากหลายขององุ่น (Guo และคณะ, 2014) รวมทั้งการศึกษาของ Kalendar และคณะ (2010) ศึกษาความหลากหลายในวัว (*Bos bovis*) จามรี (*Bos grunniens*) ไก่ (*Gallus gallus*) และแกะ (*Ovis aries*) อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานการใช้เทคนิค iPBS ในการศึกษาความหลากหลายของนก แต่มีการศึกษาในไก่ซึ่งมีความใกล้เคียงกับนก จึงสนใจนำเทคนิคนี้มาศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกตีนเทียนในประเทศไทย

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 เพื่อระบุเพศของนกตีนเทียนด้วยเทคนิคระดับโมเลกุล

1.2.2 เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกในสกุลตีนเทียนบริเวณประเทศไทย

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

ศึกษาและเก็บตัวอย่างนกสกุลตีนเทียนร่วมกับเจ้าหน้าที่จากกลุ่มงานวิจัยสัตว์ป่า สำนักอนุรักษ์สัตว์ป่า กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช ในบริเวณเขตห้ามล่าสัตว์ป่าบึงบอระเพ็ด จังหวัดนครสวรรค์ ช่วงฤดูทำรังวางไข่ระหว่างเดือนเมษายนถึงเดือนมิถุนายน และฤดูอพยพระหว่างเดือนธันวาคมถึงเดือนมกราคม ระหว่างปีพุทธศักราช 2556-2558

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

หากงานวิจัยนี้ประสบผลสำเร็จ จะสามารถ

1.4.1 ระบุเพศนกตีนเทียน เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ทั้งการศึกษาโครงสร้างประชากร และการศึกษาอัตราส่วนระหว่างเพศ ซึ่งจะเป็นข้อมูลพื้นฐานศึกษาด้านประชากรนกในอนาคต

1.4.2 ทราบความหลากหลายทางพันธุกรรมและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของนกในสกุลตีนเทียน เพื่อเป็นประโยชน์ต่อการสำรวจชนิดของนกตีนเทียนในฤดูทำรังวางไข่ และฤดูอพยพในประเทศไทย อีกทั้งยังสามารถเปรียบเทียบสปีชีส์ของนกกับต่างประเทศจากฐานข้อมูล GenBank

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 นกในสกุลตีนเทียน (genus *Himantopus*)

นกในสกุลตีนเทียน (genus *Himantopus*) อยู่ในวงศ์ Recurvirostridae เป็นนกที่สามารถพบได้ทั่วโลก โดยลักษณะของนกในสกุลนี้ คือ มีปากยาวตรง และเรียว ปีกยาว ปลายปีกแหลม ขนปลายปีกเส้นนอกสุดยาวที่สุด หางสั้น ขนหางทุกเส้นยาวเท่ากัน และขายาว (โอภาส, 2543) ทั้งนี้จากการค้นคว้าข้อมูลพบว่ายังมีความสับสนในการจัดจำแนกสปีชีส์ของนกในสกุลนี้ โดยจากการจำแนกของ International Ornithological Committee World Bird List version 5.1 (2015) จัดจำแนกนกในสกุลตีนเทียนเป็น 5 สปีชีส์ ตามถิ่นที่อยู่อาศัยของนกแต่ละสปีชีส์ คือ *H. himantopus* (black-winged stilt) อาศัยอยู่บริเวณทวีปยุโรป เอเชีย และแอฟริกา *H. leucocephalus* (white-headed stilt) อาศัยอยู่บริเวณประเทศออสเตรเลีย นิวซีแลนด์ และหมู่เกาะใกล้เคียงในมหาสมุทรแปซิฟิก *H. novaezelandiae* (black stilt) พบอยู่ที่ประเทศนิวซีแลนด์เท่านั้น *H. melanurus* (white-backed stilt) อาศัยอยู่ในทวีปอเมริกาใต้ และ *H. mexicanus* (black-necked stilt) พบอยู่ทางตอนใต้ของทวีปอเมริกาเหนือ รวมถึงตอนกลางและตอนใต้ของทวีปอเมริกาใต้ แต่อย่างไรก็ตาม BirdLife International (2015) และ The International Union for Conservation of Nature (IUCN) Red List of Threatened (2014) แบ่งนกในสกุลตีนเทียนออกเป็น 2 สปีชีส์ คือ (1) black-winged stilt (*Himantopus himantopus*) และ (2) black stilt (*Himantopus novaezelandiae*) โดยสปีชีส์ *H. himantopus*, *H. leucocephalus*, *H. mexicanus* รวมทั้ง *H. melanurus* จะจัดอยู่ในสปีชีส์เดียวกัน ซึ่งสอดคล้องกับการประชุมครั้งที่ 11 ของ Convention on Migratory Species (CMS) ในปี 2014 ที่มีการย้าย *H. leucocephalus* และ *H. mexicanus* รวมเป็น *H. himantopus* เพียงสปีชีส์เดียว

สำหรับในประเทศไทยพบเพียง *H. himantopus* (black-winged stilt) หรือในประเทศไทยเรียกว่านกตีนเทียน (โอภาส, 2543) ลักษณะของนกตีนเทียน คือ มีปากยาวสีดำ และเรียวแหลม ปีกยาวแหลมสีดำ ขายาวสีชมพู ลำตัวส่วนล่างเป็นสีขาว สะโพกและขนคลุมโคนหางสีขาว ดังรูปที่ 2.1ก ตัวผู้และตัวเมีย สีสันแตกต่างกันเล็กน้อย ตัวผู้มีสีบริเวณกระหม่อม และท้ายทอยเป็นสีขาว บางตัวอาจมีสีดำบริเวณกระหม่อม และท้ายทอย บางตัวมีสีดำบริเวณท้ายทอยชัดเจน ซึ่งเชื่อว่าเป็น *H. leucocephalus* (white-headed stilt) หรืออาจเป็นชุดขนที่พบได้น้อยในนกตีนเทียนเท่านั้น (จารุจินต์ และคณะ, 2555) ตัวเมียบริเวณหลัง และช่วงไหล่เป็นสีน้ำตาลเข้ม กระหม่อม และท้ายทอยเป็นสีเทา ตัวไม่เต็มวัยลักษณะคล้ายกับตัวเมีย แต่กระหม่อมและท้ายทอยเป็นสีเทา

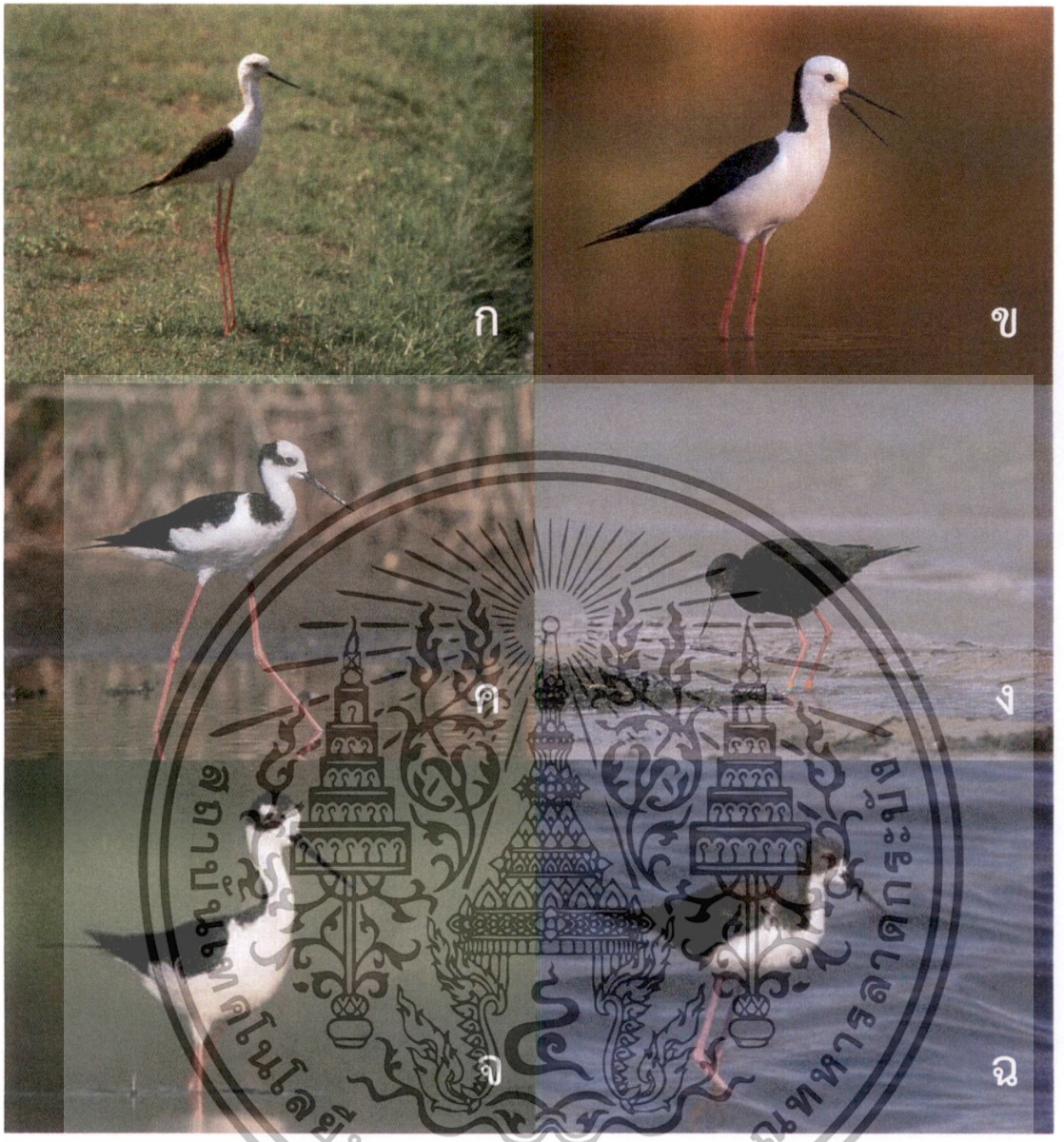
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นกตีนเทียนมีอุปนิสัยการอาหาร และกิจกรรมในเวลากลางวัน โดยอาศัยอยู่ตามแหล่งน้ำขนาดใหญ่ทั้งในน้ำจืด และน้ำทะเล เช่น บึง หนอง ทะเลสาบ อ่างเก็บน้ำ นาข้าว นากุ้ง นาเกลือ และชายเลน (โอภาส, 2543) นกตีนเทียนทำรังวางไข่ในช่วงฤดูร้อนระหว่างเดือนเมษายนถึงเดือนมิถุนายน ทำรังรวมกันเป็นกลุ่มบนหญ้าหรือเนินดินใกล้กับแหล่งน้ำที่ใช้หากิน ในประเทศไทยพบการทำรังวางไข่ครั้งแรกในปี พ.ศ. 2535 (วิเชียร, 2537) และยังพบการทำรังวางไข่จนถึงปัจจุบัน (ไกรรัตน์, 2549) ทั้งนี้มีเพียงการศึกษาของอภิษฎา และคณะ (2557) ที่ศึกษาการกระจายของรังนกตีนเทียนในบึงบอระเพ็ด สภาพพื้นที่ในการสร้างรังวางไข่ ลักษณะของรัง รูปร่าง ลักษณะของไข่ และพฤติกรรมการฟักไข่ของนกตีนเทียน

สำหรับ *H. leucocephalus* (white-headed stilt) พบมีการกระจายพันธุ์บริเวณประเทศออสเตรเลีย นิวซีแลนด์ และหมู่เกาะใกล้เคียงในมหาสมุทรแปซิฟิก มีลักษณะคล้ายกับ *H. himantopus* แตกต่างกันตรงบริเวณกระหม่อมและท้ายทอยมีสีขาว สีเทา หรือดำเข้ม (รูปที่ 2.1ข) อีกสปีชีส์หนึ่งของนกสกุลตีนเทียนคือ *H. melanurus* (white-backed stilt) มีการกระจายพันธุ์บริเวณทวีปอเมริกาใต้ มีลักษณะทั่วไปคล้ายกับ *H. himantopus* โดยกระหม่อมสีขาว มีวงแหวนสีขาวพาดบริเวณหลัง ด้านล่างลำตัวสีขาว ขายาวสีชมพู และมีวงแหวนสีดำคาดมาบริเวณตา ดังรูปที่ 2.1ค และ *H. mexicanus* (black-necked stilt) กระจายพันธุ์อยู่บริเวณทวีปอเมริกาเหนือตอนล่างถึงตอนเหนือของประเทศเปรู และตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศบราซิล สามารถแบ่งออกเป็น 2 ชนิดย่อย คือ black-necked stilt: *H. mexicanus mexicanus* และ hawaiian stilt: *H. mexicanus knudseni* (Robinson และคณะ, 1999) โดยทั่วไป black-necked stilt (*H. mexicanus mexicanus*) มีลักษณะหัวสีขาว ขอบตาด้านล่างสีดำ มีจุดสีขาวบริเวณขอบตาด้านบน ลำคอสีดำ ลำตัวด้านล่างสีขาว ไม่มีขอบสีขาวพาดบริเวณลำคอ ดังรูปที่ 2.1จ ส่วน hawaiian stilt (*H. mexicanus knudseni*) สีดำบริเวณขอบตาล่างจะอยู่ต่ำกว่านก black-necked stilt (รูปที่ 2.1 ฉ)

สำหรับ black stilt หรือ *H. novaezelandiae* มีการกระจายพันธุ์บริเวณประเทศนิวซีแลนด์เป็นนกชนิดเดียวในสกุลนี้ที่มีขนสีดำตลอดทั้งตัว (รูปที่ 2.1ง) มีการศึกษาของ Steeves และคณะ (2010) เกี่ยวกับการผสมกันระหว่าง black stilt (*H. novaezelandiae*) และ black-winged stilt (*H. himantopus*) จึงอาจคาดเดาว่านกดังกล่าวมีความใกล้ชิด และมีความเหมือนกันทางพันธุกรรม (genetic similarity) ทำให้มีการรายงานเกี่ยวกับการผสมภายในสกุลตีนเทียน ซึ่งอยู่ในวงศ์ Recurvirostridae เดียวกัน (intrageneric hybrids)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.1 แสดงลักษณะนกในสกุลตีนเทียน ก : *Himantopus himantopus* (black-winged stilt) ข : *H. leucocephalus* (white-headed stilt) ค: *H. melanurus* (white-backed stilt) ง : *H. novaezelandiae* (black stilt) จ : *H. mexicanus mexicanus* (black-necked stilt) และ ฉ : *H. mexicanus knudseni* (hawaiian stilt)

ที่มา : รูป ก ถ่ายโดยสุรชาติ กมลดิลก และรูป ข-ฉ http://www.arkive.org/

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นอกจากนั้นแล้วยังมีรายงานของ Morlan และคณะ (2004) เกี่ยวกับการผสมพันธุ์ระหว่าง american avocet (*Recurvirostra americana*) และ black-necked stilt (*H. mexicanus*) ในสภาพกรงเลี้ยง พบว่าลูกผสมที่ได้มีลักษณะคล้าย american avocet ที่ปกติมีลักษณะปากเรียวยาว ปลายปากงอนขึ้น ขาสีเทา แต่ในลูกผสมพบว่าปากสั้นลง ปลายปากงอนน้อยลง และสีขาเปลี่ยนไปจากสีเทา ซึ่งลักษณะดังกล่าวตรงกับนกลูกผสมที่พบตามธรรมชาติในแคลิฟอร์เนีย ประเทศสหรัฐอเมริกา ที่พบและสังเกตโดย Herbert, Clarke และ Rosso ในปี 1994 รวมทั้ง Dakin ในปี 2003

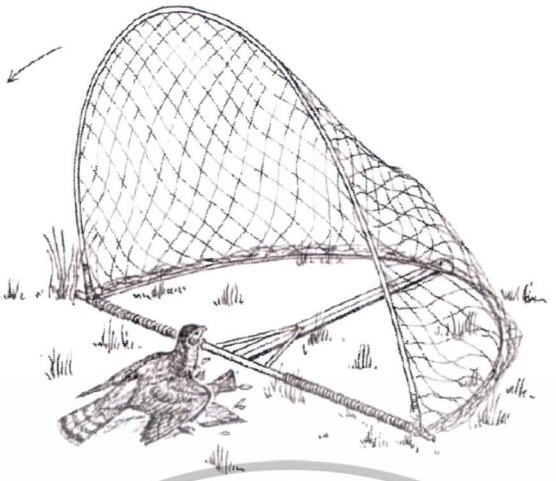
อย่างไรก็ตามจากการศึกษาของ Parasharya และคณะ (2010) สังเกตพฤติกรรมของ black-winged stilt (*H. himantopus*) พบว่าในช่วงฤดูหนาว สีดำบริเวณกระหม่อม และท้ายของนกมีรูปแบบหลากหลาย ซึ่งจะไม่พบลักษณะสีดำนี้ในช่วงฤดูร้อน จึงสันนิษฐานไว้ 2 กรณี คือในช่วงฤดูหนาวที่พบนกที่มีกระหม่อม และท้ายทอยสีดำนั้นเป็นนกอพยพที่มาจากหลากหลายสถานที่ หรือสีดำบริเวณกระหม่อม และท้ายทอยจะหายไปในช่วงฤดูร้อน หรือฤดูที่มีการทำรังวางไข่ หรือกล่าวอีกนัยหนึ่งคือ เมื่อเป็นตัวเต็มวัยนั่นเอง

2.2 วิธีการดักจับนก

การดักจับนกในธรรมชาติเพื่อใช้ในการศึกษาวิจัย จำเป็นจะต้องคำนึงถึงความปลอดภัยของนกเป็นอันดับแรก การเลือกใช้กับดักให้เหมาะสมจึงมีความสำคัญ จะต้องรู้จักพฤติกรรมของนกในฤดูต่างๆ (Bloom และคณะ, 2007) โดยการดักจับนกมีหลายวิธี เช่น box trap, the dho-gaza, mist net, walk-in trap, bow net และ cannon net เป็นต้น

ในการดักจับนกตีนเทียนในช่วงฤดูทำรังวางไข่ ซึ่งนกจะฟักไข่อยู่บริเวณรัง เจ้าหน้าที่จากสถานีวิจัยสัตว์ป่าบึงบอระเพ็ดจึงสร้างกับดักนก โดยพัฒนามาจากอุปกรณ์ดักสัตว์อื่นๆ และมีลักษณะคล้าย bow net ซึ่งเป็นกับดักที่ประกอบด้วยครึ่งวงกลมจำนวน 2 อัน ตาข่ายซึ่งติดอยู่กับครึ่งวงกลม บานพับและขดสปริงซึ่งใช้เชื่อมระหว่างครึ่งวงกลม ครึ่งวงกลมอันแรกวางไว้ที่พื้น ส่วนอีกอันหนึ่งตั้งฉากกับพื้น ดังรูปที่ 2.2 เมื่อนกเข้ามาบริเวณครึ่งวงกลมส่วนที่ตั้งฉาก จะดีดลงที่พื้นเพื่อขังนกไว้ การดักจับนกด้วยวิธี bow net เริ่มแรกออกแบบมาเพื่อจับนกจำพวกนกล่าเหยื่อ (raptor) เช่น นกเหยี่ยว (hawks และ falcons) นกอินทรี (eagles) แร้ง (vultures) นกพวกนกแสก (barn owls) ที่มีขนาดเล็ก เป็นต้น แต่สามารถปรับปรุงเพื่อใช้ในการจับนกที่มีขนาดใหญ่ขึ้นได้ (Bloom และคณะ, 2007) ในการทดลองนี้อุปกรณ์ดักจับนกที่ใช้นั้น ครึ่งวงกลมทั้งสองส่วนจะวางทำมุม 180 องศา และมีเชือกที่ขึงตึงวางผ่านบริเวณกึ่งกลางรังของนก เมื่อนกตีนเทียนเข้ามาเพื่อกกไข่จะมีน้ำหนักกดทับ ทำให้สปริงที่ติดกับครึ่งวงกลม ดีดคลุมตัวนก ซึ่งเรียกอุปกรณ์ดักจับนี้ใหม่ว่า spring trap

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.2 แสดงรูปการดักจับนกด้วยวิธี bow net

ที่มา : Bloom และคณะ (2007)

นกตีนเทียนที่พบในช่วงฤดูอพยพจะมีพฤติกรรมรวมกันเป็นฝูงจำนวนมาก จึงใช้การดักจับนกด้วยวิธีท่อส่งตาข่าย (cannon net) ซึ่งเป็นวิธีที่ออกแบบมาเพื่อจับนกที่มีขนาดใหญ่ หรือเป็นนกที่อยู่รวมกันเป็นฝูง เพื่อให้ได้นกครั้งละมากๆ ในพื้นที่จำกัด (ฑิฐิ และคณะ, 2554ก) องค์ประกอบหลักของอุปกรณ์ชนิดนี้ คือ ชุดท่อส่งตาข่าย (cannon) มีรูสำหรับใส่ดินปืนด้านใน ตุ้มเหล็กส่งตาข่าย (projectile) เป็นอุปกรณ์ที่จะถูกยิงออกจากท่อส่งซึ่งเชื่อมกับตาข่ายดักนก (net) เมื่อตุ้มเหล็กถูกยิงออกไป ตุ้มเหล็กจะเป็นตัวช่วยให้ตาข่ายกางออกคลุมตัวนกบริเวณนั้นทั้งหมด ดังรูปที่ 2.3 แสดงวิธีการตั้งท่อส่งตาข่าย เพื่อเตรียมดักจับนก

รูปที่ 2.3 แสดงลักษณะการดักจับนกด้วยวิธีท่อส่งตาข่าย (cannon net)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 การระบุเพศนก

การระบุเพศนกทั่วไป สามารถระบุได้จากลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกที่แตกต่างกันระหว่างเพศผู้และเพศเมีย เช่น ขนาดรูปร่าง สีขน เสียง หรือพฤติกรรมการแสดงออก เรียกลักษณะนี้ว่า sexually dimorphic birds ส่วนนกที่ไม่สามารถระบุเพศได้จากลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอก เรียกว่า sexually monomorphic birds นกส่วนใหญ่บนโลกไม่สามารถระบุเพศได้จากลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอก (Morinha และคณะ, 2012) แม้ว่าจะโตเต็มวัยแล้วก็ตาม การระบุเพศนกมีความสำคัญต่อการศึกษาโครงสร้างประชากร และการศึกษาอัตราส่วนระหว่างเพศ ซึ่งจะเป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อศึกษาด้านประชากรนกในอนาคต วิธีการแยกเพศในนกสวยงามปัจจุบันสามารถทำได้หลายวิธีดังนี้ (ธนาธิป, 2009)

การแยกเพศโดยดูจากลักษณะภายนอก (external appearance) วิธีนี้ใช้ได้กับนกบางประเภทที่มีลักษณะภายนอกแตกต่างกันอย่างชัดเจนระหว่างเพศผู้ และเพศเมีย เช่น ขนาดหัว สีบริเวณจมูกในฤดูผสมพันธุ์ เป็นต้น แต่นกบางชนิดต้องอยู่ในช่วงอายุที่เหมาะสมจึงจะสามารถแยกเพศได้เพราะจะแสดงลักษณะที่แตกต่างกันออกมาให้เห็น

การคลำตรวจลักษณะทางกายวิภาคของช่องเชิงกรานและทวารรวม (examination of the pelvic girdle and cloaca) เป็นวิธีการที่ทำได้โดยการจับคลำบริเวณอุ้งเชิงกรานด้านล่างของนก ปกติแล้วนกเป็นสัตว์ที่มีอุ้งเชิงกรานด้านล่างไม่เชื่อมติดกัน (Bone, 1988) ซึ่งต่างกับสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่กระดูกเชิงกรานด้านล่างเชื่อมกันสนิท ทั้งนี้เป็นเพราะกระบวนการวิวัฒนาการเพื่อการปรับตัวทางกายวิภาคของร่างกายให้เหมาะสมกับการวางไข่ นกเพศเมียจะมีลักษณะของอุ้งเชิงกรานที่ขยายกว้างมากกว่าเพศผู้ หากผู้ปฏิบัติมีความชำนาญมากพอก็อาจจะแยกแยะความแตกต่างระหว่างนกเพศผู้ และเพศเมียได้จากการคลำตรวจบริเวณนี้ แต่วิธีนี้มีโอกาสผิดพลาดสูงพอสมควรขึ้นอยู่กับประสบการณ์ของผู้ปฏิบัติ นอกจากนี้อายุของนกก็มีผลเป็นอย่างมากต่อการตรวจแยกเพศด้วยวิธีนี้ เนื่องจากนกที่อายุน้อยอุ้งเชิงกรานจะไม่ขยาย ทำให้การแยกแยะความแตกต่างระหว่างเพศผู้ และเพศเมียกระทำได้ยาก ในสัตว์ปีกบางชนิดสามารถแยกเพศได้จากการตรวจดูอวัยวะเพศ ซึ่งเป็นวิธีที่สามารถกระทำได้ในนกที่มีขนาดเล็กโดยการตรวจดูอวัยวะเพศบริเวณทวารรวม (cloaca) โดยตรวจดูการปรากฏของอวัยวะเพศผู้ (phallus) วิธีนี้เป็นวิธีที่ปฏิบัติโดยทั่วไปในการดูเพศลูกไก่หรือเป็ดซึ่งกระทำโดยการบีบช่องทวารรวมเพื่อตรวจดูอวัยวะเพศ แต่สำหรับนกขนาดเล็กแล้วอาจปฏิบัติได้ยากและไม่เป็นที่นิยม จากการทดลองของ Boersma และ Davies (1987) พบว่านกที่ไม่ได้อยู่ในวัยเจริญพันธุ์นั้นการแยกเพศด้วยวิธีนี้ไม่สามารถใช้ได้ผล เนื่องจากนกที่ไม่ได้อยู่ในวัยเจริญพันธุ์นั้นเพศเมียจะมีขนาดของช่องทวารรวมใกล้เคียงกับเพศผู้

การสังเกตพฤติกรรม (behavioral observation) วิธีนี้ใช้ได้เมื่อนกอยู่ในช่วงวัยเจริญพันธุ์ โดยนกอาจจะแสดงพฤติกรรมบางอย่างที่บ่งบอกลักษณะเพศ เช่น นกคอกคาเทลเพศผู้มักจะมีพฤติกรรมส่งเสียงร้องบ่อยครั้งซึ่งบางคนอาจเรียกว่า “ร้องเพลง” หรือในนกหลายๆ ชนิดนกตัวผู้อาจจะแสดง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พฤติกรรมการเกี้ยวพาราสี หรือขึ้นผสมพันธุ์ แต่ก็อาจพบนกที่มีพฤติกรรมเกี้ยวพาราสีหรือขึ้นผสมพันธุ์นกเพศเดียวกัน

การระบุเพศด้วยลักษณะสัณฐานวิทยาภายใน เป็นการตรวจสอบอวัยวะสืบพันธุ์ของนก โดยการผ่า (laparotomy) และส่องกล้องเพื่อดูอวัยวะสืบพันธุ์ (laparoscopy) ซึ่งจะอยู่ใกล้กับกระดูกสันหลัง และชายโครงด้านล่าง เพศผู้จะมีอัณฑะ 2 อัน ส่วนเพศเมียมีรังไข่ 1 อัน อยู่ด้านซ้ายของตัวนก วิธีการนี้ถ้าผู้ที่ชำนาญการมาก จะสามารถตรวจสอบได้อย่างรวดเร็ว อย่างไรก็ตาม วิธีการนี้เป็นวิธีการที่ทำให้นกได้รับบาดเจ็บ และยิ่งมีความเสี่ยงมากขึ้นถ้านกมีขนาดเล็ก จึงไม่เหมาะที่จะใช้กับนกที่หายากและใกล้สูญพันธุ์ (Griffiths, 2000; สุคนทิพย์ และสายชล, 2549)

การตรวจวัดระดับสเตียรอยด์ฮอร์โมนในพลาสม่าหรือสิ่งขับถ่าย (measurement of steroid level in plasma or excrement) สามารถนำมาใช้ได้ในนก แต่ปริมาณของสเตียรอยด์ฮอร์โมนที่ถูกผลิตนั้นจะแปรผันไปตามอายุ ฤดูกาล และกิจกรรมทางเพศ จากความผันแปรของระดับฮอร์โมนดังกล่าว ทำให้เกิดความยุ่งยากในการแปลผลอัตราส่วนของระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนต่อแอนโดรเจน นอกจากนี้ยังเป็นวิธีที่ใช้เวลานานและมีค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูง ทำให้ปัจจุบันวิธีนี้ไม่ได้รับความนิยมในการใช้แยกเพศนก

การตรวจวิเคราะห์โครโมโซม (karyotype) เป็นการตรวจดูลักษณะของโครโมโซมเพศ ซึ่งมีความแตกต่างกันระหว่างนกเพศผู้ และเพศเมีย โดยนกเพศผู้จะมีลักษณะโครโมโซมเพศเป็น ZZ ซึ่งมีลักษณะเหมือนกันของคู่โครโมโซม (homogametic sex) ในขณะที่นกเพศเมียจะมีลักษณะโครโมโซมเพศเป็น ZW ซึ่งมีลักษณะที่แตกต่างกันของคู่โครโมโซม (heterogametic sex) โดยจะพบว่าโครโมโซม Z จะมีขนาดใหญ่ในขณะที่โครโมโซม W จะมีขนาดเล็กกว่า (Archawaranon, 2004) เนื่องจากในกระบวนการวิวัฒนาการนั้นโครโมโซม W จะมีการสูญเสียยีนบางส่วนไปส่งผลให้โครโมโซม W มีขนาดสั้นลง การแยกเพศนกด้วยวิธีนี้ค่อนข้างยุ่งยากและใช้เวลานานในการเตรียมตัวอย่างโครโมโซม ปัจจุบันมักใช้เฉพาะในงานวิจัยเท่านั้น

นอกจากนี้ยังมีการระบุเพศนกจากโครโมโซม เนื่องจากนกมีโครโมโซมแตกต่างจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ประกอบด้วยสองส่วนคือ โครโมโซมร่างกาย (autosome) และโครโมโซมเพศ (sex chromosome) โดยโครโมโซมเพศจะมีแท่งหนึ่งจากพ่อ อีกแท่งหนึ่งจากแม่ เพศผู้เป็นแบบ heterogametic ประกอบด้วยโครโมโซม X และ Y ส่วนเพศเมียเป็นแบบ homogametic ประกอบด้วยโครโมโซม X จำนวน 2 แท่ง ซึ่งโครโมโซมเพศในนกมีการเรียกชื่อที่แตกต่างกับสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม คือ เพศผู้มีโครโมโซมแบบ homogametic (ZZ) ส่วนเพศเมียมีโครโมโซมแบบ heterogametic (ZW) ในการดูโครโมโซมด้วยกล้องจุลทรรศน์จะพบขนาดของโครโมโซมที่แตกต่างกัน จากรายงานการวิจัยของ Archawaranon (2004) ระบุเพศของนกเอี้ยงหรือนกขุนทอง (*Gracula religiosa*) ในประเทศไทย พบว่าจำนวนโครโมโซมโดยเฉลี่ยของนกขุนทองมีค่าเท่ากับ 80 แท่ง การระบุเพศนกโดยการตรวจสอบโครโมโซมนั้น อาศัยความแตกต่างของขนาดโครโมโซมเพศ โดย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครโมโซม Z จะมีขนาดใหญ่กว่าโครโมโซม W แต่การระบุเพศนกจากโครโมโซมนั้น มีกระบวนการที่ยุ่งยาก ใช้เวลานาน จึงไม่นิยมใช้ในการระบุเพศนก (Parker และคณะ, 1991)

2.4 การสกัดดีเอ็นเอและระบุเพศนกโดยเทคนิคระดับโมเลกุล

ในการใช้เทคนิคระดับโมเลกุล (molecular technique) จำเป็นจะต้องมีดีเอ็นเอต้นแบบที่มีคุณภาพ สำหรับนกนิยมนำขน และนกมาสกัดดีเอ็นเอ (Jenson และคณะ, 2003; Harvey และคณะ, 2006) นอกจากนี้ยังมีดีเอ็นเอที่สกัดจากเนื้อเยื่อบริเวณปีก (Morinha และคณะ, 2011) ผิวหนังบริเวณนิ้วเท้า (Bantock และคณะ, 2008) เปลือกไข่ (Bush และคณะ, 2005) และอุจจาระ (Idaghdour และคณะ, 2003) เป็นต้น อีกทางเลือกหนึ่งคือการเก็บเลือดบนกระดาษ FTA (FTA® databasing paper) (Smith และ Burgoyne, 2004) FTA® cards (Whatman International) เป็นกระดาษซึ่งเคลือบด้วยสารเคมีที่สามารถย่อยสลายเซลล์ ทำลายโปรตีน ป้องกันการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย รวมทั้งสามารถปกป้องกรดนิวคลีอิกจากเอนไซม์นิวคลีเอส ปัจจุบันพบการนำกระดาษ FTA มาใช้ในการเก็บตัวอย่าง เช่น งานวิจัยของ Garcia และคณะ (2008) เก็บตัวอย่างเลือดนกแร้งเครา (*Gypaetus barbatus*) ลงบนกระดาษ FTA เปรียบเทียบกับการเก็บตัวอย่างขน เพื่อระบุเพศของนก พบว่ากระดาษ FTA ที่ใช้กักเก็บดีเอ็นเอให้ผลการทดลองที่ไม่แตกต่างจากการสกัดดีเอ็นเอจากขน แต่กระดาษ FTA มีราคาถูก และรวดเร็วกว่าการสกัดดีเอ็นเอ อย่างไรก็ตามหากต้องการตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของนก ซึ่งต้องใช้ดีเอ็นเอปริมาณมาก การสกัดดีเอ็นเอที่ได้ปริมาณมาก เช่น การสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อ การสกัดดีเอ็นเอจากเลือด เป็นต้น

การระบุเพศนกด้วยลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกซับซ้อน และยากสำหรับนกจำพวก sexually monomorphic รวมทั้งนกที่ยังโตไม่เต็มวัย จากงานวิจัยของ Morinha และคณะ (2012) ได้รวบรวมข้อมูลเกี่ยวกับการระบุเพศนกด้วยเทคนิคระดับโมเลกุล ซึ่งเป็นทางเลือกที่ดีในการระบุเพศนก เนื่องจากมีความรวดเร็วและแม่นยำ จากการรายงานของ Griffiths และ Tiwari (1995) ที่ค้นพบยีน *chromodomain helicase DNA binding protein* (*CHD* gene) บนโครโมโซม W ของนก ต่อมาพบว่ามียีนลักษณะเช่นเดียวกันบนโครโมโซม Z (Griffiths และ Korn, 1997) การตรวจสอบยีน *CHD* อาศัยหลักการความแตกต่างของขนาดอินตรอน (intron) ระหว่างอัลลีล *CHD-Z* ที่อยู่บนโครโมโซม Z และอัลลีล *CHD-W* ที่อยู่บนโครโมโซม W (Kahn และคณะ, 1998) การเพิ่มปริมาณยีน *CHD* ด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) มีไพรเมอร์ที่นิยมใช้ในการระบุเพศหลายคู่ ได้แก่ ไพรเมอร์ P2/P8 (Griffiths และคณะ, 1998) ไพรเมอร์ 1237L/1272H (Kahn และคณะ, 1998) และไพรเมอร์ 2550F/2718R (Fridolfsson และ Ellegren, 1999) เมื่อตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส จะพบว่า เกิด 1 แถบของเพศผู้ (ZZ) และ 2 แถบของเพศเมีย (ZW) จากงานวิจัยที่มีการใช้ไพรเมอร์ 3 คู่ ในการระบุเพศนก ดังเช่น Watson และคณะ (2004) ระบุเพศนกกินหอยปากแดง (*Haematopus ostralegus*) ซึ่งเป็นนกในวงศ์เดียวกับนกสกุลตีนเทียน โดยการเพิ่ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปริมาณยีน *CHD* ด้วยไพรเมอร์ P2/P8 พบว่านกเพศผู้เกิด 1 แถบ ขนาด 380 คู่เบส และเพศเมียเกิด 2 แถบ ขนาด 380 และ 400 คู่เบส จากงานวิจัยของณิชาภัทร และคณะ (2013) ระบุเพศนกสกุลหัวโตเล็ก (genus *Charadrius*) ได้แก่ นกหัวโตทรายเล็ก (*Charadrius mongolus*) นกหัวโตทรายใหญ่ (*C. leschenaultii*) และหัวโตขาดำ (*C. alexandrinus*) โดยการเพิ่มปริมาณยีน *CHD* ด้วยไพรเมอร์ 3 คู่ คือ ไพรเมอร์ P2/P8 ไพรเมอร์ 1237L/1272H และไพรเมอร์ 2550F/2718R พบว่าไพรเมอร์ 2550F/2718R มีความเหมาะสมในการระบุเพศนกในสกุลหัวโตเล็กมากที่สุด โดยเพศผู้เกิด 1 แถบ ขนาด 650 คู่เบส และเพศเมียเกิด 2 แถบ ขนาด 450 และ 650 คู่เบส

นอกจากยีน *CHD* ยังมียีนตำแหน่งอื่นที่ใช้ในการระบุเพศนก เช่น Ogawa และคณะ (1997) ระบุเพศนกอีมู (*Dromaius novaehollandiae*) และนกกระจอกเทศ (*Struthio camelus*) จากยีน *0.6 kb EcoRI* (*EE0.6*) รวมทั้งยีน *Drosophila Nipped-B homolog* (*NIPBL*) ที่ใช้ระบุเพศนกจำพวก Neoave ซึ่งอยู่ในชั้นย่อย (subclass) Neornithes (Suh และคณะ, 2011) และ ยีน *RAS p21 protein activator 1 (RASA1)* ซึ่งใช้ระบุเพศนกในวงศ์ไก่ฟ้า และนกกระทา (Li และคณะ, 2012)

2.5 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์

การศึกษาความหลากหลายของสิ่งมีชีวิต และการเปรียบเทียบความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการระหว่างสิ่งมีชีวิต ในปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์พยายามนำเทคนิคระดับโมเลกุล มาช่วยหาข้อมูลเพิ่มเติมจากที่เคยใช้ข้อมูลทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียว (เจษฎา, 2555) เช่น การจัดเรียงลำดับกรดอะมิโน (amino acid sequencing) เครื่องหมายไอโซเอนไซม์ (isoenzyme gene markers) เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA markers) เป็นต้น ปัจจุบันเทคนิคระดับโมเลกุลที่ใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตมีหลายวิธี เช่น การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) เทคนิค RAPD (random amplified polymorphic DNA) เทคนิค AFLP (amplified fragment length polymorphisms) เทคนิค PCR-SSR (simple sequence repeat หรือ microsattellites) เทคนิค RFLP (restriction fragment length polymorphism) และเทคนิค iPBS (inter-primer binding site) เป็นต้น

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมนิยมศึกษาด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ ซึ่งจะศึกษาจากยีนในนิวเคลียส หรือไมโทคอนเดรียตำแหน่งต่างๆ เช่น งานวิจัยของ Paton และ Baker (2006) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ในนิวเคลียส และไมโทคอนเดรียของนกในอันดับ Charadriiform โดยวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จากตำแหน่งยีนในนิวเคลียสบริเวณ *recombination activating* (*RAG-1*) และ myoglobin intron รวมทั้งยีนในไมโทคอนเดรียบริเวณ *cytochrome b* (*Cyt b*) พบว่าการวิเคราะห์ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์สายยาวเป็นข้อมูลที่ดีในการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม เนื่องจากยีน *NADH dehydrogenase subunit 2* (*ND2*)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

NADH dehydrogenase subunit 4 (*ND4*) *NADH dehydrogenase subunit 5* (*ND5*) และ *cytochrome c oxidase I* (*COI*) มีความแปรปรวนของลำดับนิวคลีโอไทด์มาก จึงเหมาะสมที่จะนำมาศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของวงศ์นกชายเลน เช่นเดียวกับ Rheindt และคณะ (2011) ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนในไมโทคอนเดรีย 3 ตำแหน่ง คือ *ND3*, *ATPase 6/8* และ *control region* ในนกหัวโตหน้าขาว (*Charadrius alexandrius dealbatus*) ที่เป็นสปีชีส์ย่อยของนกหัวโตขาดำ (*C. alexandrius*) เปรียบเทียบกับลักษณะสัณฐานวิทยา พบว่านกหัวโตหน้าขาว (*C. a. dealbatus*) และนกหัวโตขาดำ (*C. alexandrius*) มีความแตกต่างกันเล็กน้อย แต่นกหัวโตหน้าขาวมีความแตกต่างจาก *C. a. ruficapillus, C. a. peronii, C. marginatus* และ *C. a. nivosus* จากงานวิจัยของ Hebert และคณะ (2004) ใช้ยีน *COI* ในการศึกษาความหลายหลายทางพันธุกรรมและจัดกลุ่มนกในทวีปอเมริกาเหนือจำนวน 260 สปีชีส์ พบว่ายีน *COI* เป็นยีนที่เหมาะในการแยกความแตกต่างในระดับสปีชีส์ของกลุ่มตัวอย่างที่ศึกษา

นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยของ MacAvoy และ Champber (1999) ซึ่งศึกษานกในสกุลตีนเทียนบริเวณประเทศออสเตรเลีย และนิวซีแลนด์ ทำการศึกษาการเกิดลูกผสมระหว่าง New Zealand black stilt (*H. novaezelandiae*) กับ New Zealand pied stilt หรือ white-headed stilt (*H. himantopus leucocephalus*) โดยศึกษาบริเวณยีน *cytochrome b* และ control region วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่ายีนในไมโทคอนเดรีย เป็นยีนที่ดีในการศึกษานกในสกุลตีนเทียน จากผลการวิเคราะห์พบว่าสามารถแยกนก 2 สปีชีส์นี้ออกจากกันได้ แต่อย่างไรก็ตามยังไม่สามารถแยกลูกผสมที่มีลักษณะคล้าย pied stilt ออกจาก black-winged stilt (*H. himantopus*) ได้

2.6 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค iPBS

นอกจากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์แล้ว ยังพบว่ามีการศึกษาด้วยเทคนิคอื่นที่น่าสนใจ สำหรับงานวิจัยนี้สนใจศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค inter-primer binding site (iPBS) ซึ่งพัฒนาขึ้นโดย Kalendar และคณะ (2010) เป็นเทคนิคที่ใช้รูปแบบของไพรเมอร์ที่มีขนาด 12-13 และ 18 นิวคลีโอไทด์ เข้าไปสุ่มจับกับดีเอ็นเอเป้าหมายของ long terminal repeat (LTR) บริเวณ retrotransposon ซึ่งเป็นบริเวณที่ลำดับนิว-คลีโอไทด์ของดีเอ็นเอมักเกิดการผันแปรทางพันธุกรรมได้ง่าย โดยเฉพาะอย่างยิ่งพืชแทบทุกชนิด ดังนั้นข้อดีของเทคนิคนี้คือผู้วิจัยไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลเกี่ยวกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอเป้าหมายมาก่อน ทำได้ง่าย ไม่ซับซ้อน ให้ข้อมูลมาก ค่าใช้จ่ายไม่สูง และให้รูปแบบดีเอ็นเอที่มีความคงตัวสูง (Kalendar และคณะ, 2011) ปัจจุบันมีการนำเทคนิค iPBS มาศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืช เช่น การศึกษาของ Gailite และคณะ (2011) ศึกษาความหลากหลายของ *Saussurea esthonica* สายพันธุ์ลัตเวีย และเอสโตเนีย พบความหลากหลายทางพันธุกรรมประมาณ 3-5 เปอร์เซ็นต์ ระหว่างประชากร ต่อมา Raddova และคณะ (2012) ทำการศึกษาพืชสกุลมะพลับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(genus *Diospyros*) จำนวน 20 ตัวอย่าง ทดสอบด้วยไพรเมอร์จำนวน 12 ไพรเมอร์ จากการสร้าง dendogram พบว่าสามารถแยกพืชสกุลมะพลับได้ตามสปีชีส์ คือ *D. virginiana*, *D. kaki*, *D. lotus* และสามารถแยกสายพันธุ์ลูกผสมระหว่าง *D. virginiana* และ *D. kaki* ออกจากสปีชีส์อื่นได้ นอกจากนี้ยังมีการศึกษาของ Guo และคณะ (2014) ที่ศึกษาความหลากหลายขององุ่น (*Vitis vinifera*) จำนวน 35 ตัวอย่าง ทำการทดสอบด้วยไพรเมอร์จำนวน 15 ไพรเมอร์ พบว่ามีค่า polymorphism เท่ากับ 86.3 เปอร์เซ็นต์ และยังมีการศึกษาของ Mehmood และคณะ (2013) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของฝรั่ง (*Psidium guajava*) ซึ่งเป็นผลไม้เศรษฐกิจที่สำคัญในประเทศปากีสถาน ศึกษาฝรั่งจำนวน 19 ตัวอย่าง เพื่อประโยชน์ในการอนุรักษ์สายพันธุ์ฝรั่ง และการผสมพันธุ์ฝรั่งในอนาคต ส่วนในประเทศไทยมีการศึกษาของโองการ และเฟื่องฟ้า (2557) ใช้เทคนิค iPBS บ่งชี้ลักษณะทางพันธุกรรมของไผ่รวกสยาม (*Thyrsostachys siamensis*) โดยใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 20 ไพรเมอร์ พบว่าสามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอได้ทั้งหมด 145 แถบ โดยมีค่าเฉลี่ยแถบเท่ากับ 7.25 แถบต่อไพรเมอร์ อย่างไรก็ตามในสัตว์ พบว่ามีเพียงการศึกษาของ Kalendar และคณะ (2010) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ วัว (*Bos bovis*) จามรี (*B. grunniens*) ไก่ (*Gallus gallus*) และ แกะ (*Ovis aries*) ด้วยเทคนิค iPBS พบว่าไพรเมอร์ของ iPBS สามารถแยกสัตว์เหล่านี้ออกจากกันได้ รวมถึงสามารถแยกสัตว์ที่มีความใกล้ชิดกัน ดังเช่น วัว และจามรีได้ ทั้งนี้ยังไม่มีรายงานการใช้เทคนิค iPBS กับนกจึงมีความน่าสนใจในการนำมาศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในนกสกุลตีนเทียน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 การเก็บตัวอย่าง

3.1.1 การขออนุญาตเก็บตัวอย่าง

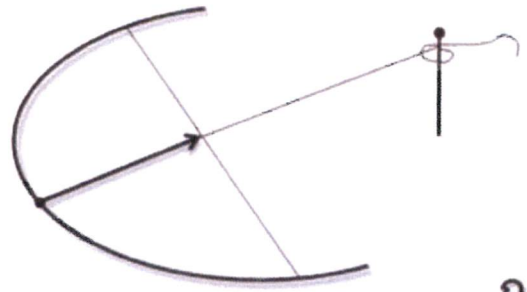
เนื่องจากนกตีนเทียนเป็นสัตว์ป่าคุ้มครอง จึงต้องติดต่อกรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช เพื่อทำหนังสือขออนุญาตเก็บตัวอย่างนกตีนเทียนบริเวณเขตห้ามล่าสัตว์ป่าบึงบอระเพ็ด จังหวัดนครสวรรค์ ในช่วงฤดูทำรังวางไข่ (เดือนเมษายนถึงเดือนมิถุนายน) และในช่วงฤดูอพยพ (เดือนธันวาคมถึงเดือนมกราคม) ระหว่างปีพุทธศักราช 2556-2558 โดยทำงานร่วมกับเจ้าหน้าที่ของสถานีวิจัยสัตว์ป่าบึงบอระเพ็ด หนังสือขออนุญาตได้รับอนุญาตลงเลขที่ ทส 09074/20810 ลงวันที่ 29 ตุลาคม พุทธศักราช 2556

3.1.2 การเก็บตัวอย่าง

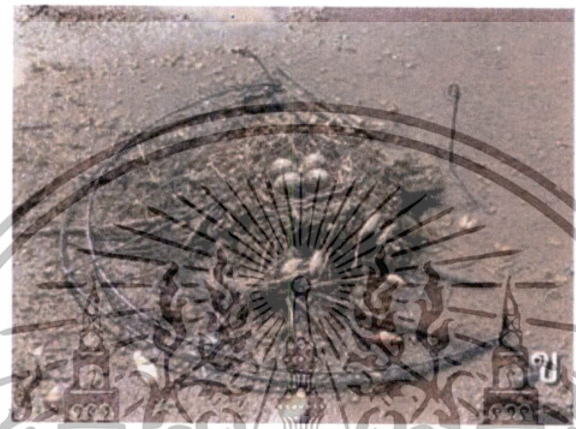
การดักจับนกตีนเทียน และวิธีการเก็บตัวอย่างในแต่ละช่วงฤดูจะมีความแตกต่างกัน โดยปรับเปลี่ยนตามพฤติกรรมของนก ในช่วงฤดูทำรังวางไข่ของนกตีนเทียนระหว่างเดือนเมษายนถึงเดือนมิถุนายน นกตีนเทียนจะฟักไข่อยู่ที่รัง ดังนั้นจึงดักจับด้วยวิธี spring trap บริเวณรังของนกแสดงดังรูปที่ 3.1ก ซึ่งวิธีการนี้เจ้าหน้าที่จากสถานีวิจัยสัตว์ป่าบึงบอระเพ็ดดัดแปลงโดยใช้อุปกรณ์ดักจับสัตว์ทั่วไป คือใช้เหล็กรูปครึ่งวงกลมจำนวน 2 ชิ้น เชื่อมต่อด้านปลายของครึ่งวงกลมด้วยสปริง และยึดตาข่ายกับครึ่งวงกลม ครึ่งวงกลมชิ้นแรกวางติดกับพื้น มีเชือกติดอยู่ตรงกลางของครึ่งวงกลม ใช้ในการทับครึ่งวงกลมชิ้นที่สอง และมีเชือกรูปตัว T ติดที่ด้านปลายทั้งสองข้างของครึ่งวงกลมชิ้นแรก ด้านหัวของรูปหัวของตัว T ทับปลายของเหล็กที่ติดกับครึ่งวงกลมชิ้นแรก ด้านหางของตัว T วางพาดกึ่งกลางของรังนก และยึดปลายเชือกด้วยเหล็กที่ปักลงกับพื้น ดังแสดงในรูปที่ 3.1ข เมื่อนกเข้ามานั่งฟักไข่ เชือกจะเลื่อนต่ำลง ทำให้เหล็กที่ทับครึ่งวงกลมทั้ง 2 ชิ้นดีดออก และทำให้ครึ่งวงกลมชิ้นที่สองดีดครอบบริเวณรังนก ส่วนในฤดูอพยพระหว่างเดือนธันวาคมถึงเดือนมกราคม นกตีนเทียนอาศัยอยู่รวมกันเป็นฝูงและมีปริมาณมาก จึงดักจับด้วยวิธี cannon net (ฑิฐิ และคณะ, 2554ก) ดังรูปที่ 3.2

เมื่อดักจับนกตีนเทียนได้ ทำการใส่รหัสห่วงขาโลหะและห่วงสี (รูปที่ 3.3ก) เพื่อให้เป็นรหัสประจำตัวของนกแต่ละตัว โดยในห่วงขาโลหะจะมีเลขรหัสประจำตัว ชื่อประเทศ (THAILAND หมายถึง ประเทศไทย) และ DNP (Department of National Park, Wildlife and Plant Conservation) หมายถึง กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช (ทิฐิ และคณะ, 2554ข) และบันทึกข้อมูลชีวสัณฐานโดยเจ้าหน้าที่จากสถานีวิจัยสัตว์ป่าบึงบอระเพ็ด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ก



ข

รูปที่ 3.1 แสดงการดักจับนกตีนเทียนในฤดูทำรังวางไข่ด้วยวิธี spring trap ก : หลักการการดักจับนกด้วยวิธี spring trap ข : การใช้ spring trap ดักจับนกบริเวณรังนก

ที่มา : ถ่ายโดยสถานีวิจัยสัตว์ป่าบึงบอระเพ็ด

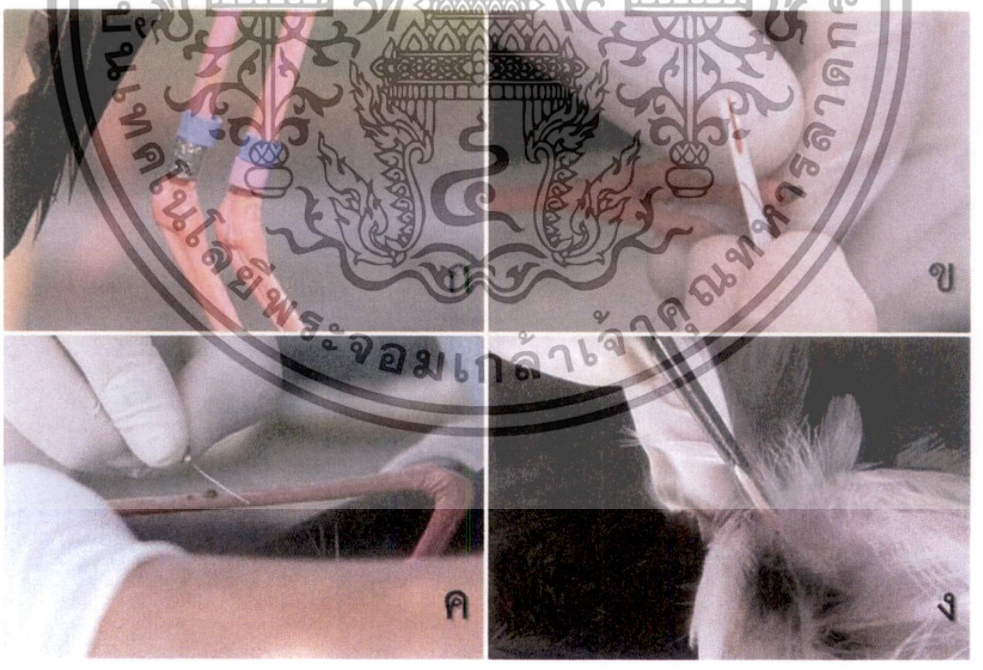
รูปที่ 3.2 แสดงการดักจับนกตีนเทียนในฤดูอพยพด้วยวิธี cannon net

ที่มา : ถ่ายโดยณิชาภัทร ชอบอาภรณ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

หลังจากการบันทึกข้อมูลชีวสัณฐาน จะเก็บตัวอย่างเพื่อใช้ในการทดลอง 3 รูปแบบ โดยคำนึงถึงวัตถุประสงค์ในการทดลอง และให้นกได้รับบาดเจ็บน้อยที่สุด ดังนั้นในช่วงแรกของการเก็บตัวอย่างมีวัตถุประสงค์เพื่อระบุเพศนกเพียงอย่างเดียว ในการทดลองต้องการเลือดปริมาณน้อย (1) จึงเก็บตัวอย่างเลือดลงบนกระดาษ FTA โดยเจาะเลือดบริเวณปลายนิ้วเท้าด้วยเข็มเบอร์ 24 ซับเลือดปริมาตร 10-20 ไมโครลิตร (รูปที่ 3.3ข) และบรรจุกระดาษ FTA ลงบนหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร ต่อมาต้องการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกตีนเทียน ในการทดลองต้องการปริมาณดีเอ็นเอมากขึ้น ในช่วงฤดูอพยพเนื่องจากนกมีการผลัดขน (2) จึงเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อบริเวณปลอกขน จำนวน 1-2 ก้าน (รูปที่ 3.3ง) ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มีแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในฤดูทำรังวางไข่ นกส่วนใหญ่ผลัดขนหมดแล้ว ไม่สามารถเก็บขนอ่อนได้ (3) จึงเจาะเลือดบริเวณหน้าแข้งด้วยเข็มเบอร์ 24 (รูปที่ 3.3ค) ดูดเลือดประมาณ ½ ของ micro haematocrit tube ซึ่งปราศจาก heparin และใส่เลือดลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นถ่ายภาพนกและปล่อยนกกลับคืนสู่ธรรมชาติ สำหรับรหัสที่ใช้ในการเก็บตัวอย่าง นกที่จับช่วงฤดูทำรังวางไข่ ในปีพุทธศักราช 2556 2557 และ 2558 จะมีรหัสนำหน้าเลขเป็น H HH และ HHH ตามลำดับ ส่วนนกที่จับในช่วงฤดูอพยพในปีพุทธศักราช 2556 และ 2557 มีรหัสนำหน้าตัวเลขเป็น Hm และ HHm ตามลำดับ



รูปที่ 3.3 แสดงการเก็บตัวอย่างนกตีนเทียน ก : แสดงการใส่รหัสห่วงขาและห่วงสี ข : การซับเลือดบริเวณปลายนิ้วเท้าด้วยกระดาษ FTA ค : การเจาะเลือดบริเวณหน้าแข้ง เพื่อเก็บตัวอย่างเลือดด้วย micro haematocrit tube ซึ่งปราศจาก heparin ง : แสดงการดึงขนซึ่งมีเนื้อเยื่อบริเวณปลอกขน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

141263

3.2 สารเคมี

3.2.1 10X standard *Taq* reaction buffer; BioLab

3.2.2 2X *Tag* master mix; Vivantis

3.2.3 6X loading dye; Biolabs

3.2.4 abosolute ethanol

3.2.5 agarose gel; Vivantis

3.2.6 alcohol 70 เปอร์เซ็นต์

3.2.7 boric acid; Vivantis

3.2.8 deionized water

3.2.9 deoxyribonucleotide triphosphates 4 ชนิด; Vivantis คือ

3.2.9.1 dATP ความเข้มข้น 100 mM

3.2.9.2 dCTP ความเข้มข้น 100 mM

3.2.9.3 dGTP ความเข้มข้น 100 mM

3.2.9.4 dTTP ความเข้มข้น 100 mM

3.2.10 DNA ladder 1 kb ความเข้มข้น 500 µg/ml; Biolabs

3.2.11 DNA ladder 50 bp ความเข้มข้น 1 mg/ml; Biolabs

3.2.12 DNA ladder VC 100 bp ความเข้มข้น 0.1 µg/µl; Vivantis

3.2.13 ethidium bromide; Vivantis

3.2.14 ethylenediaminetetraacetate (EDTA); Vivantis

3.2.15 FTA purification reagent; Whatman, UK

3.2.16 GF-1 ambiclean kit (gel&PCR); Vivantis

3.2.17 GF-1 blood DNA extraction kit; Vivantis

3.2.18 GF-1 tissue DNA extraction kit; Vivantis

3.2.19 magnesium chloride; Vivantis

3.2.20 nuclease free water; Vivantis

3.2.21 *Taq* DNA polymerase; Biolabs

3.2.22 tris base; Vivantis

3.2.23 primer แสดงดังตารางที่ 3.1-3.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการระบุเพศและศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของนกตีนเทียน

ยีน	ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	เอกสารอ้างอิง
CHD	P2	5'-TCTGCATCGCTAAATCCTTT-3'	Griffiths และคณะ (1998)
	P8	5'-CTCCCA AGGATGAGRAAYTG-3'	
	1237L	5'-GAGAAACTGTGCAAAACAG-3'	Kahn และคณะ (1998)
	1272H	5'-TCCAGAATATCTTCTGCTCC-3'	
	2550F	5'-GTTACTGATTCGTCTACGAGA-3'	Fridolfsson และ Ellegren (1999)
	2718R	5'-ATTGAAATGATCCAGTGCTTG-3'	
COI	Bird F1	5'-TTCTCCAACCACAAAGACATTGGCAC-3'	Hebert และคณะ (2004)
	Bird R1	5'-ACGTGGGAGATAATTCCAAATCCTG-3'	
	Bird R2	5'-ACTACATGTGAGATGATTCCGAATCCAG-3'	
	Bird R3	5'-AGGAGTTTGCTAGTACGATGCC-3'	

ตารางที่ 3.2 ไพรเมอร์ที่ใช้ในเทคนิค iPBS

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	ค่า Tm* (°C)	ค่า T_a* (°C)	การแบ่งกลุ่มไพรเมอร์
2074	5'-GCTCTGATACCA-3'	40.5	49.6	กลุ่มที่ 1 เฉลี่ย 50 °C
2389	5'-ACATCCTTCCCA-3'	43.0	50.0	
2402	5'-TCTAAGCTCTTGATACCA-3'	49.0	50.0	
2382	5'-TGTTGGCTTCCA-3'	44.9	50.5	
2373	5'-GAACTTGCTCCGATGCCA-3'	57.9	51.0	กลุ่มที่ 2 เฉลี่ย 51 °C
2398	5'-GAACCCTTGCCGATACCA-3'	57.1	51.0	
2253	5'-TCGAGGCTCTAGATACCA-3'	53.4	51.0	
2256	5'-TCGAGGCTCTAGATACCA-3'	49.6	51.0	
2400	5'-AGTTAAGCTTTGATACCA-3'	47.8	53.0	
2385	5'-CCATTGGGTCCA-3'	45.7	51.2	
2217	5'-ACTTGGATGTCGATACCA-3'	52.5	51.4	
2252	5'-GAACAGGCGATGATACCA-3'	52.7	51.6	กลุ่มที่ 3 เฉลี่ย 52 °C
2277	5'-GGCGATGATACCA-3'	46.2	52.0	
2231	5'-ACTTGGATGCTGATACCA-3'	52.9	52.0	
2392	5'-TAGATGGTGCCA-3'	43.1	52.2	
2229	5'-CGACCTGTTCTGATACCA-3'	53.5	52.5	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.2 (ต่อ) ไพรเมอร์ที่ใช้ในเทคนิค iPBS

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	ค่า Tm (°C)	ค่า T_a (°C)	การแบ่งกลุ่มไพรเมอร์
2375	5'-TCGCATCAACCA-3'	45.1	52.5	
2230	5'-TCTAGGCGTCTGATACCA-3'	54.0	52.9	
2378	5'-GGTCCTCATCCA-3'	44.2	53.0	
2401	5'-CCCCTCCTTCTAGCGCCA-3'	61.6	51.0	
2219	5'-GAACTTATGCCGATACCA-3'	51.5	53.0	กลุ่มที่ 4 เฉลี่ย 53 °C
2222	5'-ACTTGGATGCCGATACCA-3'	55.7	53.0	
2377	5'-ACGAAGGGACCA-3'	47.2	53.0	
2251	5'-GAACAGGCGATGATACCA-3'	54.3	53.2	
2374	5'-CCCAGCAAACCA-3'	47.1	53.5	
2083	5'-CTTCTAGCGCCA-3'	45.7	54.6	
2272	5'-GGCTCAGATGCCA-3'	50.5	55.0	
2240	5'-AACCTGGCTCAGATGCCA-3'	58.9	55.0	กลุ่มที่ 5 เฉลี่ย 55 °C
2224	5'-ATCCTGGCAATGGAACCA-3'	56.6	55.4	
2232	5'-AGAGAGGCTCGGATACCA-3'	56.6	55.4	
2238	5'-ACCTAGCTCATGATGCCA-3'	55.5	56.0	
2273	5'-GCTCATCATGCCA-3'	47.6	56.5	
2394	5'-GAGCCTAGGCCA-3'	66.7	56.5	
2242	5'-GCCCCATGGTGGGCGCCA-3'	69.2	57.0	กลุ่มที่ 6 เฉลี่ย 57 °C
2220	5'-ACCTGGCTCATGATGCCA-3'	59.0	57.0	
2077	5'-CTCACGATGCCA-3'	46.1	58.3	
2295	5'-AGAACGGCTCTGATACCA-3'	55.0	60.0	
2415	5'-CATCGTAGGTGGGCGCCA-3'	62.5	61.0	กลุ่มที่ 7 เฉลี่ย 63 °C
2078	5'-GCGGAGTCGCCA-3'	54.2	62.8	
2079	5'-AGGTGGGCGCCA-3'	56.6	65.2	

หมายเหตุ : Tm = melting temperature, T_a = annealing temperature

ที่มา : Kalendar และคณะ (2010)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 อุปกรณ์และเครื่องมือ

3.1.1 alcohol burner

3.1.2 autoclave

3.1.3 centrifuge; Hettich รุ่น Mikro 22R

3.1.4 cylinder ขนาด 50, 100, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร

3.1.5 DNA thermal cycler; Eppendorf

3.1.6 electrophoresis system; Mupid รุ่น mupid-exu

3.1.7 erlenmeyer flask ขนาด 125 มิลลิลิตร

3.1.8 forcept

3.1.9 FTA card; Whatman

3.1.10 gel documentation; Genesnap

3.1.11 gel tray และ gel comb

3.1.12 heat box

3.1.13 hot air oven

3.1.14 hypodermic needle ขนาด 24; Nipro

3.1.15 micro haematocrit tube

3.1.16 microcentrifuge tube rack

3.1.17 microcentrifuge tube ขนาด 0.2, 0.5 และ 1.5 มิลลิลิตร

3.1.18 micropipette set และ tip

3.1.19 microwave

3.1.20 parafilm

3.1.21 petri dish

3.1.22 pH meter

3.1.23 poucher ขนาด 2 มิลลิเมตร

3.1.24 scalpel

3.1.25 spectrophotometer

3.1.26 spin down

3.1.27 vortex mixer

3.1.28 water bath

3.1.29 กระดาษปริ้น รุ่น UPP-11HG; Sony

3.1.30 จุกยาง

3.1.31 ตู้เย็น 4 และ -20 องศาเซลเซียส (refrigerator)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.32 ถุงมือยาง

3.1.33 ปากกา

3.1.34 สำลี

3.4 วิธีการทดลอง

ตัวอย่างที่เก็บมาใช้ในการทดลองมีทั้งหมด 3 รูปแบบ ดังแสดงในข้อ 3.1.2 แต่ละตัวอย่างมีกระบวนการในการนำมาทดลองที่แตกต่างกัน ดังนี้

3.4.1 การทำให้ดีเอ็นเอในกระดาษ FTA บริสุทธิ์

ในกรณีเก็บตัวอย่างเลือดลงบนกระดาษ FTA จะต้องนำกระดาษ FTA มาทำให้บริสุทธิ์ก่อนที่จะนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยไม่ต้องผ่านขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ ซึ่งเหมาะแก่การนำมาใช้ในการระบุเพศเท่านั้น เนื่องจากมีปริมาณดีเอ็นเอไม่มาก โดยดัดแปลงวิธีการทำให้ดีเอ็นเอในกระดาษบริสุทธิ์จากสุพัตรา และคณะ (2012) เริ่มจากการทำความสะอาด poucher ขนาด 2 มิลลิเมตร ด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ รอให้แห้ง ใช้ poucher เจาะกระดาษ FTA บริเวณที่มีตัวอย่างเลือดใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 0.2 มิลลิลิตร เติมสาร FTA purification reagent (Whatman, UK) ซึ่งมีคุณสมบัติในการชะล้างสิ่งสกปรก และเศษเซลล์ที่ติดอยู่บนกระดาษออก ปริมาตร 125 ไมโครลิตร นำไป vortex แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลานำไป vortex และดูดสารละลายออก ทำซ้ำขั้นตอนนี้อีกครั้ง จากนั้นเติม TE buffer ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 125 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วดูดสารละลายออก ทำซ้ำขั้นตอนนี้อีกครั้ง และนำไปทำให้กระดาษ FTA แห้งใน heat box ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หรือดีดแล้วกระดาษไม่ติดที่หลอดทดลอง จากนั้นนำใช้ในการระบุเพศต่อไป

3.4.2 การสกัดดีเอ็นเอจากเลือด

นำตัวอย่างเลือดที่ได้จากการเจาะเลือดบริเวณหน้าแข้งของนกปริมาณ 100-200 ไมโครลิตร มาสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด GF-1 blood DNA extraction kit โดยทำตามวิธีการและคู่มือจากบริษัท โดยเติม buffer BB ปริมาตร 200 ไมโครลิตรลงในเลือด ผสมให้เข้ากัน และเติม proteinase K ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร นำไป vortex แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อย่อยสลายเซลล์ จากนั้นเติม RNase A ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อย่อยสลายอาร์เอ็นเอ เติม abosolute ethanol ปริมาตร 200 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาทันที จากนั้นนำสารละลายทั้งหมดใส่ลงใน column ซึ่งอยู่ใน collection tube ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 7,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งส่วนใส จากนั้นเติม wash buffer 1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 7,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งส่วนใส เปลี่ยนเป็นเติม wash buffer 2 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความเร็วรอบ 7,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งส่วนใส และทำซ้ำขั้นตอน wash buffer 2 อีกครั้ง ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที เพื่อทำให้ column แห้ง จากนั้นย้าย column ไปที่หลอด ทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม elution buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตรลงไป หรือมากน้อยตามปริมาณเลือดที่นำมาสกัด ปล่อยทิ้งไว้ 2 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ ความเร็วรอบ 7,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที นำ column ออก เก็บส่วนใสซึ่งเป็นดีเอ็นเอไว้ใช้ในขั้นตอนต่อไป

3.4.3 การสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อบริเวณปลอกขน

นำตัวอย่างเนื้อเยื่อบริเวณปลอกขนของนกมาสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด GF-1 tissue DNA extraction kit โดยทำตามวิธีการและคู่มือจากบริษัท ดังนี้ นำเนื้อเยื่อบริเวณปลอกขนมาสับให้เป็นชิ้นเล็กๆ ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม buffer TL ปริมาตร 250 ไมโครลิตร และ proteinase K ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาเพื่อให้สารผสมกัน เติม lysis enhancer ปริมาตร 20 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ทั้งนี้กลับหลอดไปมาทุกๆ 30 นาที เพื่อย่อยสลายเนื้อเยื่อ หลังจากบ่มครบ 5 ชั่วโมง เติม RNase A ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตรลงไป และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อย่อยสลายอาร์เอ็นเอ เติม buffer TB ปริมาตร 620 ไมโครลิตร และบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติม absolute ethanol ปริมาตร 200 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาทันที ย้ายสารละลายทั้งหมดใส่ลงใน column ซึ่งอยู่ใน collection tube ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 7,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งส่วนใส จากนั้นเติม wash buffer ปริมาตร 650 ไมโครลิตรลงไป ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 7,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งส่วนใส ทำซ้ำขั้นตอน wash buffer อีกครั้ง ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 9,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาทีอีกครั้ง เพื่อทำให้ column แห้ง จากนั้นย้าย column ไปที่หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม elution buffer ปริมาตร 80 ไมโครลิตร หรือมากน้อยตามจำนวนขนที่นำมาสกัดดีเอ็นเอ ปล่อยทิ้งไว้ 2 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ ความเร็วรอบ 7,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที นำ column ออก แล้วเก็บส่วนใสซึ่งเป็นดีเอ็นเอใช้ในขั้นตอนต่อไป

3.4.4 การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอ

นำดีเอ็นเอที่สกัดในข้อที่ 3.4.2 และ 3.4.3 มาตรวจสอบคุณภาพด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยเตรียมเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เติม TBE buffer ความเข้มข้น 1X (ภาคผนวก ก) ลงไป ละลายให้เข้ากันด้วยการให้ความร้อนจากไมโครเวฟ ทิ้งไว้ให้อุ่นก่อนเทลงบนถาดที่มีหวีเสียบ รอให้เจลแข็ง ย้ายเจลลงในเครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิส เท TBE buffer ความเข้มข้น 1X ลงไปให้ท่วมเจล เตรียม 6X loading dye ให้มีความเข้มข้นเป็น 3X โดยการผสม deionized water (ภาคผนวก ก) จากนั้นหยอด loading dye ที่มีความเข้มข้น 3X ปริมาตร 3 ไมโครลิตร ลงบน parafilm และหยอดตัวอย่างดีเอ็นเอปริมาตร 3 ไมโครลิตร ลงบน loading dye ผสมให้เข้ากันแล้ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หยอดลงในหลุมเจล เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1 กิโลเบส ปริมาตร 2 ไมโครลิตร แยกขนาดชิ้นดีเอ็นเอด้วยความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที นำเจลไปย้อมด้วย ethidium bromine ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นย้ายไปแช่ในน้ำกลั่นเป็นเวลา 10 นาที นำเจลไปตรวจสอบภายใต้แสงยูวีด้วยเครื่อง gel documentation และถ่ายภาพด้วยโปรแกรม GeneSnap

การตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยเตรียมตัวอย่างดีเอ็นเอลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร ประกอบด้วยดีเอ็นเอ 3 ไมโครลิตร ผสมกับน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 297 ไมโครลิตร (dilution factor = 100) ผสมให้เข้ากัน จากนั้นดูดสารละลายทั้งหมดลงบนคิวเวท วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer โดยใช้น้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วเป็นค่ามาตรฐาน (blank) คำนวณความเข้มข้นของดีเอ็นเอจากสูตร

ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (µg/ml) = A_{260} x 50 µg/ml x dilution factor

3.4.5 การระบุเพศนกด้วยเทคนิคระดับโมเลกุล

การระบุเพศด้วยเทคนิคระดับโมเลกุล ทำได้โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบนยีน *CHD* ในงานวิจัยนี้ใช้ตัวอย่างเลือดบนกระดาษ FTA ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้ว ในข้อที่ 3.4.1 โดยในช่วงแรกของการทดลองจะทดสอบไพรเมอร์ 3 คู่ ซึ่งเป็น universal primer ที่ใช้ในการระบุเพศนก คือ ไพรเมอร์ P2/P8 ไพรเมอร์ 1237L/1272H และไพรเมอร์ 2550F/2718R เพื่อหาไพรเมอร์ที่เหมาะสมที่สุดในการระบุเพศนกตีนเทียน โดยในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจะมีสารทั้งหมด 25 ไมโครลิตรต่อหลอดทดลอง ประกอบด้วย 2X *Taq* master mix (Vivantis) ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1X ไพรเมอร์ P2/P8 หรือไพรเมอร์ 1237L/1272H หรือไพรเมอร์ 2550F/2718R โดยแต่ละไพรเมอร์มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.8 ไมโครโมลาร์ เติม nuclease free water จนครบ 25 ไมโครลิตร นำไปเข้าเครื่อง DNA thermal cycler โดยมีสภาวะดังนี้ initial denaturation ที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ denaturation ที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที annealing ที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที จำนวน 35 รอบ และ final extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เมื่อได้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์แล้ว ตรวจสอบด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ดังข้อ 3.4.4 โดยให้เจลอะกาโรสมีความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ หยอดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ 5 ไมโครลิตร ผสมกับ loading dye ความเข้มข้น 3X ปริมาตร 3 ไมโครลิตร และเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 50 คู่เบส ปริมาตร 2 ไมโครลิตร เลือกไพรเมอร์ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่าง 2 แถบได้ดีที่สุด และนำไปตรวจสอบกับทุกตัวอย่างต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.6 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน *cytochrome c oxidase I* (*COI*)

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน *cytochrome c oxidase I* (*COI*) เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม ดีเอ็นเอตัวอย่างที่นำมาใช้ในขั้นตอนนี้คือ ดีเอ็นเอจากข้อ 3.4.2 และ 3.4.4 ในช่วงแรกของการทดลองจะทดสอบด้วยไพรเมอร์ 3 คู่ คือ ไพรเมอร์ BirdF1/BirdR1 ไพรเมอร์ BirdF1/BirdR2 และไพรเมอร์ BirdF1/BirdR3 (Hebert และคณะ, 2004) เพื่อหาไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณนี้ได้ดีที่สุด โดยมีสารทั้งหมด 25 ไมโครลิตรต่อหลอดทดลอง ประกอบด้วย deoxyribonucleotide triphosphates (dNTPs) ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.2 มิลลิโมลาร์ 10X standard *Taq* reaction buffer ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1X ไพรเมอร์ซึ่งมีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.8 ไมโครโมลาร์ และ *Taq* DNA polymerase ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.05 ยูนิต เติม deionized water จนครบ 25 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองที่มีดีเอ็นเอความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร นำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง DNA thermal cycler โดยให้มีสภาวะดังนี้ initial denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 1 รอบ denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที สำหรับขั้นตอน annealing ในช่วงแรกมีการทดสอบเพื่อหาอุณหภูมิที่เหมาะสม โดยเริ่มจากอุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส และเพิ่มอุณหภูมิขึ้นทีละ 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 30 วินาที extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 30 วินาที จำนวน 30 รอบ และ final extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส ดังข้อ 3.4.4 โดยหยอดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ปริมาตร 5 ไมโครลิตร และเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส ปริมาตร 2 ไมโครลิตร เลือกไพรเมอร์ และอุณหภูมิในขั้นตอน annealing ที่ให้แถบชัดเจนที่สุด และนำไปตรวจสอบกับตัวอย่างที่คัดเลือกตามลักษณะสีกระหม่อมและท้ายทอยของนก ทั้งตัวอย่างจากฤดูทำรังวางไข่ และฤดูอพยพ จากนั้นนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป

3.4.7 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่นำมาใช้ในการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ จะต้องเป็นตัวอย่างที่คัดเลือกตามลักษณะสีกระหม่อมและท้ายทอยของนก ทั้งตัวอย่างจากฤดูทำรังวางไข่ และฤดูอพยพ สำหรับผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ในงานวิจัยนี้แบ่งออกเป็น 2 ลักษณะ คือ (1) ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จากยีน *COI* ซึ่งมีชิ้นดีเอ็นเอขนาดเดียว และ (2) ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จากยีน *CHD* ซึ่งหากต้องการวิเคราะห์นกเพศเมียจะมีชิ้นดีเอ็นเอ 2 ขนาด ของอัลลีล *CHD-Z* และอัลลีล *CHD-W* ดังนั้นการเตรียมผลิตภัณฑ์พีซีอาร์มาทำให้บริสุทธิ์จึงมี 2 ลักษณะ โดยใช้ชุดสกัด GF-1 ambiclean (Gel&PCR) และทำตามวิธีการและคู่มือจากบริษัทดังนี้ ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่มีชิ้นดีเอ็นเอขนาดเดียวจะผสมสารละลายกับ deionized water จนมีปริมาตรครบ 100 ไมโครลิตร เติม buffer DB ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ส่วนผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่มีชิ้นดีเอ็นเอ 2 ขนาด จะต้องนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ทั้งหมดไปผ่านวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส แล้วจึงตัดชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการวิเคราะห์จากเจลอะกาโรส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากนั้นใส่ชิ้นเจลลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม buffer DB ให้ท่วมเจล และบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จนกระทั่งเจลละลายเป็นสารละลาย หลังจากขั้นตอนการเตรียมผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ทั้ง 2 ลักษณะ จึงย้ายสารละลายทั้งหมดใส่ลงใน column ซึ่งอยู่ใน collection tube ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 9,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติม wash buffer ปริมาตร 650 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 9,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 9,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เพื่อทำให้ column แห้ง จากนั้นย้าย column ไปที่หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม elution buffer ปริมาตร 20-40 ไมโครลิตรลงไป ปล่อยทิ้งไว้ 2 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ ความเร็วรอบ 9,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที นำ column ออก แล้วเก็บส่วนใสซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ไว้ เพื่อส่งวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ และนำนิวคลีโอไทด์ที่ได้มา blast เปรียบเทียบกับข้อมูลที่อยู่ในฐานข้อมูล GenBank ใน NCBI (National Center for Biotechnology Information) จากนั้นวิเคราะห์และจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม bioedit และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ไปวิเคราะห์หาความสัมพันธ์โดยการสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ (phylogenetic tree) โดยการใช้โปรแกรม MEGA6

3.4.8 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค iPBS

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค iPBS (Kalendar และคณะ, 2010) โดยในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจะมีสารทั้งหมด 20 ไมโครลิตรต่อหลอดทดลอง ประกอบด้วย dNTPs ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.25 มิลลิโมลาร์ แมกนีเซียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.5 มิลลิโมลาร์ *Taq* DNA polymerase ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.05 ยูนิต ไพรเมอร์ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 2 มิลลิโมลาร์ ดีเอ็นเอต้นแบบที่ได้จากการสกัดเนื้อเยื่อบริเวณปลอกขนและเลือดที่ความเข้มข้น 200 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร *taq* reaction buffer ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1X และเติม deionized water ลงไปจนครบ 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง DNA thermal cycler โดยให้มีสภาวะดังนี้ คือ initial denaturation ที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที จำนวน 1 รอบ denaturation ที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที สำหรับขั้นตอน annealing จะใช้อุณหภูมิตามค่า optimal annealing temperature (T_a) ที่อ้างอิงจาก Kalendar และคณะ (2010) เป็นเวลา 1 นาที extension ที่ 68 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 30 รอบ และ final extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที สำหรับไพรเมอร์ที่นำมาใช้ในการทดลองช่วงแรกมีทั้งหมด 40 ไพรเมอร์ ซึ่งคัดเลือกมาจากงานวิจัยของ Kalendar และคณะ (2010) โดยเลือกจากไพรเมอร์ที่มีประสิทธิภาพในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ดีทั้งในพืชและในสัตว์ จากนั้นแบ่งกลุ่มไพรเมอร์ตามค่า optimal annealing temperature (T_a) ที่ใกล้เคียงกัน เพื่อให้ง่ายต่อการทดสอบเบื้องต้น โดยแบ่งไพรเมอร์ออกเป็น 7 กลุ่ม คือ ไพรเมอร์ที่มีค่า T_a เท่ากับ 50, 51, 52, 53, 55, 57 และ 63 องศาเซลเซียส ดังตารางที่ 3.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส ดังข้อ 3.4.4 โดยให้เจลอะกาโรสมีความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ หยอดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ 5 ไมโครลิตร ผสมกับ loading dye ความเข้มข้น 3X ปริมาตร 3 ไมโครลิตร และเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส ปริมาตร 2 ไมโครลิตร คัดเลือกไพรเมอร์ที่ให้แถบชัดเจน และนำไปตรวจสอบกับตัวอย่างจำนวน 36 ตัวอย่างที่คัดเลือกตามลักษณะสีกระหม่อมและท้ายทอยของนก ทั้งตัวอย่างจากฤดูทำรังวางไข่ และฤดูอพยพ โดยอุณหภูมิในขั้นตอน annealing ของแต่ละไพรเมอร์อ้างอิงตาม Kalendar และคณะ (2010) นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์มาตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส และเลือกไพรเมอร์ที่ให้แถบที่ชัดเจน และสามารถนับแถบได้ บันทึกผลการปรากฏของแถบดีเอ็นเอ (score band DNA) ให้อยู่ในรูปแบบไบนารี (binary data) โดยให้ 1 แทนการปรากฏแถบดีเอ็นเอ ให้ 0 แทนการไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ ณ ตำแหน่งเดียวกันของแต่ละตัวอย่างโดยเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน ลงบนโปรแกรม Microsoft Office Excel วิเคราะห์ข้อมูลด้วยค่า genetic similarity เพื่อคำนวณค่าความเหมือนและค่าความต่าง โดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์แบบ simple matching coefficient และใช้พารามิเตอร์ UPGMA (Sokal and Micherner, 1958) ด้วยโปรแกรม SPSS statistics 17.0 แล้วจึงสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (dendogram) ตามวิธีของ Nei และ Li (1979) ด้วยโปรแกรม Numericial Taxonomy System version 2.1 (NTSYSpc 2.1)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 ผลการเก็บตัวอย่างนกตีนเทียน

จากการดักจับตัวอย่างนกตีนเทียนบริเวณเขตห้ามล่าสัตว์ป่าบึงบอระเพ็ด จังหวัดนครสวรรค์ แบ่งออกเป็น 2 ช่วงฤดู คือ ช่วงฤดูทำรังวางไข่ (เดือนเมษายนถึงมิถุนายน) และฤดูอพยพ (เดือนธันวาคมถึงมกราคม) โดยมีวิธีการดักจับนกที่แตกต่างกัน ในช่วงฤดูทำรังวางไข่ดักจับนกด้วยวิธี spring trap และฤดูอพยพ นกอยู่รวมกันเป็นจำนวนมากจึงดักจับนกด้วยวิธีท่อส่งตาข่าย (cannon net) สามารถเก็บตัวอย่างได้ทั้งหมดจำนวน 277 ตัวอย่าง ได้แก่ ช่วงฤดูทำรังวางไข่ ปีพุทธศักราช 2556, 2557 และ 2558 จำนวน 32, 35 และ 13 ตัวอย่าง ตามลำดับ และช่วงฤดูอพยพ ปีพุทธศักราช 2556 และ 2557 จำนวน 94 และ 103 ตัวอย่าง ตามลำดับ

ในงานวิจัยนี้มีวิธีการเก็บตัวอย่างจำนวน 3 รูปแบบ ซึ่งแต่ละรูปแบบที่ใช้จะขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ และฤดูกาลที่เก็บตัวอย่าง ในช่วงแรกของการเก็บตัวอย่างนกตีนเทียน ฤดูทำรังวางไข่ในปีพุทธศักราช 2556 เบื้องต้นต้องการศึกษาการระบุเพศ โดยใช้เพียงการเก็บตัวอย่างในรูปแบบกระดาษ FTA ซึ่งต้องการดีเอ็นเอปริมาณน้อย เก็บตัวอย่างด้วยวิธีการเจาะเลือดบริเวณปลายนิ้วเท้าของนก แล้วซับเลือดลงบนกระดาษ FTA จากนั้นทำให้กระดาษ FTA บริสุทธิ์ และระบุเพศนกด้วยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลอง จากการเก็บตัวอย่างครั้งแรกทำให้ทราบว่านกตีนเทียนที่พบมีลักษณะสีขนบริเวณกระหม่อม และท้ายทอยที่หลากหลาย จึงสนใจศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบสีขนดังกล่าวกับเพศ ซึ่งวิธีการที่ใช้ในการศึกษาต้องใช้ดีเอ็นเอปริมาณมาก จึงปรับเปลี่ยนรูปแบบการเก็บตัวอย่างเป็นการเก็บเนื้อเยื่อบริเวณปลอกขน โดยนกในฤดูอพยพมีการผลัดขน จึงเก็บเนื้อเยื่อบริเวณปลอกขนมาใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ ส่วนนกในช่วงฤดูผสมพันธุ์จะไม่มีการผลัดขน จึงใช้วิธีการเจาะเลือดบริเวณหน้าแข้งของนกแทน สำหรับจำนวน และรูปแบบการเก็บตัวอย่างนกในแต่ละฤดูกาล โดยใน 1 ตัวอย่างอาจเก็บได้ทั้ง 3 รูปแบบ เช่น เก็บตัวอย่างเลือดลงบนกระดาษ FTA เก็บเนื้อเยื่อบริเวณปลอกขน และเก็บเลือดบริเวณหน้าแข้งของนก ดังตารางที่ 4.1 ทั้งนี้รูปแบบการเก็บตัวอย่างที่รวดเร็วและทำให้นกบาดเจ็บน้อยที่สุดคือ การดึงปลอกขนเพื่อนำเนื้อเยื่อมาสกัดดีเอ็นเอ แต่รูปแบบนี้ใช้ได้เฉพาะในฤดูอพยพที่นกผลัดขนเท่านั้น จากการเก็บตัวอย่างนกตีนเทียนทั้งหมดพบว่านกมีลักษณะสีขนบริเวณกระหม่อมและท้ายทอยที่แตกต่างกัน ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Xeira (1987) ซึ่งพบความผันแปรของสี และตำแหน่งสีบริเวณกระหม่อม และท้ายทอยของนกตีนเทียน (black-winged stilt) ในประเทศโปรตุเกส ทั้งนี้ในงานวิจัยนี้จึงแบ่งสีขนบริเวณกระหม่อมและท้ายทอยของตัวอย่างนกตีนเทียนออกเป็น 6 ลักษณะ คือ (ก) กระหม่อม และท้ายทอยสีขาว (รูปที่ 4.1ก) (ข) กระหม่อม และท้ายทอยสีขาว ปลายขนสีดำ (รูปที่ 4.1ข) (ค) กระหม่อมสีขาว และท้ายทอยสีดำอ่อน (รูปที่ 4.1ค) (ง) กระหม่อมสีขาว และท้ายทอยสีดำเข้ม (รูปที่ 4.1ง) (จ) กระหม่อม

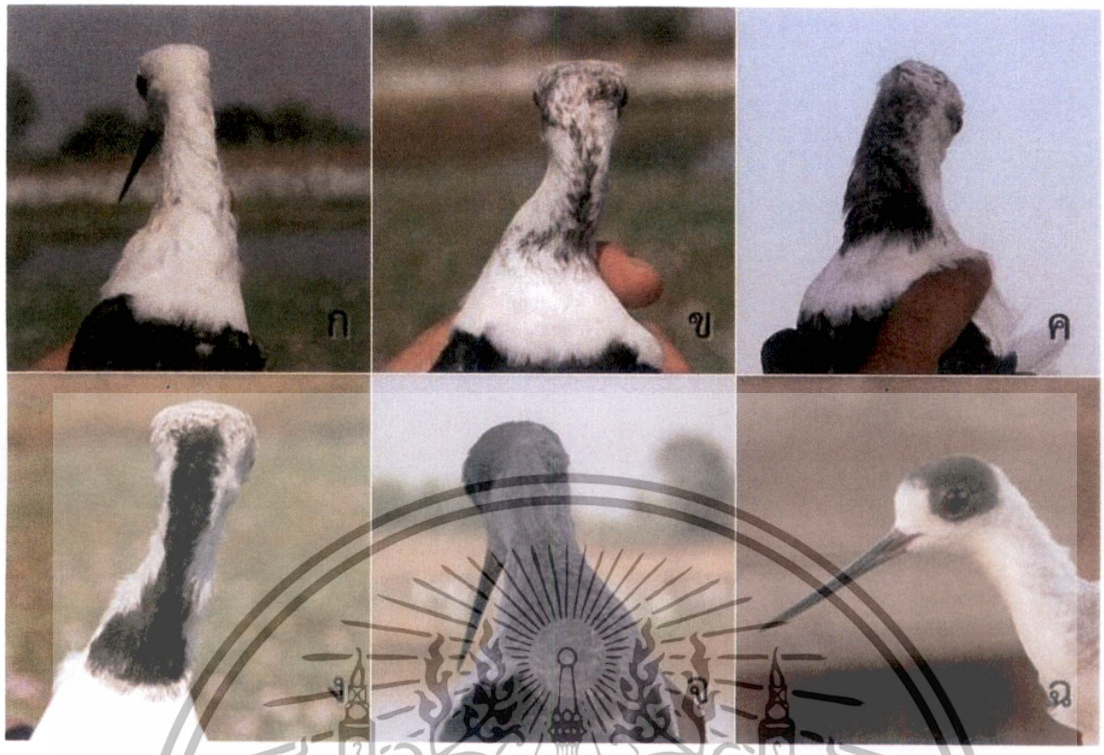
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และท้ายทอยสีเทา (รูปที่ 4.1จ) และ (ฉ) กระหม่อม และท้ายทอยสีเทา บริเวณขอบตาสีเทาเข้ม (รูปที่ 4.1ฉ) ซึ่งนกที่จับได้ช่วงฤดูทำรังวางไข่พบเพียงลักษณะ ก-ง ดังรูปที่ 4.1ก-4.1ง โดยจะมีลักษณะบริเวณโคนปากเป็นสีดำ ดังรูปที่ 4.2ก ส่วนนกในฤดูอพยพจะพบทั้ง 6 ลักษณะ แต่จะมีลักษณะ จ และ ฉ ดังรูปที่ 4.1จ และ 4.1ฉ ที่สามารถพบได้เพียงนกในฤดูทำรังวางไข่ โดยจะมีบริเวณโคนปากเป็นสีชมพู ดังรูปที่ 4.2ข จากลักษณะข้างต้นสันนิษฐานว่านกที่มีโคนปากสีชมพูเป็นนกที่ยังโตไม่เต็มวัย จึงไม่พบลักษณะนี้ในช่วงฤดูทำรังวางไข่ ซึ่งดักจับนกที่รัง จึงดักจับได้เฉพาะนกที่โตเต็มวัย (adult) แล้วเท่านั้น อย่างไรก็ตามพบนกที่มีโคนปากสีชมพูในฤดูอพยพ ซึ่งอาจสันนิษฐานได้ว่านกอพยพนั้นมีทั้งนกที่ยังโตไม่เต็มวัย (juvenile) และนกที่โตเต็มวัย (adult) แล้ว ทั้งนี้ลักษณะของนกตีนเทียนที่พบบริเวณเขตห้ามล่าสัตว์ป่าบึงบอระเพ็ด จังหวัดนครสวรรค์ มีลักษณะเช่นเดียวกับงานวิจัยของ Parasharya และคณะ (2010) ซึ่งสำรวจนกตีนเทียน (*H. himantopus*) ในประเทศอินเดีย พบว่านกตีนเทียนในช่วงฤดูหนาว หรือฤดูอพยพ (เดือนธันวาคมถึงมกราคม) มีสีขนบริเวณกระหม่อมหลากหลายรูปแบบ โดยเฉพาะสีดำ ในขณะที่ในช่วงฤดูร้อน หรือฤดูทำรังวางไข่ (เดือนเมษายนถึงมิถุนายน) ไม่พบสีดำบริเวณกระหม่อม และท้ายทอยของนก Parasharya และคณะ (2010) จึงตั้งสมมุติฐานไว้ 2 ข้อ คือ นกที่มีกระหม่อม และท้ายทอยเป็นสีดำ จะพบเฉพาะในฤดูหนาว ซึ่งอาจเป็นนกอพยพมาจากที่อื่น หรือสีดำบริเวณกระหม่อมและท้ายทอยของนกจะจางหายไปในช่วงฤดูทำรังวางไข่

ตารางที่ 4.1 แสดงจำนวนและรูปแบบการเก็บตัวอย่างนกตีนเทียนในแต่ละฤดูกาล

ฤดู	ปี พ.ศ.	FTA card	เนื้อเยื่อบริเวณปลอกขน	เลือด
ทำรังวางไข่	2556	32	-	-
	2557	35	6	34
	2558	12	-	13
อพยพ	2556	94	42	-
	2557	40	96	11

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.1 แสดงลักษณะสีขนบริเวณกระหม่อม และท้ายทอยของนกตีนเทียน ซึ่งแบ่งออกเป็น 6 ลักษณะ คือ ก : กระหม่อมและท้ายทอยสีขาว ข: กระหม่อม และท้ายทอยสีขาว ปลายขนสีดำ ค : กระหม่อมสีขาว และท้ายทอยสีดำอ่อน ง : กระหม่อมสีขาว และท้ายทอยสีดำเข้ม จ : กระหม่อม และท้ายทอยสีเทา ฉ : กระหม่อม และท้ายทอยสีเทา บริเวณขอบตาสีเทาเข้ม

รูปที่ 4.2 แสดงลักษณะสีบริเวณโคนปากของนกตีนเทียน ก : โคนปากดำ ข : โคนปากสีชมพู

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 ผลการระบุเพศนกด้วยเทคนิคระดับโมเลกุล

4.2.1 การหาไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการระบุเพศนกตีนเทียน

นกตีนเทียนเป็นนกประเภท sexually monomorphic ซึ่งไม่สามารถระบุเพศได้จากลักษณะภายนอก จึงสนใจนำเทคนิคระดับโมเลกุลมาใช้ในการระบุเพศนก ซึ่งยีนที่นิยมนำมาใช้ในการระบุเพศนกคือยีน *Chromo-helicase DNA binding protein* (*CHD*) ซึ่งเป็นยีนบนโครโมโซมเพศ ในช่วงแรกของการทดลอง จะสุ่มเลือกตัวอย่างนกตีนเทียนจำนวน 4 ตัวอย่าง เพื่อนำมาทดสอบหาไพรเมอร์ที่เหมาะสมมากที่สุดในการระบุเพศ โดยเลือกใช้ไพรเมอร์จำนวน 3 คู่ ซึ่งเป็นไพรเมอร์ universal ประกอบด้วย ไพรเมอร์ P2/P8 (Griffith และคณะ, 1998) ไพรเมอร์ 1237L/1272H (Kahn และคณะ, 1998) และไพรเมอร์ 2550F/2718R (Fridolfsson และ Ellegren, 1999) จากนั้นนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอมาตรวจสอบด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้เจลอะกาโรสความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ และเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 50 คู่เบส ดังรูปที่ 4.3 พบว่าช่องที่ 2-5 ซึ่งใช้ไพรเมอร์ P2/P8 มีเพียงช่องที่ 5 เท่านั้นที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็น-เอได้ และมีขนาดชิ้นดีเอ็นเอประมาณ 400 คู่เบส ส่วนช่องที่ 2-4 ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน *CHD* ได้ จากผลการทดลองทำให้ทราบว่าไพรเมอร์ P2/P8 ไม่เหมาะสมในการนำมาใช้ระบุเพศนกตีนเทียน เนื่องจากไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้อย่างสม่ำเสมอ ส่วนไพรเมอร์ 1237L/1272H แสดงในช่องที่ 6-9 สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน *CHD* ได้ แต่ไม่สามารถระบุเพศนกตีนเทียนได้ เนื่องจากให้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 300 คู่เบสเท่ากัน ในขณะที่ไพร-เมอร์ 2550F/2718R สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน *CHD* และระบุเพศได้อย่างชัดเจน ดังแสดงในช่องที่ 10-13 โดยเพศผู้พบ 1 แถบของอัลลีล *CHD-Z* ขนาดประมาณ 650 คู่เบส และเพศเมียพบ 2 แถบของอัลลีล *CHD-Z* และอัลลีล *CHD-W* ขนาดประมาณ 650 และ 500 คู่เบส ตามลำดับ

จากผลการทดลองพบว่าไพรเมอร์ที่เหมาะสมที่สุดในการนำมาใช้ระบุเพศนกตีนเทียน คือ ไพรเมอร์ 2550F/2718R เนื่องจากสามารถแยกความแตกต่างของนกเพศผู้และนกเพศเมียได้อย่างชัดเจน โดยผลจากการวิเคราะห์ด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ทำให้ทราบว่าอัลลีล *CHD-Z* และอัลลีล *CHD-W* มีความแตกต่างกันประมาณ 150 คู่เบส ซึ่งก่อนหน้านี้ไพรเมอร์ชนิด 2550F/2718R สามารถนำมาใช้ระบุเพศนกกระแตหัวสีเทา (*Vanellus cinereus*) (Wakisaka และคณะ, 2006) รวมทั้งนกในสกุลหัวโตจำนวน 3 สปีชีส์ คือ หัวโตทรายเล็ก (*Charadrius mongolus*) หัวโตทรายใหญ่ (*C. leschenaultii*) และหัวโตขาดำ (*C. alexandrinus*) ซึ่งเป็นนกในอันดับ Charadriiformes ได้เช่นกัน โดยอัลลีล *CHD-Z* และอัลลีล *CHD-W* มีชิ้นดีเอ็นเอขนาด 650 คู่เบส และ 450 คู่เบส ตามลำดับ (ณิชาภัทร และคณะ, 2013)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำหรับไพรเมอร์ P2/P8 พบนำมาใช้ในการระบุเพศนกได้หลายชนิด เช่น นกในอันดับนกแก้วหรือนกปากขอ (Psittaciform) นกในวงศ์ Ramphastidae และวงศ์ Cracidae (Miyaki และคณะ, 1998) นกคอกคาทีล (*Nymphicus hollandicus*) (Cerit และ Avanus, 2007) นอกจากนี้ยังมีรายงานของ Chang และคณะ (2010) ระบุเพศนกปรอดจีน (*Pycnonotus sinensis*) และนกปรอดไต้หวัน (*P. taivanus*) ด้วยไพรเมอร์ P2/P8 และพบว่าอัลลีล *CHD-Z* มีขนาดเท่ากับ 293 คู่เบส และอัลลีล *CHD-W* มีขนาดเท่ากับ 345 คู่เบส แต่จากผลการทดลองข้างต้นพบว่าไพรเมอร์ P2/P8 ไม่เหมาะสำหรับใช้ในการระบุเพศนกตีนเทียน อย่างไรก็ตามพบรายงานของ Watson และคณะ (2004) ใช้ไพรเมอร์ P2/P8 ในการระบุเพศนกกินหอยปากแดง (*Haematopus ostralegus*) ที่เป็นนกในอันดับเดียวกับนกตีนเทียนได้ และพบว่าอัลลีล *CHD-Z* และอัลลีล *CHD-W* มีขนาด 400 และ 380 คู่เบส ตามลำดับ ซึ่งชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดใกล้เคียงกันมาก ต้องใช้เจลอะกาโรส 3 เปอร์เซ็นต์ในการตรวจสอบ เนื่องจากแถบมีขนาดต่างกันเพียง 20 คู่เบสเท่านั้น เช่นเดียวกับรายงานของ Jirajaroenrat และ Thamakarn (2007) ระบุเพศนกเลี้ยงบางชนิด (pet birds) เช่น green-cheeked conure (*Pyrrhura molinae*) sun conure (*Aratinga solstitialis*) และ ringnecked parakeet (Psittacula) นำไพรเมอร์ P2/P8 ไปใช้ในการระบุเพศ ทำให้ปรากฏเพียง 1 แถบ ซึ่งไม่ชัดเจนในการระบุเพศนก จึงเปลี่ยนมาใช้ไพรเมอร์ P2/NP/MP ซึ่งจะมีไพรเมอร์ที่จำเพาะกับอัลลีล *CHD-Z* หรืออัลลีล *CHD-W* เท่านั้น จึงทำให้เพศเมียเกิด 2 แถบ ขนาด 250 และ 350 คู่เบส ในขณะที่เพศผู้เกิด 1 แถบ ที่มีขนาด 350 คู่เบส เท่านั้น

รูปที่ 4.3 แสดงผลการระบุเพศนกตีนเทียนด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (เจลอะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์) ของไพรเมอร์ 3 คู่ คือ ไพรเมอร์ P2/P8 (ช่องที่ 2-5), ไพรเมอร์ 1237L/1272H (ช่องที่ 6-9) และ ไพรเมอร์ 2550F/2718R (ช่องที่ 10-13) ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 50 คู่เบส (ช่องที่ 1 และ 14)

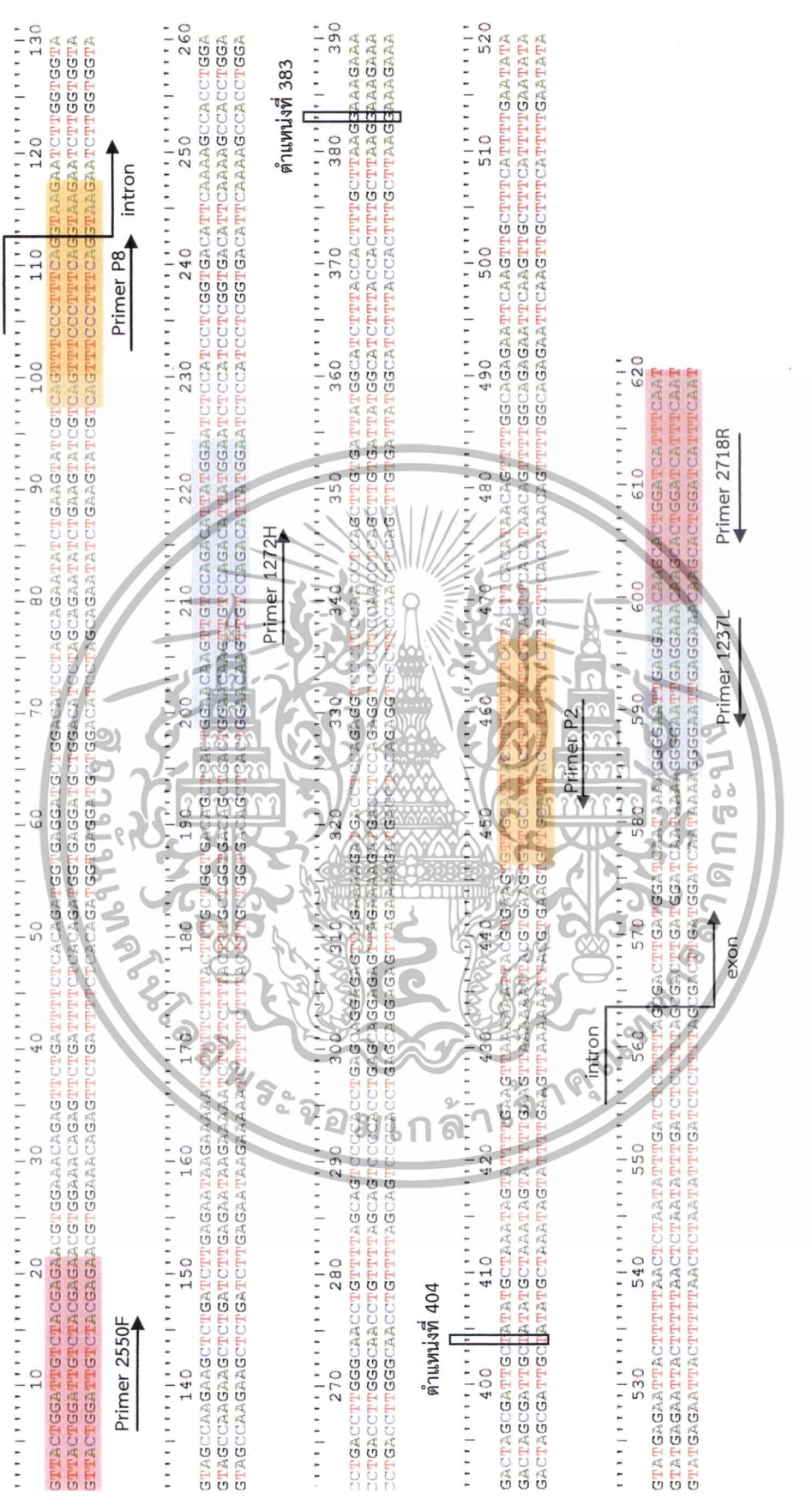
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำหรับไพรเมอร์ 1237L/1272H ซึ่งมีรายงานของ Jensen และคณะ (2003) ศึกษาการระบุเพศนกระหว่างไพรเมอร์ 1237L/1272H และไพรเมอร์ P2/P8 พบว่าในนก *Psittacula cyanocephala* ทั้งสองไพรเมอร์ให้ความแตกต่างระหว่างขนาดชิ้นดีเอ็นเอของอัลลีล *CHD-Z* และอัลลีล *CHD-W* เท่ากับ 40 คู่เบส ซึ่งมีความแตกต่างน้อยมาก ส่วนรายงานของ Wang และคณะ (2007) ใช้ไพรเมอร์ 1237L/1272H และไพรเมอร์ 2550F/2718R ระบุเพศนกจำนวน 80 สปีชีส์ พบว่าไพรเมอร์ 1237L/1272H ระบุได้ 63 สปีชีส์ ขณะที่ไพรเมอร์ 2550F/2718R ระบุได้ 59 สปีชีส์

4.2.2 ผลการหาตำแหน่งการจับของไพรเมอร์บริเวณยีน *CHD*

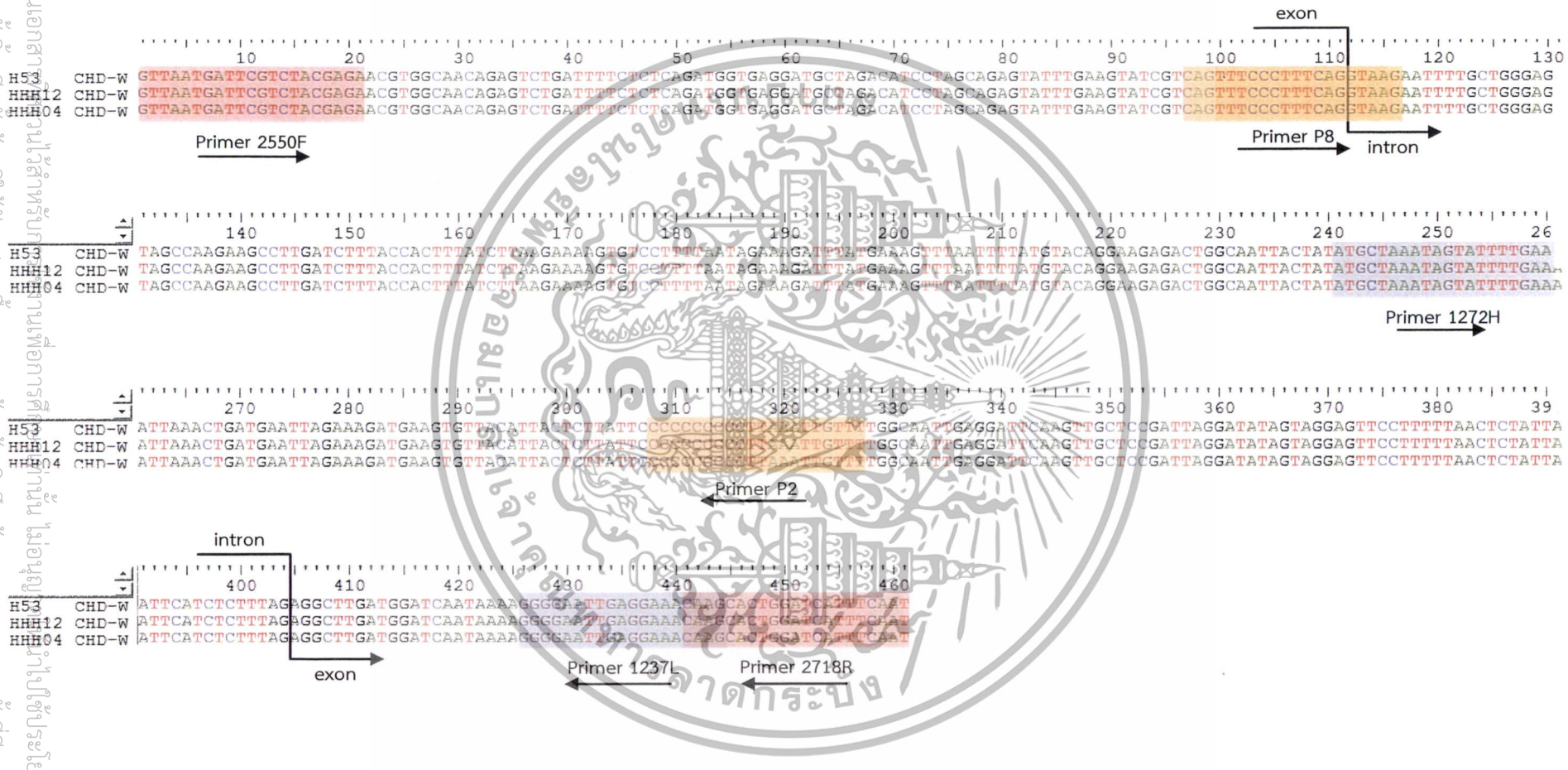
จากการศึกษาความแตกต่างของขนาดชิ้นดีเอ็นเอระหว่างอัลลีล *CHD-Z* และอัลลีล *CHD-W* ของนกตีนเทียน ด้วยการหาตำแหน่งการจับของไพรเมอร์บริเวณยีน *CHD* โดยการส่งวิเคราะห์ลำนิวคลีโอไทด์ และนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาจัดเรียงด้วยโปรแกรม bioedit พบตำแหน่งการจับของไพรเมอร์ 2550F/2718R ซึ่งทำให้ทราบความยาวของชิ้นดีเอ็นเอที่แน่นอนของทั้งอัลลีล *CHD-Z* และอัลลีล *CHD-W* โดยพบว่าอัลลีล *CHD-Z* มีความยาวของชิ้นดีเอ็นเอเท่ากับ 620 คู่เบส ประกอบไปด้วยส่วนของ exon จำนวน 2 ชิ้น คือลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 1-112 และ 562-620 และส่วนของ intron จำนวน 1 ชิ้น คือลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 113-561 ซึ่งมีขนาดเท่ากับ 449 คู่เบส ซึ่งยกตัวอย่างจำนวน 3 ตัวอย่าง คือ Hm92, Hm93 และ Hm94 ดังรูปที่ 4.4 ส่วนอัลลีล *CHD-W* พบว่ามีความยาวของชิ้นดีเอ็นเอเท่ากับ 461 คู่เบส โดยประกอบไปด้วยส่วนของ intron และ exon จำนวน 1 และ 2 ชิ้น ตามลำดับ ซึ่งส่วนของ exon อยู่บริเวณลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 1-111 และ 403-461 และส่วนของ intron แทรกอยู่บริเวณลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 112-402 ซึ่งมีขนาด 291 คู่เบส ซึ่งยกตัวอย่างจำนวน 3 ตัวอย่าง คือ H53, HHH04 และ HHH12 ดังรูปที่ 4.5 ในการค้นพบบริเวณ intron เป็นไปตามทฤษฎีของ Roger และ Wall (1980) ซึ่งกล่าวไว้ว่า บริเวณปลายของ exon จะมีลำดับนิวคลีโอไทด์เป็น AG และบริเวณเริ่มต้นของ intron จะมีนิวคลีโอไทด์เป็น GU หรือ GT โดยส่วนปลายของ intron จะมีกลุ่มเบสไพริมิดีนประมาณ 10 เบส และลงท้ายด้วย AG ทั้งนี้พบว่าอัลลีล *CHD-Z* และอัลลีล *CHD-W* มีขนาดแตกต่างกัน 159 คู่เบส ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่กล่าวว่าผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของอัลลีล *CHD-Z* และอัลลีล *CHD-W* มีขนาดดีเอ็นเอแตกต่างกันประมาณ 150-250 คู่เบส (Jensen และคณะ, 2003; Vucicevic และคณะ, 2012)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



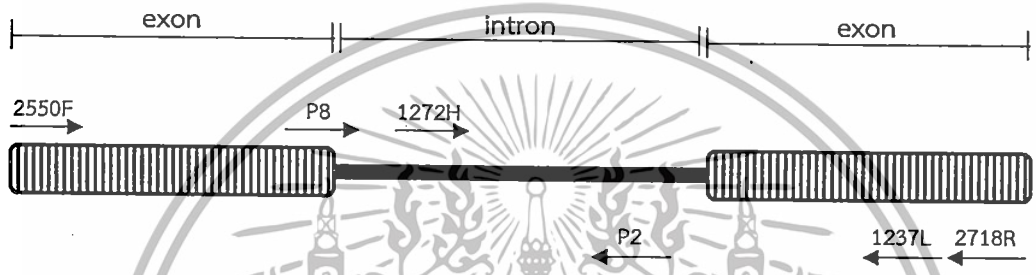
รูปที่ 4.4 แสดงตำแหน่งจับของไพรเมอร์ P2/P8 ไพรเมอร์ 1237L/1272H และไพรเมอร์ 2550F/2718R บนยีนยีด *CHD-Z* ของนกตีนเทียน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.5 แสดงตำแหน่งจับของไพรเมอร์ P2/P8 ไพรเมอร์ 1237L/1272H และไพรเมอร์ 2550F/2718R บนอัลลีล *CHD-W* ของนกตีนเทียน

นอกจากนี้ข้อมูลการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของอัลลีล *CHD-Z* และอัลลีล *CHD-W* เมื่อนำมาจำลองการเข้าจับของไพรเมอร์ทั้งสามคู่ คือ ไพรเมอร์ P2/P8 ไพรเมอร์ 1237L/1272H และไพรเมอร์ 2550F/2718R ได้ดังรูปที่ 4.6 จากการจำลองข้างต้นพบว่า คู่ไพรเมอร์ของ P2/P8 มีไพรเมอร์ P2 ที่เข้าจับบริเวณด้านใน intron ซึ่งทำให้ไม่สามารถเพิ่มปริมาณ intron ทั้งหมดได้ เช่นเดียวกับคู่ไพรเมอร์ 1237L/1272H มีไพรเมอร์ 1272H จับบริเวณด้านในของ intron เช่นเดียวกัน จากการทดลองข้างต้นอาจทำให้ไพรเมอร์ P2/P8 และไพรเมอร์ 1237L/1272H ไม่สามารถนำมาใช้ในการระบุเพศนกตีนเทียนได้ เนื่องจากไม่สามารถหาขนาดของ intron ที่แท้จริงได้



รูปที่ 4.6 ภาพจำลองการเข้าจับของไพรเมอร์ P2/P8 ไพรเมอร์ 1237L/1272H และไพรเมอร์ 2550F/2718R บริเวณยีน *CHD*

4.2.3 ผลการระบุเพศนก

จากการทดสอบหาไพรเมอร์ที่เหมาะสมที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน *CHD* เพื่อระบุเพศนกตีนเทียน พบว่าไพรเมอร์ที่เหมาะสมที่สุดคือ ไพรเมอร์ 2550F/2718R ซึ่งสามารถแยกความแตกต่างของอัลลีล *CHD-Z* และอัลลีล *CHD-W* ได้อย่างชัดเจน และมีความแตกต่างระหว่างอัลลีล 159 คู่เบส โดยเพศผู้เกิด 1 แถบของอัลลีล *CHD-Z* มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอประมาณ 620 คู่เบส และเพศเมียเกิด 2 แถบของอัลลีล *CHD-Z* และอัลลีล *CHD-W* ซึ่งมีขนาดชิ้นดีเอ็นเอประมาณ 620 และ 461 คู่เบส ตามลำดับ จากนั้นนำไพรเมอร์ 2550F/2718R ไปใช้ระบุเพศนกตีนเทียนทั้งหมด 277 ตัวอย่าง ที่ดักจับได้ในช่วงฤดูทำรังวางไข่ และฤดูอพยพ ในปีพุทธศักราช 2556-2558 จากผลการระบุเพศนกตีนเทียนทั้งหมด 277 ตัวอย่าง ดังตารางที่ 4.1 อัตราส่วนระหว่างนกเพศผู้ต่อนกเพศเมียของแต่ละฤดูมีค่าเท่ากับ 1:1 และมีตัวอย่างที่เก็บได้ในช่วงฤดูอพยพปีพุทธศักราช 2556 เก็บตัวอย่างได้จำนวน 94 ตัวอย่าง ไม่สามารถระบุเพศได้จำนวน 2 ตัวอย่าง คิดเป็น 2.1 เปอร์เซ็นต์ คือตัวอย่างรหัส Hm30 และ Hm32 ทั้งนี้ปัญหาที่เกิดขึ้นอาจเกิดจากการซับเลือดลงบนกระดาษ FTA ที่มีปริมาณมากเกินไป ทำให้ยากต่อการทำให้บริสุทธิ์ หรือไม่สามารถกำจัดเศษเซลล์และสิ่งสกปรกออกได้หมด ทำให้รบกวนขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ดังนั้นจึงมีความระมัดระวังการเก็บตัวอย่างในฤดูถัดมา โดยซับเลือดให้กระจายทั่วกระดาษ FTA เท่านั้น ไม่ซับจนเลือดทะลุกระดาษ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หรือมีตัวอย่างเลือดมากเกินไป เพื่อให้ง่ายต่อขั้นตอนการทำให้กระดาษ FTA บริสุทธิ์ หลังจากการปรับปรุงวิธีการซับเลือด พบว่าตัวอย่างที่ซับเลือดลงบนกระดาษ FTA สามารถระบุเพศได้ 100 เปอร์เซ็นต์ มีเพียงตัวอย่างที่เก็บในช่วงฤดูอพยพ ปีพุทธศักราช 2557 จากตัวอย่างนกทั้งหมด 103 ตัวอย่าง ไม่สามารถระบุเพศได้จำนวน 1 ตัวอย่าง คิดเป็น 1 เปอร์เซ็นต์ คือตัวอย่างรหัส HHm64 ซึ่งเป็นตัวอย่างที่สกัดดีเอ็นเอมาจากเนื้อเยื่อบริเวณปลอกขน ทั้งนี้อาจเกิดจากเนื้อเยื่อมีปริมาณน้อย จึงทำให้มีดีเอ็นเอน้อยเกินไปจนไม่สามารถเพิ่มปริมาณเพื่อระบุเพศนกได้

จากการแบ่งตัวอย่างนกตีนเทียนออกเป็น 6 ลักษณะตามรูปที่ 4.1 ทำให้ทราบว่านกในฤดูทำรังวางไข่ และนกในฤดูอพยพ มีความแตกต่างกันเล็กน้อย กล่าวคือนกที่มีลักษณะสีบริเวณกระหม่อม และท้ายทอยสีเทา (รูปที่ 4.1จ) และ กระหม่อม และท้ายทอยสีเทา บริเวณขอบตาสีเทาเข้ม (รูปที่ 4.1ฉ) ซึ่งมีบริเวณโคนปากเป็นสีชมพูอ่อน จะไม่พบนก 2 ลักษณะนี้ในฤดูทำรังวางไข่ พบเพียงฤดูอพยพเท่านั้น และเชื่อว่าเป็นนกที่ยังโตไม่เต็มวัย ส่วนนกที่พบในฤดูทำรังวางไข่ ซึ่งเป็นนกที่โตเต็มวัยแล้วจะมีปากสีดำสนิท จากการเปรียบเทียบลักษณะสีขนบริเวณกระหม่อม และท้ายทอยของนกตีนเทียน กับผลการทดลองการระบุเพศในตารางที่ 4.3 พบว่าสีขนบริเวณกระหม่อม และท้าย-ทอยของนกตีนเทียนไม่สามารถระบุเพศได้ ซึ่งไม่สอดคล้องกับการรายงานก่อนหน้านี้ ที่กล่าวว่า ตัวผู้มีสีบริเวณกระหม่อมและท้ายทอยเป็นสีขาว และเพศเมียมีกระหม่อมและท้ายทอยเป็นสีเทา (โอภาส, 2543) เนื่องจากนกตีนเทียนที่มีลักษณะสีบริเวณกระหม่อมและท้ายทอยเป็นสีขาวมีทั้งเพศผู้ และเพศเมีย มีเพียงลักษณะกระหม่อม และท้ายทอยสีเทา บริเวณขอบตาสีเทาเข้ม ดังรูปที่ 4.1ฉ เท่านั้น ที่พบว่าส่วนใหญ่เป็นเพศผู้ ดังนั้นหากนำลักษณะภายนอกมาระบุเพศจะมีเพียง นกที่มีบริเวณขอบตาเป็นสีเทาหรือดำเข้มเท่านั้น ที่มีแนวโน้มเป็นนกเพศผู้ และจากข้อมูลจึงยังไม่สามารถระบุเพศจากสีขนดังกล่าวมาแล้ว ซึ่งควรทำการศึกษาร่วมกับลักษณะอื่นๆ เช่น ความยาวปาก ความยาวปีก และความยาวหน้าแข้ง ต่อไป

ตารางที่ 4.2 แสดงผลการระบุเพศนกตีนเทียนในช่วงฤดูทำรังวางไข่ และฤดูอพยพ ในปีพุทธศักราช 2556-2558

ฤดู	ปี พ.ศ.	เพศผู้ (ตัว)	เพศเมีย (ตัว)	ไม่สามารถระบุเพศได้	รวม (ตัว)
ทำรังวางไข่	2556	16	16	-	32
	2557	20	15	-	35
	2558	7	6	-	13
อพยพ	2556	52	40	2	94
	2557	49	53	1	103
รวม (ตัว)		144	130	3	277

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นอกจากนี้เนื่องจากมีการดักจับนกตีนเทียนในฤดูทำรังวางไข่จำนวน 2 ตัว จากรังเดียวกัน รวมทั้งหมด 4 คู่ คือ H7/H8, HH05/HH04, HH11/HH17 และ HH25/HH23 เมื่อระบุเพศพบว่าในแต่ละคู่นั้นมีเพศผู้ และเพศเมีย อย่างละ 1 ตัวอย่าง จึงทำให้ทราบว่านกตีนเทียนทั้งเพศผู้และเพศเมียจะสลับกันกกไข่ทั้งเพศผู้ และเพศเมีย สอดคล้องกับรายงานของโอภาส (2543)

ตารางที่ 4.3 แสดงผลการระบุเพศนกตีนเทียนในช่วงฤดูทำรังวางไข่ และฤดูอพยพ ในปีพุทธศักราช 2556-2558 โดยแยกตัวอย่างนกตีนเทียนออกเป็น 6 ลักษณะ ตามลักษณะสีขนบริเวณกระหม่อมและท้ายทอย

ฤดู	ปี พ.ศ.	ลักษณะสีขนบริเวณกระหม่อมและท้ายทอย (เพศผู้ : เพศเมีย)						รวม
		ก	ข	ค	ง	จ	ฉ	
ทำรังวางไข่	2556	14 : 16	1 : 0	1 : 0	-	-	-	16 : 16
	2557	15 : 13	2 : 0	1 : 2	2 : 0	-	-	20 : 15
	2558	5 : 4	2 : 0	0 : 2	-	-	-	7 : 6
อพยพ	2557	13 : 14	5 : 3	1 : 4	2 : 1	25 : 18	5 : 0	51 : 40
	2558	6 : 6	4 : 5	2 : 2	1 : 0	18 : 39	17 : 1	48 : 53

หมายเหตุ : ก : กระหม่อม และท้ายทอยสีขาว ข : กระหม่อม และท้ายทอยสีขาว ปลายขนสีดำ
ค : กระหม่อมสีขาว และท้ายทอยสีดำอ่อน ง : กระหม่อมสีขาว และท้ายทอยสีดำเข้ม
จ : กระหม่อม และท้ายทอยสีเทา ฉ : กระหม่อม และท้ายทอยสีเทา บริเวณขอบตาสีเทาเข้ม โดยไม่สามารถถ่ายรูปได้ 2 ตัวอย่าง และไม่สามารถระบุเพศได้จำนวน 3 ตัวอย่าง

4.2.4 ผลการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณอัลลีล *CHD-Z*

จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน *CHD* ด้วยไพรเมอร์ 2550F/2718R เพื่อระบุเพศนกตีนเทียน และลักษณะสีขนบริเวณกระหม่อมและท้ายทอยของนกที่มีความหลากหลาย จึงสนใจศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของอัลลีล *CHD-Z* เนื่องจากอัลลีล *CHD-Z* เป็นอัลลีลที่สามารถพบได้ทั้งนกเพศผู้และเพศเมีย และสามารถแบ่งนกได้ตามหลักอนุกรมวิธาน ตามงานวิจัยของสมชาติ และดุจฤดี (2014) ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของอัลลีล *CHD-Z* และอัลลีล *CHD-W* พบว่าสามารถแยกนกปรอดหัวโขน (*Pycnonotus jocosus*) และนกปรอดจีน (*P. sinensis*) ซึ่งอยู่ในอันดับ Passeriformes ออกจากนก skylark (*Alauda arvensis*) และ นก common swift (*Apus apus*) ซึ่งอยู่ในอันดับ Apodiformes ได้อย่างชัดเจน นอกจากนี้ยังมีรายงานของณิชาภัทร และคณะ (2013) ศึกษายีน *CHD-Z* ของนกในสกุลนกหัวโตเล็กจำนวน 3 สปีชีส์ คือ หัวโตทรายเล็ก (*Charadrius mongolus*) หัวโตทรายใหญ่ (*C. leschenaultii*) และหัวโตขาดำ (*C. alexandrinus*) พบว่าลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

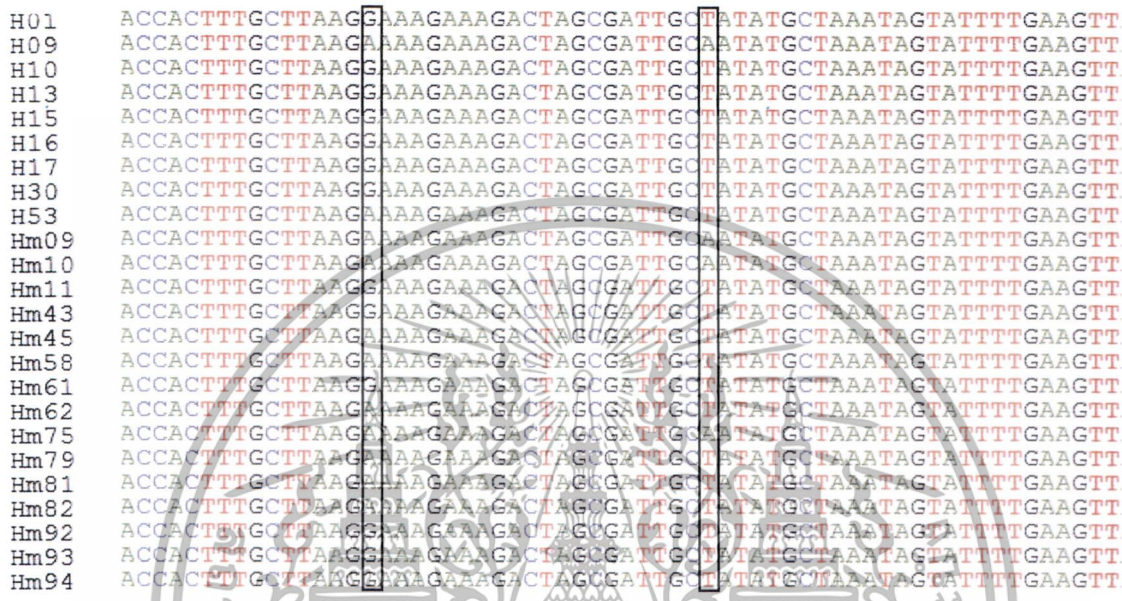
นิวคลีโอไทด์ของยีน *CHD-Z* สามารถแยก *C. alexandrinus* ออกจาก *C. mongolus* และ *C. leschenaultii* ได้ เนื่องจากมีลำดับนิวคลีโอไทด์ต่างกันอยู่ 13 คู่เบส

ดังนั้นจึงสนใจศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณอัลลีล *CHD-Z* ของนกตีนเทียน โดยสุ่มตัวอย่างจากสีขนบริเวณกระหม่อม และท้ายทอยของนกตีนเทียน โดยเป็นตัวอย่างนกตีนเทียนจากฤดูทำรังวางไข่จำนวน 9 ตัวอย่าง และฤดูอพยพจำนวน 15 ตัวอย่าง รวมเป็นจำนวน 24 ตัวอย่าง นำตัวอย่างทั้งหมดส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ไป blast เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank ใน NCBI พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของอัลลีล *CHD-Z* ทั้งหมดมีความใกล้เคียงกับ *CHD-Z* ของนกกินหอยปากแดง (*Haematopus ostralegus*) (AY178119.1) มากที่สุด ซึ่งเป็นนกในวงศ์เดียวกันกับนกตีนเทียน โดยมีค่า identity เท่ากับ 93 เปอร์เซ็นต์ และค่า e-value เท่ากับ 0 ข้อมูลนี้แสดงให้เห็นว่ายังไม่มีรายงานการวิจัยของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *CHD* ของนกในสกุลตีนเทียน จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดมาจัดเรียง และวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม bioedit พบการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ หรือการแสดง single nucleotide polymorphism (SNP) ซึ่งเป็นการแปรผันทางพันธุกรรมที่ทำให้ลำดับนิวคลีโอไทด์ 1 ตำแหน่งเปลี่ยนไป โดยในรายงานของกนกวรรณ และวรัญญา (2007) ซึ่งศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในมนุษย์กล่าวว่า SNP สามารถเกิดขึ้นได้ทุกๆ 300-500 นิวคลีโอไทด์ของจีโนมมนุษย์ โดย SNP ที่พบในนกตีนเทียนแบ่งออกเป็น 2 แบบ คือ transversion เป็นการเปลี่ยนแปลงของเบสหมู่เบสพิวรีนไปเป็นเบสไพริมิดีน หรือเบสไพริมิดีนไปเป็นพิวรีน และ transition เป็นการเปลี่ยนแปลงของเบสในหมู่เดียวกัน ทั้งนี้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณอัลลีล *CHD-Z* พบ SNP แบบ transition จำนวน 1 ตำแหน่ง โดยมีการเปลี่ยนแปลงของเบสกวานีน (G) และเบสอะดีนีน (A) บริเวณตำแหน่งที่ 383 ดังรูปที่ 4.7ก ทั้งยังพบ SNP แบบ transversion จำนวน 1 ตำแหน่ง โดยเป็นการเปลี่ยนแปลงของเบสอะดีนีน (A) และเบสไทมีน (T) บริเวณตำแหน่งที่ 404 ดังรูปที่ 4.7ข การเปลี่ยนแปลงดังกล่าว ณิชาภัทร (2557) กล่าวว่าการเกิด SNP อาจเกิดจากการปรับตัวเพื่อให้เหมาะสมต่อสภาพแวดล้อม และการดำรงชีวิต จึงมีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม เพื่อให้เกิดความหลากหลาย และสปีชีส์ใหม่

สำหรับการเกิด SNP ในนกชนิดอื่น พบงานวิจัยของ Primmer และคณะ (2002) ศึกษาการเกิด SNP ในนกจับแมลงจำนวน 2 สปีชีส์ คือ *Ficedula hypoleuca* และ *F. albicollis* โดยศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวน 9,082 และ 9,164 คู่เบส ตามลำดับ พบว่านก *F. hypoleuca* โดยเฉลี่ยจะพบการเกิด SNP จำนวน 1 ตำแหน่งต่อ 175 คู่เบส ส่วนนก *F. albicollis* พบ SNP ทุกๆ 150 คู่เบส จากงานวิจัยดังกล่าวสอดคล้องกับการเกิด SNP จำนวน 2 ตำแหน่ง บริเวณอัลลีล *CHD-Z* ของนกตีนเทียน ซึ่งมีอัตราการเปลี่ยนแปลง 290 คู่เบสต่อนิวคลีโอไทด์ นอกจากนี้ยังมีรายงานของ Fagerberg (2006) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ของนกป่า 3 สปีชีส์ คือนกจับแมลง (*Ficedula albicollis*) นกติ๊ดสีน้ำเงิน (*Parus caerurelus*) และนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(*Acrocephalus arundinaceus*) พบว่าจากลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวน 63.4 กิโลเบส จะพบ SNP ในนกจับแมลงมากที่สุด จำนวน 173 ตำแหน่ง ส่วนนกติ๊ดสีน้ำเงิน และนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น พบ SNP จำนวน 103 และ 68 ตำแหน่ง ตามลำดับ โดยมีค่าเฉลี่ยการเกิด SNP ในนกจับแมลง นกติ๊ดสีน้ำเงิน และนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น คือ 80, 241 และ 351 คู่เบส ตามลำดับ



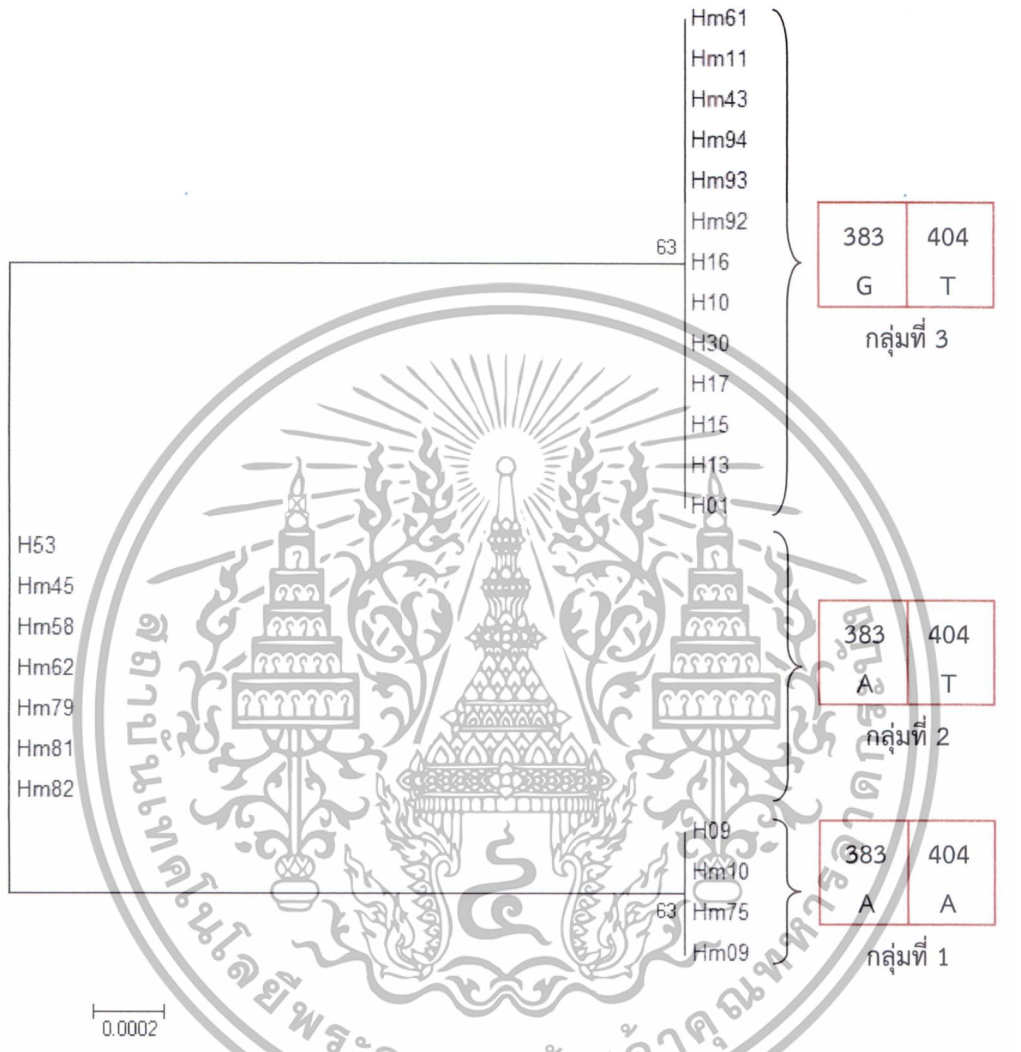
ก. ตำแหน่งที่ 383 ข. ตำแหน่งที่ 404

รูปที่ 4.7 แสดงการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของอัลลีล *CHD-Z* และการเกิด SNP โดยบริเวณ
ก : ลำดับนิวคลีไทด์ตำแหน่งที่ 383 เป็น SNP แบบ transition
ข : ลำดับนิวคลีไทด์ตำแหน่งที่ 404 เป็น SNP แบบ transversion
หมายเหตุ : H, HH, HHH = ฤดูทำรังวางไข่ ปี 2556, 2557, 2558 ตามลำดับ
Hm, HHm = ฤดูอพยพ ปี 2556, 2557 ตามลำดับ

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของอัลลีล *CHD-Z* ดังกล่าว มาหาความสัมพันธ์ด้วยการสร้าง phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA6 โดยใช้พารามิเตอร์แบบ neighbor-joining และโมเดลของ Kimura 2-parameter ระบุค่า bootstraping เท่ากับ 1000 พบว่ามีการแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ตามลักษณะการเกิด SNP ของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณตำแหน่งที่ 383 และ 404 คือ กลุ่มที่ 1 มีลำดับนิวคลีโอไทด์เป็น A และ A ตามลำดับ ประกอบไปด้วยตัวอย่าง H09, Hm09, Hm10 และ Hm75 กลุ่มที่ 2 มีลำดับนิวคลีโอไทด์เป็น A และ T ตามลำดับ ประกอบด้วยตัวอย่าง H53, Hm45, Hm58, Hm62, Hm79, Hm81 และ Hm82 ส่วนกลุ่มที่ 3 มีลำดับนิวคลีโอไทด์เป็น G และ T ตามลำดับ ประกอบด้วย H01, H10, H13, H15, H16, H17, H30, Hm11, Hm43, Hm61, Hm92,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Hm93 และ Hm94 ดังแสดงในรูปที่ 4.8 ซึ่งการแบ่งกลุ่มดังกล่าวไม่สอดคล้องกับลักษณะสีขนบริเวณกระหม่อม และท้ายทอยของนกตีนเทียน รวมทั้งไม่สอดคล้องกับฤดูกาลที่เก็บตัวอย่างนก



รูปที่ 4.8 แสดง phylogenetic tree ของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณอัลลีล *CHD-Z* ของนกตีนเทียน ด้วยโปรแกรม MEGA6 โดยใช้พารามิเตอร์แบบ neighbor-joining และโมเดลของ Kimura 2-parameter โดยให้มีค่า bootstraping เท่ากับ 1000

4.3 ผลการระบุสปีชีส์ด้วยยีน *COI*

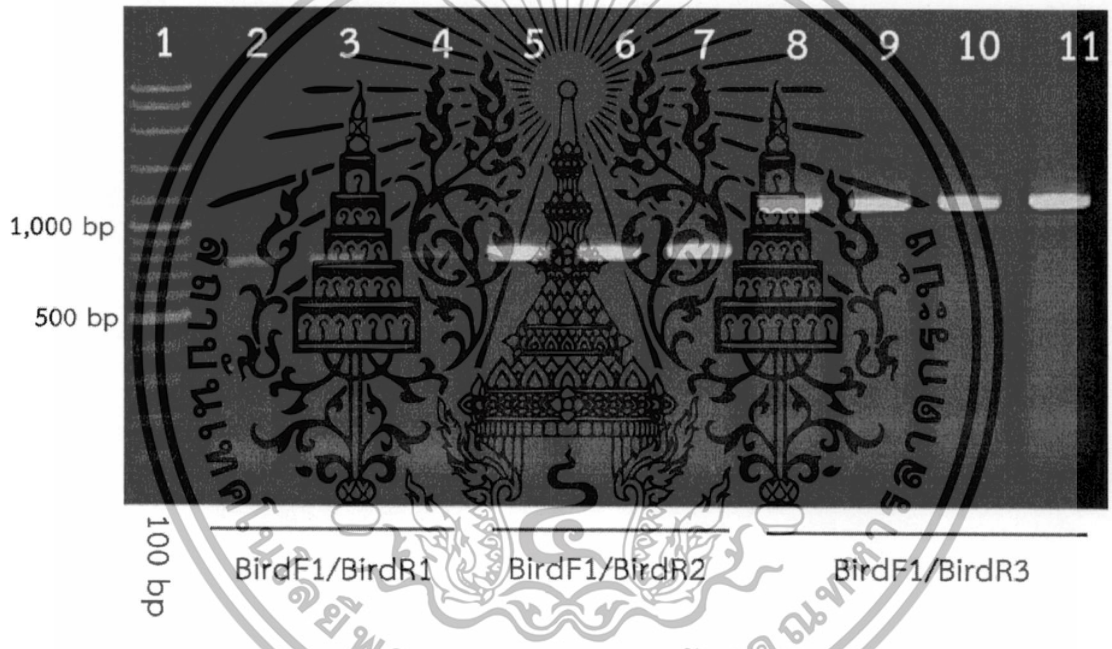
การนำยีน *COI* มาใช้ในการระบุสปีชีส์ พบว่ามีการศึกษายีนนี้ในนกหลายชนิด เช่น การศึกษานก 260 สปีชีส์ ที่พบว่าทำรังวางไข่ในทวีปอเมริกาเหนือ สามารถจำแนกความแตกต่างแต่ละสปีชีส์ได้ นอกจากนี้ยังสามารถจำแนกความแตกต่างของสปีชีส์ที่ใกล้เคียงกันได้ด้วย (Herbert และคณะ, 2004) จึงสนใจใช้ยีน *COI* ในการระบุสปีชีส์ของนกตีนเทียนที่ดักจับจากบริเวณเขตห้ามล่าสัตว์ป่าบึงบอระเพ็ด จังหวัดนครสวรรค์ โดยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์บริเวณยีน *COI* ซึ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในช่วงแรกมีการตรวจสอบหาไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในนกตีนเทียน โดยใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 3 คู่ คือ ไพรเมอร์ BirdF1/BirdR1 ไพรเมอร์ BirdF1/BirdR2 และไพรเมอร์ BirdF1 /BirdR3 (Herbert และคณะ, 2004) โดยใช้อุณหภูมิในขั้นตอน annealing แตกต่างกัน ดังรูปที่ 4.9 ไพรเมอร์ BirdF1/BirdR1 ใช้อุณหภูมิ 58, 59 และ 60 องศาเซลเซียส ในช่องที่ 2, 3 และ 4 ตามลำดับ ไพรเมอร์ BirdF1/BirdR2 ใช้อุณหภูมิ 58, 59 และ 60 องศาเซลเซียส ในช่องที่ 5, 6 และ 7 ตามลำดับ และไพรเมอร์ BirdF1/BirdR3 ใช้อุณหภูมิ 57, 58, 59 และ 60 องศาเซลเซียส ในช่องที่ 8, 9, 10 และ 11 ตามลำดับ จากผลการตรวจสอบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส พบว่าไพรเมอร์ทั้งสามคู่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน *COI* ได้ โดยไพรเมอร์ BirdF1/BirdR1 และไพรเมอร์ BirdF1/BirdR2 มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอประมาณ 800 คู่เบส ส่วนไพรเมอร์ BirdF1/BirdR3 มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอประมาณ 1,000 คู่เบส สำหรับงานวิจัยนี้เลือกใช้ไพรเมอร์ BirdF1/BirdR3 และเลือกใช้อุณหภูมิในขั้นตอน annealing เท่ากับ 60 องศาเซลเซียส เนื่องจากไพรเมอร์ BirdF1/BirdR3 ให้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอยาวกว่าไพรเมอร์ BirdF1/BirdR2 เมื่อได้ไพรเมอร์ที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแล้ว คัดเลือกตัวอย่างเพื่อศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะสีขนบริเวณกระหม่อม และท้ายทอย โดยคัดเลือกจาก 6 ลักษณะ ดังรูปที่ 4.1 ให้ครอบคลุมทั้งฤดูทำรังวางไข่ และฤดูอพยพ คัดเลือกตัวอย่างมาศึกษาทั้งหมด 19 ตัวอย่าง แบ่งออกเป็นลักษณะที่ 1 (รูปที่ 4.1ก) กระหม่อมและท้ายทอยสีขาว จำนวน 4 ตัวอย่าง ได้แก่ Hm83, HHm54, HH31 และ HHH03 ลักษณะที่ 2 (รูปที่ 4.1ข) กระหม่อม และท้ายทอยสีขาว ปลายขนสีดำ จำนวน 5 ตัวอย่าง ได้แก่ Hm58, HHm51, HH34, HHH08 และ HHH13 ลักษณะที่ 3 (รูปที่ 4.1ค) กระหม่อมสีขาว และท้ายทอยสีดำอ่อน จำนวน 3 ตัวอย่าง ได้แก่ HHm84, HH27 และ HHH12 ลักษณะที่ 4 (รูปที่ 4.1ง) กระหม่อมสีขาว และท้ายทอยสีดำเข้ม จำนวน 3 ตัวอย่าง ได้แก่ Hm45, HHm42 และ HH05 ลักษณะที่ 5 (รูปที่ 4.1จ) กระหม่อม และท้ายทอยสีเทา จำนวน 2 ตัวอย่าง ได้แก่ Hm23 และ HHm76 และลักษณะที่ 6 (รูปที่ 4.1ฉ) กระหม่อม และท้ายทอยสีเทา บริเวณขอบตาสีเทาเข้ม จำนวน 2 ตัวอย่าง ได้แก่ Hm81 และ HHm16 นำตัวอย่างนั้นมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ BirdF1/BirdR3 และส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank จาก NCBI ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *COI* ของตัวอย่างนกตีนเทียน มีความใกล้เคียงกับ *Himantopus himantopus* (JF498780, AB843544, EU525416, EU525417 และ EU525418) มากที่สุด โดยมีค่า identity เท่ากับ 99 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังมีนกในสกุลตีนเทียนที่มีความใกล้เคียงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในงานทดลองนี้อีก ดังตารางที่ 4.4 ได้แก่ *Himantopus himantopus leucocephalus* (EU525419, EU525420, EU525421 และ EU525422) *Himantopus himantopus melanurus* (EU525423, EU525424, EU525425 FJ027650 และ FJ027652) รวมถึง *Himantopus mexicanus* (AY666255 และ JN801726) ซึ่งมีค่า identity เท่ากับ 98 เปอร์เซ็นต์ มีเพียงรหัส DQ385166 ที่มีค่า identity เท่ากับ 97 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นอกจากนี้ยังมีนกในวงศ์เดียวกันคือ *Recurvirostra americana* (EU525493) และ *R. andina* (EU525495) มีค่า identity เท่ากับ 93 และ 92 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากนั้นจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม bioedit เพื่อหาตำแหน่งการจับของไพรเมอร์ BirdF1/BirdR3 โดยยกตัวอย่างเพียง 3 ตัวอย่าง คือ Hm23, HHm42 และ HHm84 ดังรูปที่ 4.10 ซึ่งพบว่าความยาวของชิ้นดีเอ็นเอมีค่าเท่ากับ 1,059 คู่เบส ส่วนไพรเมอร์ BirdF1/BirdR1 และไพรเมอร์ BirdF1/BirdR2 มีตำแหน่งการจับของไพรเมอร์อยู่บริเวณใกล้กัน ทำให้ขนาดชิ้นดีเอ็นเอมีขนาดใกล้เคียงกัน คือ 745 และ 748 คู่เบส ตามลำดับ ทั้งนี้สอดคล้องกับผลจากการตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส ซึ่งไพรเมอร์ BirdF1/BirdR1 และไพรเมอร์ BirdF1/BirdR2 มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอประมาณ 800 คู่เบส ส่วนไพรเมอร์ BirdF1/BirdR3 มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอประมาณ 1,000 คู่เบส



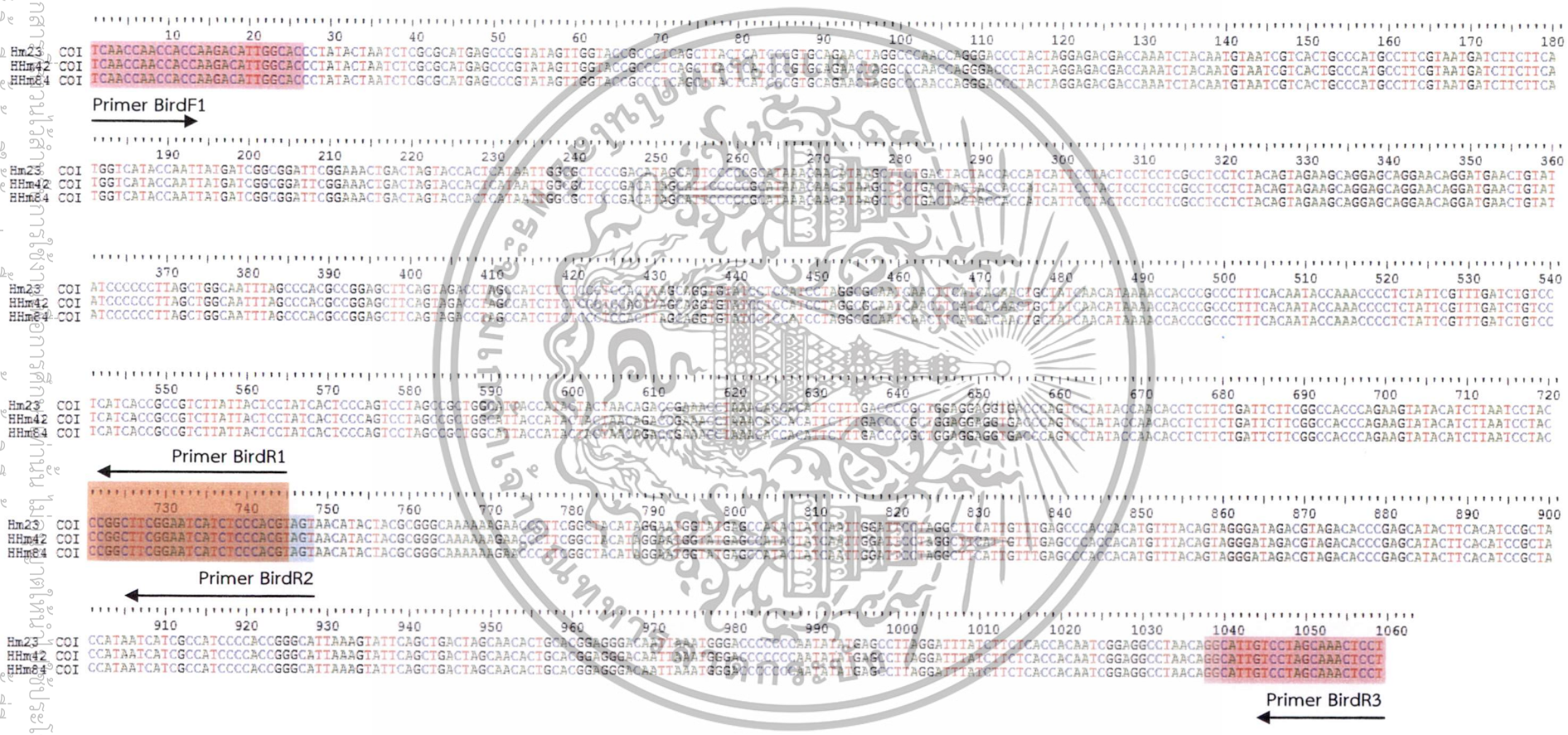
รูปที่ 4.9 แสดงผลการหาไพรเมอร์ที่เหมาะสมในเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน *COI* ตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (เจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์) ของไพรเมอร์ 3 คู่ คือ ช่องที่ 1 : ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส ช่องที่ 2-4 : ไพรเมอร์ BirdF1/BirdR1 ที่อุณหภูมิ 58, 59 และ 60 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ช่องที่ 5-7 : ไพรเมอร์ BirdF1/BirdR2 ที่อุณหภูมิ 58, 59 และ 60 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และ ช่องที่ 8-11 : ไพรเมอร์ BirdF1/BirdR3 ที่อุณหภูมิ 57, 58, 59 และ 60 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 แสดงสปีชีส์ accession number ค่า identity และสถานที่ที่เก็บตัวอย่างของนกตีนเทียนพบในฐานข้อมูล GenBank ใน NCBI

สปีชีส์	Accession number	ค่า identity	ประเทศ
Himantopus himantopus	-	100%	ไทย
Himantopus himantopus	JF498780	99%	อิรัก
Himantopus himantopus	AB843544	99%	ญี่ปุ่น
Himantopus himantopus	EU525416	99%	นามิเบีย
Himantopus himantopus	EU525417	99%	แอฟริกาใต้
Himantopus himantopus	EU525418	99%	แอฟริกาใต้
Himantopus himantopus leucocephalus	EU525419	98%	ออสเตรเลีย
Himantopus himantopus leucocephalus	EU525420	98%	ออสเตรเลีย
Himantopus himantopus leucocephalus	EU525421	98%	นิวซีแลนด์
Himantopus himantopus leucocephalus	EU525422	98%	ออสเตรเลีย
Himantopus himantopus melanurus	EU525423	98%	บราซิล
Himantopus himantopus melanurus	EU525424	98%	บราซิล
Himantopus himantopus melanurus	EU525425	98%	บราซิล
Himantopus himantopus melanurus	FJ027650	98%	อาร์เจนตินา
Himantopus himantopus melanurus	FJ027652	98%	อาร์เจนตินา
Himantopus mexicanus	DQ385166	97%	ไม่มีข้อมูล
Himantopus mexicanus	AY666255	98%	สหรัฐอเมริกา
Himantopus mexicanus	JN801726	98%	บราซิล
Recurvirostra americana	EU525493	93%	แคนาดา
Recurvirostra andina	EU525495	92%	ชิลี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.10 แสดงตำแหน่งจับของไพรเมอร์ BirdF1/BirdR1, BirdF1/BirdR2 และ BirdF1/BirdR3 บริเวณยีน *COI* ของนกตีนเทียน

จากนั้นนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างนกตีนเทียนทั้ง 19 ตัวอย่าง และลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากฐานข้อมูล GenBank ใน NCBI ดังตารางที่ 4.4 มาศึกษาหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยการสร้าง phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA6 โดยใช้พารามิเตอร์แบบ neighbor-joining และโมเดลของ Kimura 2-parameter ระบุค่า bootstraping เท่ากับ 1000 พบว่าสามารถแยกออกเป็น 5 กลุ่ม ดังรูปที่ 4.11 ตามสปีชีส์ของนกในสกุลตีนเทียน คือ (1) *Himantopus himantopus* (2) *H. himantopus leucocephalus* (3) *H. himantopus melanurus* (4) *H. mexicanus* และ (5) genus *Recurvirostra* ประกอบด้วย *R. americana* และ *R. andina* ซึ่งเป็นนกที่อยู่ในวงศ์เดียวกับนกในสกุลตีนเทียน (genus *Himantopus*) ใช้เป็น outgroup ทั้งนี้ตัวอย่างนกตีนเทียนทั้ง 19 ตัวอย่างจัดอยู่ในกลุ่ม *H. himantopus* จากผลการทดลองดังกล่าวทำให้ทราบว่ายีนบริเวณ *COI* สามารถจำแนกนกในสกุลตีนเทียนแต่ละสปีชีส์ออกจากกันได้อย่างชัดเจน ซึ่งสอดคล้องกับการจัดจำแนกนกในสกุลตีนเทียนออกเป็น 5 สปีชีส์ตาม Gill (2006) ที่เพิ่ม *H. novaezelandiae* ที่มีขนสีดำอีกหนึ่งกลุ่ม นอกจากจะสามารถจำแนกนกในสกุลตีนเทียนตามลักษณะสีขนบริเวณคอได้แล้ว จากการดูข้อมูลในตารางที่ 4.4 พบว่านกในสกุลตีนเทียนยังสามารถจำแนกได้จากสถานที่อยู่อาศัย สอดคล้องกับ Gill (2006) ซึ่งกล่าวว่า *H. himantopus* จะพบได้บริเวณทวีปยุโรป เอเชีย และแอฟริกา สอดคล้องกับตัวอย่างที่นำมาศึกษา ซึ่งเก็บตัวอย่างมาจากประเทศอิรัก ญี่ปุ่น และแอฟริกาใต้ เช่นเดียวกับ *H. himantopus leucocephalus* ที่จะพบบริเวณประเทศออสเตรเลีย นิวซีแลนด์ และหมู่เกาะใกล้เคียงในมหาสมุทรแปซิฟิก ส่วน *H. himantopus melanurus* และ *H. mexicanus* จะพบบริเวณทวีปอเมริกา ถึงแม้ว่างานวิจัยนี้จะไม่มีการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *H. novaezelandiae* มาใช้ในการเปรียบเทียบ เนื่องจากไม่พบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *COI* จากฐานข้อมูล GenBank ใน NCBI แต่จากผลการทดลองข้างต้นมีแนวโน้มว่ายีน *COI* จะสามารถจำแนก *H. novaezelandiae* ออกจากสปีชีส์อื่นได้อย่างชัดเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.11 แสดง phylogenetic tree จากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *COI* ของนกในสกุลตีนเทียน โดยใช้พารามิเตอร์แบบ neighbor-joining และโมเดลของ Kimura 2-parameter โดยให้มีค่า bootstaping เท่ากับ 1000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 ผลการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค iPBS

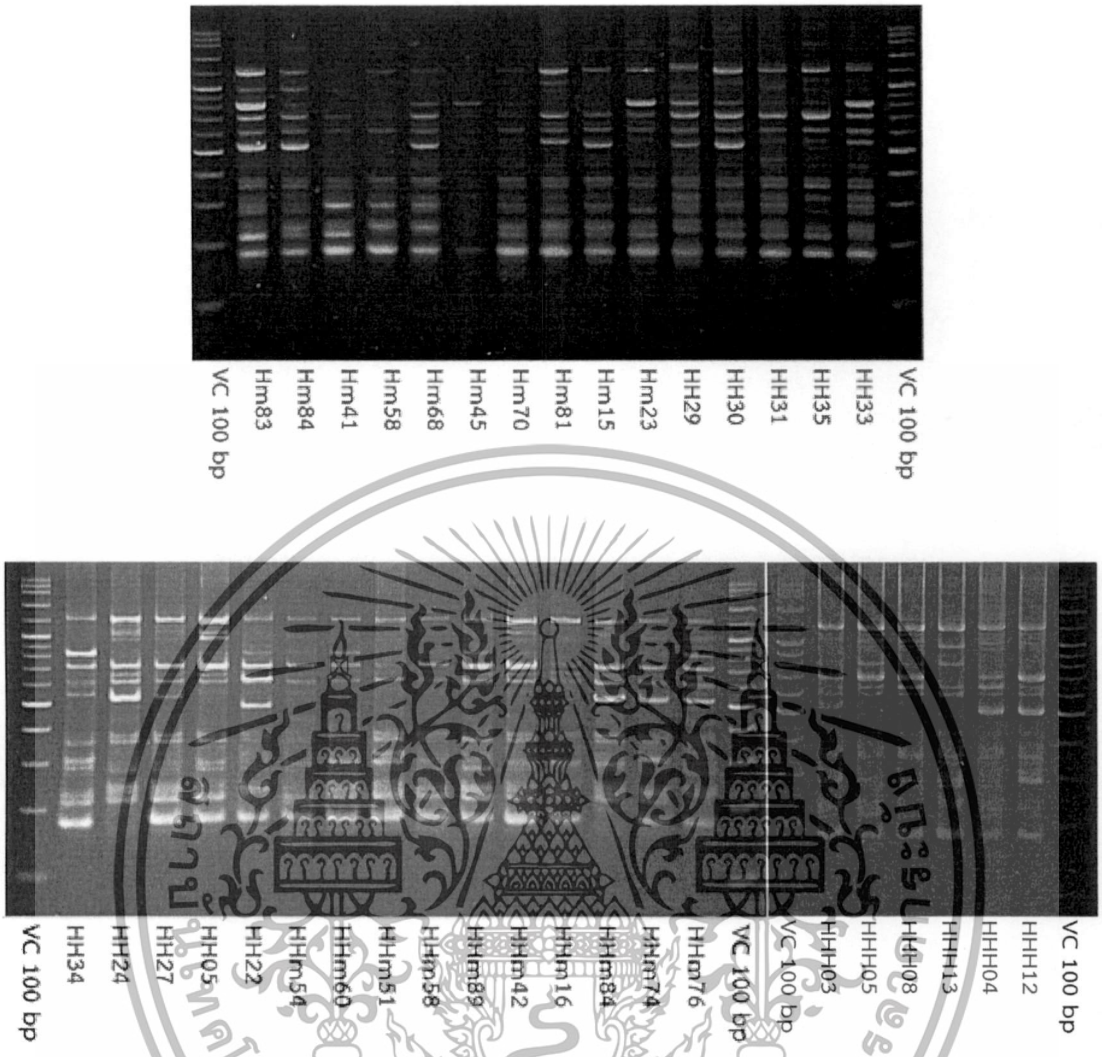
4.4.1 ผลการหาไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม

ในการหาไพรเมอร์ที่เหมาะสมต่อการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค iPBS จะสุ่มตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดเลือดหรือเนื้อเยื่อบริเวณโคนขนของนกตีนเทียนจำนวน 1 ตัวอย่าง เพื่อนำมาใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยจะทดสอบกับไพรเมอร์ iPBS จำนวน 40 ไพรเมอร์ ซึ่งจะใช้อุณหภูมิในขั้นตอน annealing ตามตารางที่ 3.3 ซึ่งแบ่งออกเป็น 7 กลุ่มอุณหภูมิ ได้แก่ อุณหภูมิ 50, 51, 52, 53, 55, 57 และ 63 องศาเซลเซียส โดยแบ่งกลุ่มอุณหภูมิตามค่า optimal annealing temperature (T_a) ที่ใกล้เคียงกัน จากนั้นเมื่อตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส เพื่อคัดเลือกไพรเมอร์ที่ให้แถบแบนชัดเจน พบว่ามีไพรเมอร์จำนวน 11 ไพรเมอร์ที่ให้แถบแบนชัดเจน ได้แก่ไพรเมอร์ 2220, 2222, 2224, 2229, 2232, 2240, 2251, 2272, 2277, 2398 และ 2415

4.4.2 ผลการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกตีนเทียน

จากการคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค iPBS ได้ไพรเมอร์ทั้งหมด 11 ไพรเมอร์ ทำการสุ่มตัวอย่างจำนวน 36 ตัวอย่าง ตามลักษณะสีขนบริเวณกระหม่อมและท้ายทอย และคละตัวอย่างจากฤดูทำรังวางไข่ และฤดูอพยพ ซึ่งแบ่งออกเป็น 6 ลักษณะ ดังรูปที่ 4.1 โดยลักษณะที่ 1 (รูปที่ 4.1ก) กระหม่อมและท้ายทอยสีขาว จำนวน 10 ตัวอย่าง ได้แก่ Hm83, Hm84, HHm54, HHm60, HH29, HH30, HH31, HH35, HHH03 และ HHH05 ลักษณะที่ 2 (รูปที่ 4.1ข) กระหม่อม และท้ายทอยสีขาว ปลายขนสีดำ จำนวน 8 ตัวอย่าง ได้แก่ Hm41, Hm58, HHm51, HHm58, HH33, HH34, HHH08 และ HHH13 ลักษณะที่ 3 (รูปที่ 4.1ค) กระหม่อมสีขาว และท้ายทอยสีดำอ่อน จำนวน 7 ตัวอย่าง ได้แก่ Hm68, HHm84, HHm89, HH24, HH27, HHH04 และ HHH12 ลักษณะที่ 4 (รูปที่ 4.1ง) กระหม่อมสีขาว และท้ายทอยสีดำเข้ม จำนวน 4 ตัวอย่าง ได้แก่ Hm45, HHm42, HH05 และ HH22 ลักษณะที่ 5 (รูปที่ 4.1จ) กระหม่อม และท้ายทอยสีเทา จำนวน 4 ตัวอย่าง ได้แก่ Hm15, Hm23, HHm74 และ HHm76 และลักษณะที่ 6 (รูปที่ 4.1ฉ) กระหม่อม และท้ายทอยสีเทา บริเวณขอบตาสีเทาเข้ม จำนวน 3 ตัวอย่าง ได้แก่ Hm70, Hm81 และ HHm16 แล้วนำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอให้เกิดแถบดีเอ็นเอชัดเจน จำนวน 5 ไพรเมอร์ คือ 2224, 2240, 2251, 2272 และ 2415 โดยจะยกตัวอย่างแถบแบนที่ชัดเจนและสามารถนับได้ของไพรเมอร์ 2415 ในรูปที่ 4.12 ทั้งนี้จากการเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์จำนวน 5 ไพรเมอร์ สามารถนับแถบดีเอ็นเอได้เพียง 35 ตัวอย่าง เนื่องจากตัวอย่าง Hm45 ไม่สามารถนับแถบดีเอ็นเอได้ โดยแถบดีเอ็นเอทั้งหมดมีขนาดระหว่าง 150-2,000 คู่เบส สร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอทั้งหมด 53 แถบ โดยเป็นชนิด polymorphic จำนวน 25 แถบ คิดเป็นค่า polymorphism เท่ากับ 47.17 เปอร์เซ็นต์ ดังตารางที่ 4.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.12 แสดงขนาดและแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ 2415 โดยตัวอย่างแบ่งตามลักษณะสีขนบริเวณกระหม่อม และท้ายทอยเป็น 6 ลักษณะ คือ กระหม่อม และท้ายทอยสีขาว (Hm83, Hm84, HHm54, HHm60, HH29, HH30, HH31, HH35, HHH03 และ HHH05) กระหม่อม และท้ายทอยสีขาว ปลายขนสีดำ (Hm41, Hm58, HHm51, HHm58, HH33, HH34, HHH08 และ HHH13) กระหม่อมสีขาว และท้ายทอยสีดำอ่อน (Hm68, HHm84, HHm89, HH24, HH27, HHH04 และ HHH12) กระหม่อมสีขาว และท้ายทอยสีดำเข้ม (Hm45, HHm42, HH05 และ HH22) กระหม่อม และท้ายทอยสีเทา (Hm15, Hm23, HHm74 และ HHm76) กระหม่อม และท้ายทอยสีเทา บริเวณขอบตาสีเทาเข้ม (Hm70, Hm81 และ HHm16) และตัวแทนของแต่ละฤดู โดยฤดูทำรังวางไข่ ปี 2557 และ 2558 คือ HH และ HHH ตามลำดับ และฤดูอพยพปี 2556 และ 2557 คือ Hm และ HHm ตามลำดับ

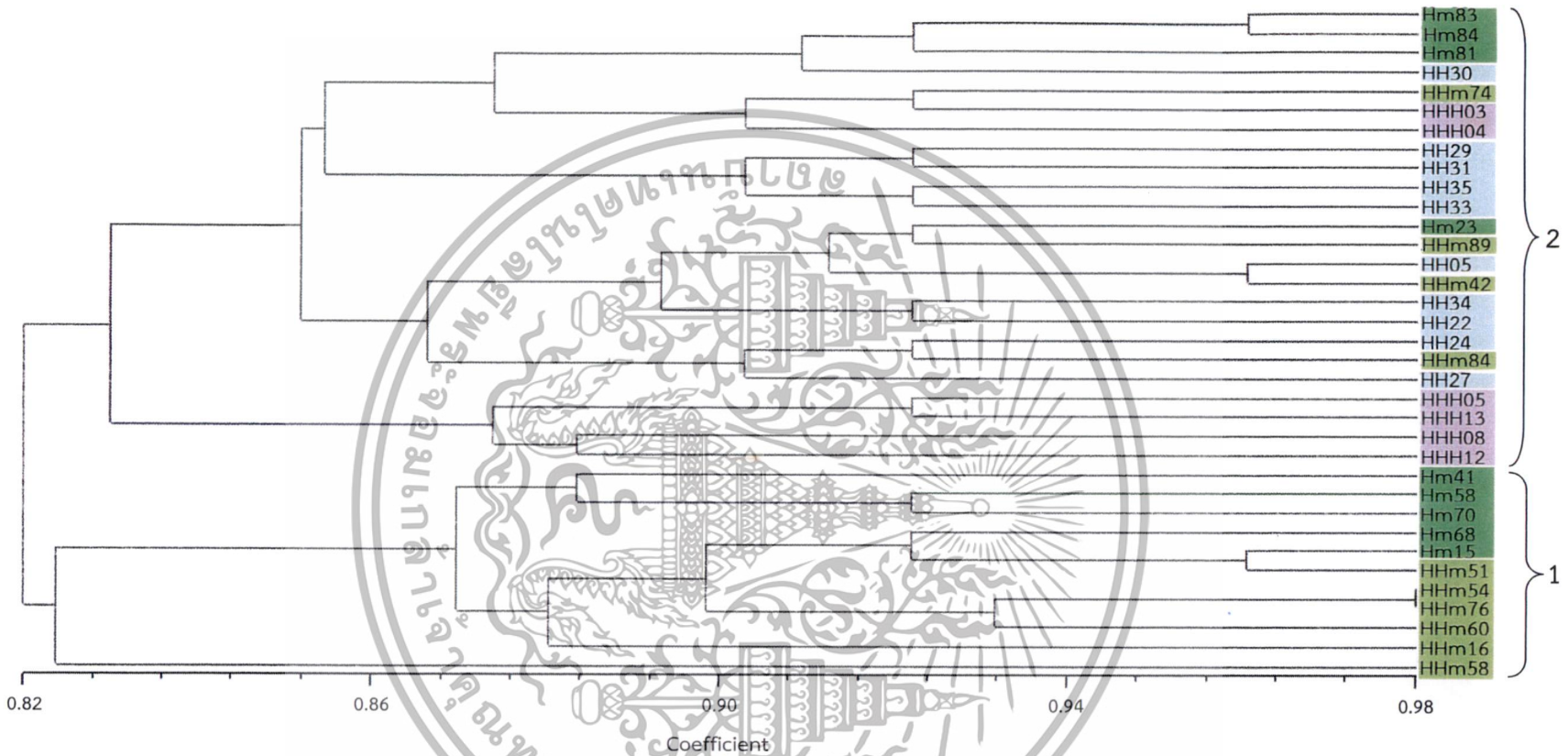
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในนกตีนเทียน ด้วยเทคนิค iPBS จากไพรเมอร์จำนวน 5 ไพรเมอร์

Primer	Optimal Annealing T_a (°C)	Amplified fragments	Monomorphic fragments	Polymorphic fragments	Polymorphism (%)
2224	55	8	6	2	25
2240	56	13	9	4	30.77
2251	54	12	5	7	58.33
2272	56	10	5	5	50
2415	61	10	3	7	70
รวม	-	53	28	25	47.17

เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ค่าความเหมือนทางพันธุกรรม (genetic similarity) ด้วยโปรแกรม NTSYSpc version 2.11X พบว่ามีค่าระหว่าง 0.72-0.96 โดยตัวอย่างที่มีค่า genetic similarity มากที่สุดคือ Hm83 และ Hm84 (แสดงในภาคผนวก ค) ผลการสร้าง dendrogram โดยวิธี UPGMA ดังรูปที่ 4.13 พบว่าที่ค่า coefficient เท่ากับ 0.82 แบ่งตัวอย่างนกตีนเทียนทั้ง 35 ตัวอย่างออกเป็น 2 กลุ่ม โดยไม่แสดงความสัมพันธ์ของการแบ่งกลุ่มตัวอย่างตามลักษณะและสีของขนบริเวณกระหม่อมและท้ายทอย โดยลักษณะและสีของขนบริเวณกระหม่อมและท้ายทอยทั้ง 6 ลักษณะ กระจายอยู่ทั้ง 2 กลุ่ม แต่สามารถแยกนกตีนเทียนในฤดูทำรังวางไข่ และฤดูอพยพออกจากกันได้ โดยในกลุ่มที่ 1 เป็นตัวอย่างนกตีนเทียนจากฤดูอพยพเพียงอย่างเดียว และยังสามารถแยกตัวอย่างนกในแต่ละปีออกจากกันได้ ทั้งนี้อาจเกิดจากปัจจัยทางนิเวศวิทยาของนกแต่ละกลุ่มในแต่ละปีที่แตกต่างกัน เช่น ช่วงเวลาในการอพยพ และอุณหภูมิ เป็นต้น ส่วนกลุ่มที่ 2 ส่วนใหญ่เป็นตัวอย่างนกตีนเทียนจากช่วงฤดูทำรังวางไข่ มีเพียงบางส่วนที่เป็นตัวอย่างที่เก็บในช่วงฤดูอพยพ ซึ่งมีแนวโน้มว่านกที่เก็บได้ในช่วงฤดูอพยพนั้น มีนกที่เป็นนกประจำถิ่นรวมอยู่ด้วย เนื่องจากการดักจับนกในฤดูทำรังวางไข่ ดักจับบริเวณรังของนก จึงมั่นใจได้ว่าเป็นนกประจำถิ่น แต่การดักจับนกในฤดูอพยพ ดักจับด้วยวิธีท่อส่งตาข่าย ซึ่งจะดักจับนกทีละมากๆ ประกอบกับพื้นที่ที่ดักจับนกเป็นพื้นที่เดียวกับช่วงฤดูทำรังวางไข่ จึงสันนิษฐานนกที่ดักจับในฤดูอพยพบางส่วนเป็นนกประจำถิ่น จากผลการทดลองข้างต้นทำให้ทราบว่ากลุ่มประชากรนกที่ดักจับในช่วงฤดูทำรังวางไข่ กับนกที่ดักจับในช่วงฤดูอพยพมีความแตกต่างกันทางพันธุกรรม นอกจากนี้นกในช่วงฤดูอพยพในแต่ละปีก็สามารถแยกกลุ่มประชากรออกจากกันได้ โดยนกในแต่ละฤดูอพยพอาจจะอพยพมาจากแหล่งอาศัยที่ต่างกัน เมื่อนำข้อมูลไปสร้างแผนการกระจายตัว (principle component analysis : PCA) ด้วยโปรแกรม SPSS Statistics 17.0 โดยเลือกโมเดลแบบ Euclidean distance ดังรูปที่ 4.14 พบว่าการกระจายตัวของนกตีนเทียน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

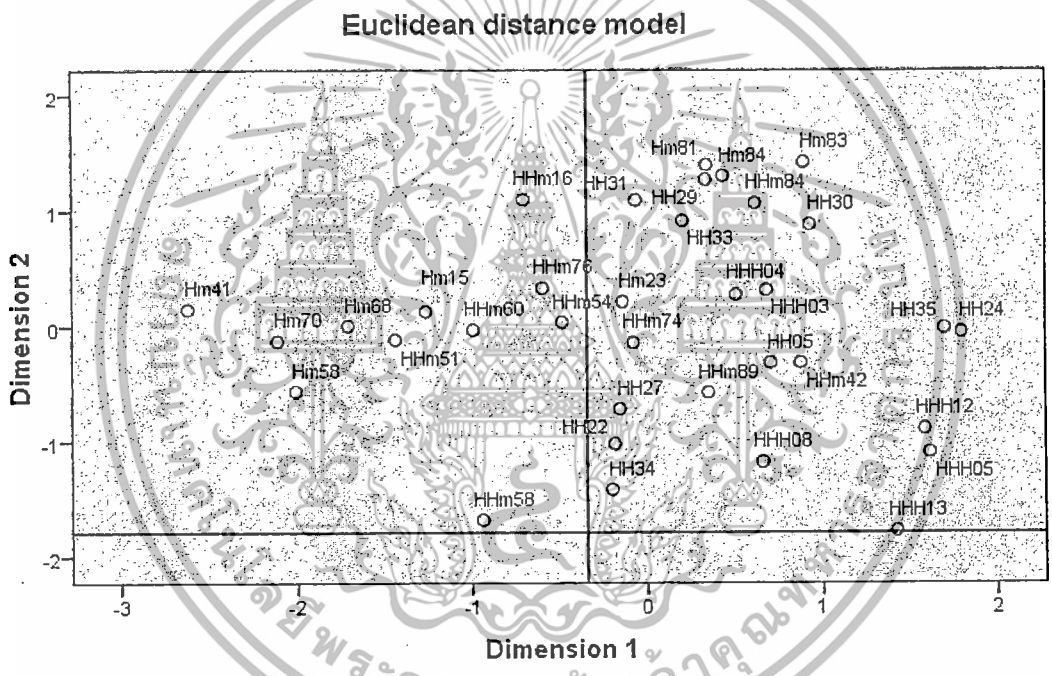


รูปที่ 4.13 Dendrogram แสดงความสัมพันธ์ของนกตีนเทียนแต่ละตัวอย่าง จากข้อมูลแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค iPBS ด้วยไพรเมอร์จำนวน 5 ไพรเมอร์

หมายเหตุ : สีเขียวเข้ม (Hm) = ฤดูอพยพ ปี 2556, สีฟ้า (HH) = ฤดูทำรังวางไข่ ปี 2557, สีเขียวอ่อน (HHm) = ฤดูอพยพ ปี 2557, สีม่วง (HHH) = ฤดูทำรังวางไข่ปี 2558

สอดคล้องกับแผนภาพ dendrogram ในรูปที่ 4.13 คือ ตัวอย่างที่ดักจับในฤดูอพยพกระจายตัวอยู่ด้วยกันทางฝั่งซ้าย และตัวอย่างที่ดักจับในฤดูทำรังวางไข่กระจายตัวอยู่ด้วยกันทางฝั่งขวา และมีแนวโน้มว่านกในฤดูทำรังวางไข่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมมากกว่า

จากงานวิจัยข้างต้นสอดคล้องกับงานวิจัยของ Raddova และคณะ (2012) ศึกษาพืชในสกุลมะพลับ (*Diospyros* ssp.) คือ *D. virginiana, D. kaki* และ *D.lotus* พบว่าเทคนิค iPBS สามารถจำแนกพืชในสกุลนี้ออกจากกันได้ รวมทั้งสามารถจำแนกลูกผสมระหว่าง *D. virginiana* และ *D. kaki* ได้ด้วย นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยของ Guo และคณะ (2014) ซึ่งใช้เทคนิค iPBS ในการศึกษาองุ่นจำนวน 35 สายพันธุ์ ในประเทศจีน ซึ่งสามารถจำแนกกลุ่มประชากรขององุ่นเศรษฐกิจ กับองุ่นป่าออกจากกันอย่างชัดเจน



รูปที่ 4.14 แสดงแผนภาพการกระจายตัวของนกตีนเทียนจำนวน 35 ตัวอย่าง ด้วยโปรแกรม SPSS Statistics 17.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากการระบุเพศนกตีนเทียน (*Himantopus himantopus*) ด้วยยีน *chromo-helicase DNA binding protein* (*CHD* gene) ซึ่งเป็นยีนบนโครโมโซมเพศของนก โดยเลือกใช้ไพรเมอร์ 2550F/2718R พบว่านกเพศเมียเกิด 2 แถบ ของอัลลีล *CHD-Z* และอัลลีล *CHD-W* ซึ่งมีขนาด 620 และ 461 คู่เบส ตามลำดับ ในขณะที่นกเพศผู้เกิด 1 แถบของอัลลีล *CHD-Z* จากตัวอย่างนกตีนเทียน จำนวน 277 ตัวอย่าง แบ่งเป็นเพศผู้ 144 ตัวอย่าง เพศเมีย 130 ตัวอย่าง และไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ 3 ตัวอย่าง การหาความสัมพันธ์ระหว่างสีขนบริเวณกระหม่อม และท้ายทอยของนกพบว่า นกที่มีลักษณะสีขนบริเวณกระหม่อม และท้ายทอยเป็นสีขาว มีทั้งนกเพศผู้และเพศเมีย เช่นเดียวกับนกที่มีกระหม่อม และท้ายทอยเป็นสีดำ ที่มีทั้งนกเพศผู้และเพศเมีย ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าสีขนบริเวณกระหม่อม และท้ายทอยของนกไม่สัมพันธ์กับเพศ จึงควรมีการศึกษายีนบริเวณอื่นที่มีความเกี่ยวข้องกับลักษณะการแสดงออกของสีต่อไป หรือนำผลการทดลองในการระบุเพศนกไปใช้เปรียบเทียบร่วมกับข้อมูลชีวสัณฐาน เพื่อระบุเพศของนกตีนเทียนต่อไป

จากการสังเกตสีขนบริเวณกระหม่อม และท้ายทอยของนก จึงแบ่งตัวอย่างนกออกเป็น 6 ลักษณะ สุ่มเลือกตัวอย่างในแต่ละลักษณะ ไปศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยยีน *CHD* และยีน *cytochrome c oxidase I* (*COI*) พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้ง 2 ยีน ไม่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างสีขนบริเวณกระหม่อมและท้ายทอยได้ แต่พบ single nucleotide polymorphism (SNP) จำนวน 2 ตำแหน่งบริเวณอัลลีล *CHD-Z* โดยเป็นแบบ transition จำนวน 1 ตำแหน่ง และแบบ transversion จำนวน 1 ตำแหน่ง ส่วนลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *COI* สามารถใช้ในการระบุสปีชีส์ของนกในสกุลตีนเทียนได้ โดยตัวอย่างนกตีนเทียนที่ใช้ในการศึกษา คือ *Himantopus himantopus* ทั้งหมด ส่วนการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค inter-primer binding site (iPBS) ทำการศึกษาทั้งหมด 36 ตัวอย่างที่เลือกจากสีขน 6 ลักษณะข้างต้น ทั้งในฤดูทำรังวางไข่ และฤดูอพยพ นำมาทดสอบกับไพรเมอร์จำนวน 40 ไพรเมอร์ พบไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอชัดเจน และสามารถนับได้จำนวน 5 ไพรเมอร์ คือ ไพรเมอร์ 2224 2240 2251 2272 และ 2415 เมื่อนำข้อมูลที่ได้ไปสร้าง dendrogram พบว่าแยกออกเป็น 2 กลุ่ม ซึ่งไม่สอดคล้องกับลักษณะสีขนบริเวณกระหม่อมและท้ายทอย แต่สอดคล้องกับฤดูกาลที่เก็บตัวอย่าง โดยสามารถแยกตัวอย่างที่ได้จากฤดูทำรังวางไข่ กับฤดูอพยพได้ ทั้งนี้ควรมีการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิคระดับโมเลกุลอื่นๆ ต่อไป เช่น AFLP และ next-generation sequencing (NGS) เป็นต้น รวมทั้งสามารถศึกษายีนบริเวณอื่นร่วมด้วย เช่น *cytochrome b oxidase* และ control region เป็นต้น เพื่อเป็นการยืนยันผลการทดลองว่ามีแนวโน้มเป็นไปในทางเดียวกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กนกวรรณ จารุกาจร และวรัญญา จตุพรประเสริฐ. 2550. “สนิป : ความรู้พื้นฐานสู่การประยุกต์ใช้.” *Thai Pharmaceutical and Health Science Journal*. 2 : 166-174.

ไกรรัตน์ เอี่ยมอำไพ. 2549. “การทำรังวางไข่ของนกน้ำในพื้นที่ชุ่มน้ำบึงบอระเพ็ด.” หน้า 91-110. **ใน ผลงานวิจัยและรายงานความก้าวหน้างานวิจัย ประจำปี 2548.** กรุงเทพฯ : กลุ่มงานวิจัยสัตว์ป่า สำนักอนุรักษ์สัตว์ป่า กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช.

จารุจินต์ นภีตะภัฏ กานต์ เลขะกุล และวัชระ สงวนสมบัติ. 2555. **คู่มือศึกษาธรรมชาติ หมอบุญส่ง เลขะกุล นกเมืองไทย.** พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: ด่านสุทธาการพิมพ์.

เจษฎา เด่นดวงบริพันธ์. 2555. **วิวัฒนาการ = Evolution.** พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ทิฐิ สอนสา ไกรรัตน์ เอี่ยมอำไพ และสมชาย นิ่มนวล. 2554ก. “เทคนิคการจับนกด้วยท่อส่งตาข่าย (Cannon Net) ในประเทศไทย.” หน้า 113-123. ใน **ผลงานวิจัยและรายงานความก้าวหน้างานวิจัย ประจำปี 2553.** กรุงเทพฯ. กลุ่มงานวิจัยสัตว์ป่า สำนักอนุรักษ์สัตว์ป่า กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช.

ทิฐิ สอนสา สมชาย นิ่มนวล ไกรรัตน์ เอี่ยมอำไพ ดวงรัตน์ โพธิ์เที่ยง กุลธิดา อิทธิพร และมงคล โมรา. 2554ข. “การจับนกชายเลนติดเครื่องหมายเพื่อศึกษาเส้นทางการอพยพ โดยการใช้เทคนิคท่อส่งตาข่าย (Cannon Netting) บริเวณพื้นที่ปากแม่น้ำท่าจีน จังหวัดสมุทรสาคร.” หน้า 125-135. ใน **ผลงานวิจัยและรายงานความก้าวหน้างานวิจัย ประจำปี 2553.** กรุงเทพฯ: กลุ่มงานวิจัยสัตว์ป่า สำนักอนุรักษ์สัตว์ป่า กรมอุทยานแห่งชาติสัตว์ป่า และพันธุ์พืช.

ณิชาภัทร ชอบอาภรณ์ สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม ไกรรัตน์ เอี่ยมอำไพ และสมชาย นิ่มนวล. 2013. “การระบุเพศนกในสกุลหัวโตเล็ก.” *Thai Journal of Genetics*. S(1) : 383-386.

ณิชาภัทร ชอบอาภรณ์. 2557. “ความหลากหลายทางพันธุกรรมและนกในสกุลหัวโตเล็ก.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ธนาธิป ธรรมการ. 2009. “การแยกเพศในนกสวยงาม.” *The Journal of Thai Veterinary Practitioners*. 21(4) : 62-70.

ปรางรัตน์ อิทธโยภาสกุล กุลธิดา อิทธิพร และไกรรัตน์ เอี่ยมอำไพ. 2557. “การใช้ประโยชน์พื้นที่ชุ่มน้ำบึงบอระเพ็ดในการสร้างรังวางไข่ของนก.” หน้า 19-45. ใน **ผลงานวิจัยและรายงานความก้าวหน้างานวิจัย ประจำปี 2555.** กรุงเทพฯ : กลุ่มงานวิจัยสัตว์ป่า สำนักอนุรักษ์สัตว์ป่า กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิเชียร คงทอง. 2537. "ผลกระทบของการเปลี่ยนแปลงระบบนิเวศวิทยาของนกในบึงบอระเพ็ด จังหวัดนครสวรรค์." วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สมชาติ ธนะ และ ดุจฤดี ปานพรหมมินทร์. 2014. "ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *CHD-W* และ *CHD-Z* เพื่อการระบุเพศนกปรอดหัวโขน." *Thai Journal of Genetics*. 7(2) : 104-109.

สุคนธ์ทิพย์ จันทนะ และ สายชล แซ่อื้อ. 2549. "การจำแนกเพศนกสวยงามด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์." ปัญหาพิเศษปริญญาตรี. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม ณิชาภัทร ชอบอาภรณ์ ตฤนเศรษฐ์ วีระพันธุ์ นาถสุดา พุทธารักษ์ และอนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม. 2012. "การระบุเพศในนกแก้วบางชนิด." *Thai Journal of Genetics*. 5(2) : 194-202.

อภิษฎา เรืองเกตุ ประทีป ด้วงแค และ ดอกรัก มารอด. 2557. "ชีววิทยาการสืบพันธุ์บางประการของนกตีนเทียน (*Himantopus himantopus*) บริเวณเขตห้ามล่าสัตว์ป่าบึงบอระเพ็ด จังหวัดนครสวรรค์." *วารสารสัตว์ป่าเมืองไทย*. 21(1) : 166-173.

โองการ วณิชาชีวะ และเฟื่องฟ้า สีสร้อย. 2557. "การสร้างรูปแบบดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องหมายเอสอาร์เอพี และไอพีบีเอสของไผ่รวกสยาม (*Thyrsostachys siamensis*)." *Thai Journal of Science and Technology*. 3(1) : 45-56.

โอภาส ขอบเขตต์. 2543. **นกในเมืองไทย**. เล่ม 3. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์สารคดีในนามบริษัทวิริยะธุรกิจ จำกัด.

Archawaranon, M. 2004. "Rapid sexing Hill Mynah *Gracula religiosa* by sex chromosome." *Biotechnology*. 3(2) : 160-164.

Bantock, T.M. Prys-Jones, R.P. and Lee, P.L. 2008. "New and improved molecular sexing methods for museum bird specimens." *Molecular Ecology Resources*. 8 : 519-528.

Bawej, M. Kokoszynski, D. and Bernacki, Z. 2012. "Evalution of genetic similarity between white and grey varieties of guinea fowl (*Numida meleagris*)." *Journal of Central European Agriculture*. 13(4) : 654-661.

Bloom, P.H. Clark, W.S. and Kidd, J.W. 2007. **Raptor Research and Management Techniques**. Washington : Hancock House Publishers.

Boersma, P.D. and Davies, E.M. 1987. "Sexing monomorphic birds by vent measurements." *The Auk*. 104 : 779-783.

Bone, J.F. 1988. **Animal anatomy and physiology**. 3rd ed. New Jersey : Prentice-Hall Inc.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Bush, K.L. Vinsky, M.D. Aldridge, C.L. and Paszkowski, C.A. 2005. "A comparison of sample types varying in invasiveness for use in DNA sex determination in an endangered population of greater Sage-grouse (*Centrocercus uropihasianus*)." *Conservation Genetics*. 6 : 867-870.

Cerit, H. and Avanus, R. 2007. "Sex identification in avian species using DNA typing methods." *World's Poultry Science Journal*. 63(1) : 91–99.

Chang, H.W. Chou, Y.C. Su, Y.F. Cheng, C.A. Cheng, C.A. Tsai, C.L. Lee, H.C. Wen, C.H. and Chang, C.C. 2010. "Molecular phylogeny of the *Pycnonotus sinensis* and *Pycnonotus taivanus* in Taiwan based on sequence variation of nuclear CHD and mitochondrial cytochrome b genes." *Biochemical Systematics and Ecology*. 38 : 195-201.

Dubiec, A. and Neubauer, M.Z. 2006. Molecular techniques for sex identification in birds. *Biology Letters*. 43(1): 3-12.

Fagerberg, S. 2006. "Nucleotide variation in three wild bird species collared flycatcher (*Ficedula albicollis*), blue tit (*Parus caerurelus*) and great reed warbler (*Acrocephalus arundinaceus*)." Degree project in biology, Department of Evolutionary Biology. UPPSALA university.

Fridolfsson, A.K. and Ellegren, H. 1999. "A simple and universal method for molecular sexing of non-ratite birds." *Journal of Avian Biology*. 20 : 116-121.

Gaillte, A. Ievinsh, G. and Rungis, D. 2011. "Genetic diversity analysis of Latvian and Estonian *Saussurea esthonica* populations." *Environmental and Experimental Biology*. 9 : 115-119.

Garcia, C.B. Insausti, J.A. Gil, J.A. Frutos, A.D. Alcantara, M. Gonzalez, J. Cortes M.R. Bonafonte, J.I. 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(3) : 309-312.

Gill, F.B. 2006. **Birds of the world (recommended English Names).** New Jersey : Princeton University Press.

Griffiths, R. and Tiwari, B. 1995. "Sex of the last wild Spix's macaw." *Nature*. 375 **:** 454.

Griffiths, R. Double, M.C. Orr, K. and Dawson, R.J. 1998. "A DNA test to sex most birds." *Molecular Ecology*. 7 : 1071-1075.

Griffiths, R. 2000. "Sex identification in birds. seminars in avian and exotic pet medicine." 9 : 14-26.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Guo, D.L. Guo, M.X. Hou, X.G. and Zhang, G.H. 2014. "Molecular diversity analysis of grape varieties based on iPBS markers." *Biochemical Systematics and Ecology*. 52 : 27-32.

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.

Hebert, P.D.N. Stoeckle, M.Y. Zemlak, T.S. and Francis, C.M. 2004. "Identification of Birds through DNA Barcodes." *Plos Biology*. 2(10) : e312.

Idaghdour, Y. Broderick, D. and Korrida, A. 2003. "Faeces as a source of DNA for molecular studies in a threatened population of great bustards in Morocco." *Conservation Genetics*. 4 : 789-792.

Irwin, D.E. Irwin, J.H. and Smith, T.B. 2011. "Genetic variation and seasonal migratory connectivity in Wilson's warblers (*Wilsonia pusilla*): species-level differences in nuclear DNA between western and eastern populations." *Molecular Ecology*. 20 : 3102-3115.

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.

Jirajaroenrat, K. and Thammakarn, C. 2007. "Sex identification of some pet birds by polymerase chain reaction-based methods." 376-379 in **the international conference on Integration of science and technology for sustainable development 26-27 April.** Thailand, KMITL.

Kahn, N. 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." *Auk*. 115 : 1074-1078.

Kalendar, R. Antonius, K. Smykal, P. and Schulman, A.H. 2010. "iPBS: a universal method for DNA fingerprinting and retrotransposon isolation." *Theoretical and Applied Genetics*. 121 : 1419-1430.

Kalendar, R. Flavall, A.J. Ellis, T.H.N. Sjakste, T. Moisy, C. and Schulman, A.H. 2011. "Analysis of plant diversity with retrotransposon-based molecular markers" *Heredity*. 106 : 520-530.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Knijff, P.D. Denkers, F. Swelm, N.D.V. and Kuiper, M. 2001. "Genetic affinities within the Herring Gull (*Larus* argentatus) assemblage revealed by AFLP genotyping." *Journal of Molecular Evolution*. 52 : 85-93.

Li, W. Xue, F. Li, L. Li, X. Yue, B. and Li, J. 2012. "A triple-primer PCR approach for the sex identification of endangered Phasianidae birds." *European Journal of Wildlife Research*. 58 : 289-294.

MacAvoy, E.S. and Chambers, G.K. 1999. "Molecular genetic analysis of hybridization." *Science and Conservation*. 105 : 5-29.

Miyaki, C.Y. Matioli, S.R. Burke, T. and Wajntal, A. 1998. "Parrot evolution and paleogeographical events: mitochondrial DNA evidence." *Molecular Biology and Evolution*. 15 : 544-551.

Mehmood, A. Jaskani, M.J. Ahmad, S. and Ahmad, R. 2013. "Evalution of genetic diversity in open pollinated guava by iPBS primers." *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*. 50(4) : 591-597.

Morinha, F. Carvalho, M. Ferro, A. Guedes-Pinto, H. Rodrigues, R. and Bastos, E. 2011. "Molecular sexing and analysis of *CHD1-Z* and *CHD1-W* sequence variations in wild common quail (*Coturnix C. coturnix*) and domesticated Japanese quail (*Coturnix c. Japonica*)." *Journal of Genetics*. 90 : e39–43.

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.

Morlan, J. Dakin, R.E. and Rosso, J. 2004. "Apparent hybrids between the American avocet and Black-necked stilt in California." *Western Birds*. 35 : 57-59.

Nei, M. and Li, W.H. 1979. "Mathematical model for studying genetical variation in terms of restriction endonucleases." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 76(10) : 5269-5273.

Ogawa, A. Solovei, I. Hutchison, N. Saitoh, Y. Ikeda, J.E. Macgregor, H. and Mizuno, S. 1997. "Molecular characterization and cytological mapping of a non-repetitive DNA sequence region from the W chromosome of chicken and its use as a universal probe for sexing Carinatae birds." *Chromosome Research*. 5 : 93–101.

Parasharya, D. Patel, B. and Parasharya, B.M. 2010. "Plumage variations in Black-winged Stilt *Himantopus himantopus*." *Indian birds*. 6(4&5) : 98-99.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Parker, J.S. Birkhead, T.R. Joshua S.K. Taylor, S. and Clark, M. 1991. "Sex ratio in a population of guillemots *Uria aalge* determined by chromosome analysis." *Ibis*. 133 : 423-425.

Paton, T.A. and Baker, A.J. 2006. "Sequencing from 14 mitochondrial genes provide a well-supported phylogeny of the Charadriiform birds congruent with the nuclear *RAG-1* tree." *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 39 : 657-667.

Pereira, S.L. and Baker, A.J. 2008. "DNA evidence for a Paleocene origin of the Alcidae (Aves: Charadriiformes) in the Pacific and multiple dispersals across northern oceans." *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 46 : 430-445.

Primmer, C.R. Borge, T. Lindell, J. and Satre, G.P. 2002. "Single nucleotide polymorphism characterization in species with limited available sequence information: high nucleotide diversity revealed in the avian genome." *Molecular ecology*. 11 : 603-612.

Questiau, S. Eybert, M.C. and Taberlet, P. 1999. "Amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers reveal extra-pair parentage in bird species: the bluethroat (*Luscinia svecica*)." *Molecular ecology*. 8 : 1331-1339.

Raddova, J. Ptackova, H. Cechova, J. and Ondrasek, I. 2012. "Genetic analysis of the genus *Diospyros* ssp. using RAPD and i-PBS methods." *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*. LX(8) : 205-216.

Rheindt, F.E. Szekely, T. Edwards, S.V. Lee, P.L.M. Burke, T. Kennerley, P.R. Bakewell, D.N. Alrashidi, M. Kosztolányi, 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.

Riaz, M. Khan, A.A. Babar, M. Akhter, N. Muhammad, S. and Khaliq, I. 2011. "High Genetic Diversity Revealed by RAPD Markers in the Black Francolin (*Francolinus francolinus*, Galliformes) of Pakistan." *Pakistan Journal of Zoology*. 43(5) : 889-896.

Robinson, J.A. Reed, M.J. Skorupa, J.P. and Oring, L.W. 1999. **Black-necked Stilt (*Himantopus mexicanus*).** [online] Available : http://bna.birds.cornell.edu/bna/species/449/biblio

Rogers, J. and Wall, R. 1980. "A mechanism for RNA splicing." *Proceedings of the national academy of sciences*. 77 : 1877-1879.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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.

Sobley, C.G. and Monroe, B.L. 1990. Distribution and taxonomy of birds of the world. New Haven : Yale University Press.

Sokal, R.R. and Michener, C.D. 1958. "A Statistical Method for Evaluating Systematic Relationships." *The University of Kansas Scientific Bulletin*. 38 : 1409-1438.

Steeves, T.E. Maloney, R.F. HALE, M.L. Tylianakis, J.M. and Gemmell, N.J. 2010. "Genetic analyses reveal hybridization but no hybrid swarm in one of the world's rarest birds." *Molecular Ecology*. 19 : 5090-5100.

Suh, A. Kriegs, J.O., Brosius, J. and Schmitz, J. 2011. "Retroposon insertions and the chronology of avian sex chromosome evolution." *Molecular Biology and Evolution*. 28(11) : 2993–2997.

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 : 1-3.

Wakisaka, H. Nakagawa, M. Wakisaka, K. and Itoh, M. 2006. "Molecular sexing and sexual difference in carpal spur length of the gray-headed lapwing *Vanellus cinereus* (Charadriidae)." *Ornithological science*. 5 : 133-137.

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(5) : 425-431.

Watson, H.K. Mogg, R.J. Bond, J.M. and Durell, S.E.A. le V. dit. 2004. "Sexing Eurasian Oystercatchers *Haematopus ostralegus* from breast feathers collected when ringing." *Wader Study Group Bull*. 105 : 87-89.

Xeira, A. 1987. "The head pattern of Black-winged Stilts." *Wader Study Group Bull*. 50 : 29.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

วิธีเตรียมสารเคมี

1. RNaseA ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

ชั่ง RNaseA 20 มิลลิกรัม ใส่ลงหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร ผสมกับ TE buffer ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้น vortex และ spin down จนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

2. EDTA ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

ชั่ง EDTA 93.06 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 300 มิลลิลิตร จนสารละลายใส ปรับพีเอชให้เท่ากับ 8 จากนั้นปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 500 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. TE buffer ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

ปิเปตสาร EDTA ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ (พีเอช 8.0) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร และ Tris–HCl ความเข้มข้น 1 โมลาร์ (พีเอช 8.0) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น sterile จนครบ 1,000 มิลลิลิตร

4. 10X TBE buffer ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

ชั่งสาร tris base 107.81 กรัม boric acid 61.83 กรัม และ EDTA 9.305 กรัม ผสมเข้าด้วยกัน ปรับพีเอชของสารละลายให้เท่ากับ 8 แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น sterile จนครบ 1,000 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

5. 1X TBE buffer ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

ตวง 10X TBE buffer ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่น 450 มิลลิลิตร

6. 3X loading dye ปริมาตร 200 ไมโครลิตร

ดูด 6X loading dye ปริมาตร 100 ไมโครลิตรลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำ deionized ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้น vortex และ spin down จนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

7. ethidium bromide staining ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

ชั่งสาร ethidium bromide ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับ 1X TBE buffer ปริมาตร 499.5 มิลลิลิตร

8. อะกาโรสเจล ความเข้มข้น 1, 1.5 และ 3 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 40 มิลลิลิตร

ชั่งเจลอะกาโรส 0.4, 0.6 และ 1.2 กรัม ตามลำดับ ลงในขวดรูปชมพู่ เติม 1X TBE buffer 40 มิลลิลิตร นำไปให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟ เพื่อสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เทใส่ถาดที่มีหวี ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้เจลแข็งตัว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

ข้อมูลตัวอย่างนกตีนเทียน

ตารางภาคผนวกที่ ข-1 ตัวอย่างในฤดูทำรังวางไข่ 2556

ลำดับหลอด	ลักษณะสีขน*	เพศ*	ลำดับหลอด	ลักษณะสีขน*	เพศ*
H1	ก	M	H17	ก	M
H2	ก	F	H19	ก	M
H3	ก	M	H20	ก	M
H4	ก	M	H21	ก	M
H5	ก	F	H22	ก	F
H6	ก	M	H23	ก	F
H7	ก	M	H24	ก	M
H8	ก	F	H25	ก	F
H9	ก	M	H26	ก	F
H10	ก	F	H29	ก	M
H11	ก	F	H30	ข	M
H12	ก	M	H34	ก	F
H13	ค	M	H42	ก	F
H14	ก	F	H45	ก	F
H15	ก	M	H53	ก	F
H16	ก	F	H54	ก	F

ตารางภาคผนวกที่ ข-2 ตัวอย่างในฤดูทำรังวางไข่ 2557

ลำดับหลอด	ลักษณะสีขน*	เพศ*	ลำดับหลอด	ลักษณะสีขน*	เพศ*
HH01	ก	F	HH08	ก	M
HH02	ก	M	HH09	ก	F
HH03	ก	M	HH10	ก	F
HH04	ก	F	HH11	ก	M
HH05	ง	M	HH12	ก	F
HH06	ค	F	HH13	ก	F
HH07	ก	M	HH14	ก	M

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

ตารางภาคผนวกที่ ข-2 (ต่อ) ตัวอย่างในฤดูทำรังวางไข่ 2557

ลำดับหลอด	ลักษณะสีขน*	เพศ*	ลำดับหลอด	ลักษณะสีขน*	เพศ*
HH15	ก	M	HH26	ก	M
HH16	ก	F	HH27	ค	M
HH17	ก	F	HH28	ก	F
HH18	ก	M	HH29	ก	F
HH19	ก	M	HH30	ก	F
HH20	ก	M	HH31	ก	M
HH21	ก	F	HH32	ก	M
HH22	ง	M	HH33	ข	M
HH23	ก	F	HH34	ข	M
HH24	ค	F	HH35	ก	M
HH25	ก	M			

ตารางภาคผนวกที่ ข-3 ตัวอย่างในฤดูทำรังวางไข่ 2558

ลำดับหลอด	ลักษณะสีขน*	เพศ*	ลำดับหลอด	ลักษณะสีขน*	เพศ*
HHH1	ก	F	HHH8	ข	M
HHH2	ก	F	HHH9	ก	M
HHH3	ก	M	HHH10	ก	M
HHH4	ค	F	HHH11	ก	F
HHH5	ก	M	HHH12	ค	F
HHH6	ก	M	HHH13	ข	M
HHH7	ก	F			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

ตารางภาคผนวกที่ ข-4 ตัวอย่างในฤดูอพยพ 2556

ลำดับหลอด	ลักษณะสีขน*	เพศ*	ลำดับหลอด	ลักษณะสีขน*	เพศ*
Hm01	จ	F	Hm29	ฉ	M
Hm02	จ	F	Hm30	ค	none
Hm03	จ	M	Hm31	ก	M
Hm04	จ	M	Hm32	ก	none
Hm05	จ	M	Hm33	ข	M
Hm06	จ	M	Hm34	จ	F
Hm07	จ	F	Hm35	จ	F
Hm08	จ	F	Hm36	ฉ	M
Hm09	จ	M	Hm37	ไม่มีรูปภาพ	M
Hm10	จ	M	Hm38	ฉ	M
Hm11	ก	M	Hm39	ข	M
Hm12	จ	M	Hm40	จ	M
Hm13	จ	F	Hm41	ข	M
Hm14	จ	F	Hm42	ก	F
Hm15	จ	F	Hm43	จ	M
Hm16	ค	M	Hm44	ค	F
Hm17	จ	F	Hm45	ง	M
Hm18	ก	F	Hm46	จ	F
Hm19	ก	M	Hm47	ก	M
Hm20	ก	F	Hm48	จ	M
Hm21	ก	F	Hm49	ก	F
Hm22	ก	F	Hm50	ก	M
Hm23	จ	M	Hm51	ก	M
Hm24	จ	F	Hm52	จ	M
Hm25	ก	F	Hm53	จ	M
Hm26	จ	F	Hm54	ก	F
Hm27	ก	M	Hm55	ง	F
Hm28	จ	F	Hm56	จ	M

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

ตารางภาคผนวกที่ ข-4 (ต่อ) ตัวอย่างในฤดูอพยพ 2556

ลำดับหลอด	ลักษณะสีขน*	เพศ*	ลำดับหลอด	ลักษณะสีขน*	เพศ*
Hm57	จ	F	Hm76	จ	F
Hm58	ข	M	Hm77	จ	M
Hm59	จ	M	Hm78	ก	F
Hm60	ข	F	Hm79	จ	M
Hm61	จ	M	Hm80	จ	M
Hm62	ก	M	Hm81	ฉ	M
Hm63	ก	F	Hm82	ก	M
Hm64	ข	F	Hm83	ก	F
Hm65	ข	F	Hm84	ก	F
Hm66	จ	M	Hm85	ก	M
Hm67	ก	M	Hm86	ก	M
Hm68	ค	F	Hm87	ก	F
Hm69	ค	F	Hm88	จ	M
Hm70	ฉ	M	Hm89	ข	M
Hm71	จ	M	Hm90	จ	M
Hm72	ค	F	Hm91	ก	F
Hm73	จ	F	Hm92	ก	M
Hm74	จ	F	Hm93	จ	M
Hm75	ง	M	Hm94	จ	M

ตารางภาคผนวกที่ ข-5 ตัวอย่างในฤดูอพยพ 2557

ลำดับหลอด	ลักษณะสีขน*	เพศ*	ลำดับหลอด	ลักษณะสีขน*	เพศ*
HHm01	ฉ	M	HHm08	จ	F
HHm02	จ	F	HHm09	ก	F
HHm03	จ	F	HHm10	จ	F
HHm04	จ	M	HHm11	ข	M
HHm05	จ	M	HHm12	จ	F
HHm06	จ	F	HHm13	จ	F
HHm07	ข	F	HHm14	จ	M

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

ตารางภาคผนวกที่ ข-5 (ต่อ) ตัวอย่างในฤดูอพยพ 2557

ลำดับหลอด	ลักษณะสีขน*	เพศ*	ลำดับหลอด	ลักษณะสีขน*	เพศ*
HHm15	จ	F	HHm43	ก	F
HHm16	ฉ	M	HHm44	ข	F
HHm17	จ	F	HHm45	ก	F
HHm18	ก	F	HHm46	จ	M
HHm19	จ	F	HHm47	ก	F
HHm20	ข	F	HHm48	ฉ	M
HHm21	จ	F	HHm49	จ	F
HHm22	ก	M	HHm50	ก	M
HHm23	จ	F	HHm51	ข	M
HHm24	จ	M	HHm52	ฉ	M
HHm25	จ	F	HHm53	ก	M
HHm26	จ	F	HHm54	ก	M
HHm27	จ	M	HHm55	จ	F
HHm28	ไม่มีรูปภาพ	M	HHm56	ข	F
HHm29	จ	M	HHm57	จ	F
HHm30	จ	F	HHm58	ข	M
HHm31	จ	M	HHm59	จ	F
HHm32	ฉ	M	HHm60	ก	M
HHm33	จ	M	HHm61	ฉ	M
HHm34	จ	M	HHm62	จ	F
HHm35	จ	M	HHm63	ฉ	M
HHm36	ข	F	HHm64	จ	none
HHm37	ฉ	M	HHm65	จ	F
HHm38	จ	F	HHm66	จ	F
HHm39	จ	M	HHm67	ค	F
HHm40	ฉ	M	HHm68	จ	F
HHm41	ก	M	HHm69	จ	F
HHm42	ง	M	HHm70	จ	M

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

ตารางภาคผนวกที่ ข-5 (ต่อ) ตัวอย่างในฤดูอพยพ 2557

ลำดับหลอด	ลักษณะสีขน*	เพศ*	ลำดับหลอด	ลักษณะสีขน*	เพศ*
HHm71	จ	F	HHm88	จ	F
HHm72	ข	M	HHm89	ค	M
HHm73	จ	F	HHm90	ฉ	M
HHm74	จ	F	HHm91	จ	F
HHm75	ก	F	HHm92	จ	M
HHm76	จ	F	HHm93	จ	F
HHm77	ฉ	M	HHm94	จ	F
HHm78	ฉ	M	HHm95	จ	M
HHm79	ฉ	M	HHm96	จ	F
HHm80	ฉ	M	HHm97	จ	F
HHm81	ฉ	M	HHm98	จ	F
HHm82	ฉ	M	HHm99	จ	M
HHm83	จ	F	HHm100	จ	M
HHm84	ค	F	HHm101	จ	F
HHm85	ฉ	M	HHm102	จ	M
HHm86	ค	M	HHm103	จ	F
HHm87	จ	F			

*หมายเหตุ : ก : กระหม่อมและท้ายทอยสีขาว

ข : กระหม่อม และท้ายทอยสีขาว ปลายขนสีดำ

ค : กระหม่อมสีขาว และท้ายทอยสีดำอ่อน

ง : กระหม่อมสีขาว และท้ายทอยสีดำเข้ม

จ : กระหม่อม และท้ายทอยสีเทา

ฉ : กระหม่อม และท้ายทอยสีเทา บริเวณขอบตาสีเทาเข้ม

M : นกเพศผู้

F : นกเพศเมีย

none : ไม่สามารถระบุเพศได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

ตารางภาคผนวกที่ ค-1 แสดงค่า genetic similarity แบบ simple matching ด้วยโปรแกรม NTsyspc version 2.11X ของนกตีนเทียนจำนวน 35 ตัวอย่าง ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค iPBS จากไพรเมอร์จำนวน 5 ไพรเมอร์

	Hm83	Hm84	Hm41	Hm58	Hm68	Hm70	Hm81	Hm15	Hm23	HH29	HH30	HH31	HH35	HH33	HH34	HH24	HH27	HH05	HH22	HHm54	HHm60	HHm51	HHm58	HHm89	HHm42	HHm16	HHm84	HHm74	HHm76	HHH03	HHH05	HHH08	HHH13	HHH04	HHH12
Hm83	1.00																																	
Hm84	0.96	1.00																																
Hm41	0.75	0.79	1.00																															
Hm58	0.75	0.79	0.89	1.00																														
Hm68	0.81	0.85	0.91	0.87	1.00																													
Hm70	0.79	0.79	0.89	0.92	0.91	1.00																												
Hm81	0.94	0.91	0.77	0.77	0.79	0.81	1.00																											
Hm15	0.83	0.83	0.89	0.89	0.91	0.89	0.85	1.00																										
Hm23	0.91	0.91	0.77	0.81	0.87	0.85	0.85	0.89	1.00																									
HH29	0.91	0.91	0.77	0.77	0.83	0.77	0.85	0.85	0.89	1.00																								
HH30	0.91	0.94	0.74	0.77	0.83	0.77	0.89	0.77	0.89	0.85	1.00																							
HH31	0.83	0.83	0.77	0.81	0.79	0.81	0.89	0.89	0.85	0.92	0.81	1.00																						
HH35	0.83	0.83	0.74	0.74	0.79	0.70	0.85	0.81	0.81	0.89	0.85	0.89	1.00																					
HH33	0.83	0.83	0.77	0.81	0.83	0.77	0.85	0.85	0.85	0.92	0.85	0.92	0.92	1.00																				
HH34	0.79	0.79	0.77	0.81	0.87	0.81	0.77	0.89	0.89	0.81	0.81	0.81	0.85	0.85	1.00																			
HH24	0.83	0.83	0.70	0.74	0.75	0.74	0.85	0.77	0.85	0.85	0.89	0.85	0.89	0.85	0.81	1.00																		
HH27	0.79	0.83	0.77	0.81	0.83	0.85	0.85	0.85	0.85	0.85	0.85	0.92	0.85	0.85	0.85	0.89	1.00																	
HH05	0.87	0.87	0.74	0.77	0.83	0.81	0.89	0.85	0.92	0.85	0.89	0.89	0.89	0.85	0.89	0.89	0.92	1.00																
HH22	0.79	0.83	0.77	0.85	0.87	0.85	0.77	0.85	0.89	0.85	0.85	0.85	0.85	0.89	0.92	0.85	0.92	0.89	1.00															
HHm54	0.87	0.91	0.81	0.85	0.91	0.89	0.85	0.89	0.92	0.89	0.89	0.89	0.81	0.85	0.89	0.81	0.92	0.92	0.92	1.00														
HHm60	0.85	0.89	0.87	0.87	0.92	0.91	0.83	0.87	0.91	0.87	0.87	0.83	0.79	0.87	0.87	0.79	0.87	0.87	0.91	0.94	1.00													
HHm51	0.79	0.83	0.89	0.89	0.94	0.92	0.81	0.96	0.89	0.81	0.81	0.85	0.77	0.81	0.89	0.77	0.89	0.85	0.89	0.92	0.91	1.00												
HHm58	0.74	0.74	0.83	0.83	0.81	0.83	0.79	0.87	0.83	0.75	0.79	0.83	0.79	0.83	0.87	0.83	0.87	0.87	0.87	0.83	0.81	0.87	1.00											
HHm89	0.87	0.87	0.77	0.81	0.87	0.81	0.85	0.85	0.92	0.85	0.89	0.81	0.89	0.89	0.92	0.89	0.85	0.92	0.92	0.89	0.91	0.85	0.87	1.00										
HHm42	0.87	0.87	0.74	0.81	0.79	0.77	0.89	0.85	0.89	0.85	0.89	0.89	0.92	0.89	0.89	0.89	0.89	0.96	0.89	0.89	0.83	0.81	0.87	0.92	1.00									
HHm16	0.87	0.91	0.85	0.85	0.87	0.85	0.89	0.89	0.85	0.85	0.85	0.85	0.81	0.81	0.77	0.81	0.85	0.85	0.81	0.89	0.87	0.89	0.79	0.85	0.85	1.00								
HHm84	0.83	0.87	0.74	0.77	0.79	0.81	0.85	0.81	0.89	0.81	0.89	0.85	0.81	0.77	0.81	0.92	0.92	0.92	0.85	0.89	0.83	0.85	0.83	0.85	0.89	0.85	1.00							
HHm74	0.87	0.87	0.81	0.85	0.87	0.85	0.89	0.89	0.89	0.89	0.89	0.89	0.85	0.89	0.89	0.89	0.89	0.89	0.89	0.92	0.91	0.89	0.87	0.92	0.89	0.89	0.85	1.00						
HHm76	0.89	0.92	0.83	0.87	0.89	0.87	0.87	0.91	0.91	0.91	0.87	0.91	0.83	0.87	0.87	0.79	0.91	0.91	0.98	0.92	0.91	0.81	0.87	0.91	0.91	0.87	0.91	1.00						
HHH03	0.87	0.87	0.81	0.81	0.79	0.77	0.89	0.85	0.85	0.89	0.85	0.89	0.89	0.89	0.81	0.89	0.85	0.85	0.85	0.85	0.83	0.81	0.83	0.89	0.89	0.89	0.81	0.92	0.87	1.00				
HHH05	0.81	0.81	0.72	0.75	0.77	0.75	0.79	0.75	0.83	0.83	0.83	0.79	0.87	0.83	0.83	0.87	0.83	0.87	0.87	0.83	0.85	0.75	0.77	0.91	0.87	0.79	0.79	0.87	0.81	0.87	1.00			
HHH08	0.83	0.83	0.77	0.81	0.79	0.77	0.81	0.85	0.85	0.81	0.81	0.81	0.89	0.81	0.89	0.81	0.81	0.89	0.85	0.85	0.83	0.81	0.79	0.89	0.92	0.81	0.81	0.85	0.87	0.85	0.87	1.00		
HHH13	0.77	0.77	0.68	0.79	0.74	0.75	0.75	0.75	0.83	0.79	0.79	0.79	0.83	0.79	0.83	0.83	0.83	0.87	0.87	0.83	0.81	0.75	0.77	0.87	0.87	0.75	0.79	0.83	0.81	0.83	0.92	0.91	1.00	
HHH04	0.89	0.89	0.79	0.83	0.81	0.79	0.91	0.91	0.87	0.83	0.87	0.87	0.87	0.83	0.87	0.83	0.83	0.87	0.83	0.87	0.81	0.87	0.81	0.87	0.91	0.87	0.83	0.91	0.89	0.91	0.81	0.91	0.81	1.00
HHH12	0.83	0.83	0.74	0.74	0.79	0.74	0.85	0.81	0.81	0.77	0.85	0.77	0.85	0.77	0.85	0.85	0.81	0.85	0.81	0.81	0.79	0.81	0.79	0.89	0.85	0.81	0.81	0.89	0.79	0.85	0.87	0.89	0.87	0.91

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางสาววิภารัตน์ ศิริพงษ์
วัน เดือน ปีเกิด	8 สิงหาคม พ.ศ. 2533
ที่อยู่ปัจจุบัน	16/3 หมู่ 4 ตำบลหนองนาก อำเภอหนองแค จังหวัดสระบุรี 18230
ประวัติการศึกษา	(2555) วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ เกรดเฉลี่ย 2.67 สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร (2558) วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ เกรดเฉลี่ย 3.53 สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร
ผลงานทางวิชาการ	1. เรื่อง ความหลากหลายทางพันธุกรรมและการระบุเพศในระดับโมเลกุลของนกตีนเทียนในประเทศไทย (Genetic diversity and molecular sexing of *Himantopus himantopus* in Thailand) การสัมมนาวิชาการเรื่องสัตว์ป่าเมืองไทย ครั้งที่ 34 "การอนุรักษ์สัตว์ป่ายุคพัฒนาเข้าสู่ประชาคมอาเซียน" ระหว่างวันที่ 19-20 ธันวาคม พ.ศ. 2556 ตึกวนศาสตร์ 72 ปี คณะวนศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 2. เรื่อง Single nucleotide polymorphisms ในยีน *CHD* และ *ATPase6/8* ของนกตีนเทียน (Single nucleotide polymorphisms in *CHD* and *ATPase6/8* genes of Black-winged Stilt) การสัมมนาวิชาการเรื่องสัตว์ป่าเมืองไทย ครั้งที่ 35 "เหลียวหลัง แลหน้า สัตว์ป่าสงวน สัตว์ป่าคุ้มครอง" ระหว่างวันที่ 18-19 ธันวาคม พ.ศ. 2557 ตึกวนศาสตร์ 72 ปี คณะวนศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 3. เรื่อง ความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกตีนเทียน (*Himantopus himantopus*) โดยเทคนิคไอพีบีเอส (iPBS) (Genetic Variation of Black-winged Stilt (*Himantopus himantopus*) using iPBS technique) การประชุมวิชาการพันธุศาสตร์แห่งชาติ ครั้งที่ 19 "พันธุศาสตร์และจีโนมิกส์: จากการศึกษาระดับโมเลกุลสู่การประยุกต์" ระหว่างวันที่ 15-17 กรกฎาคม พ.ศ. 2558 โรงแรมเซนทารา แอนด์ คอนเวนชั่นเซนเตอร์ ขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้