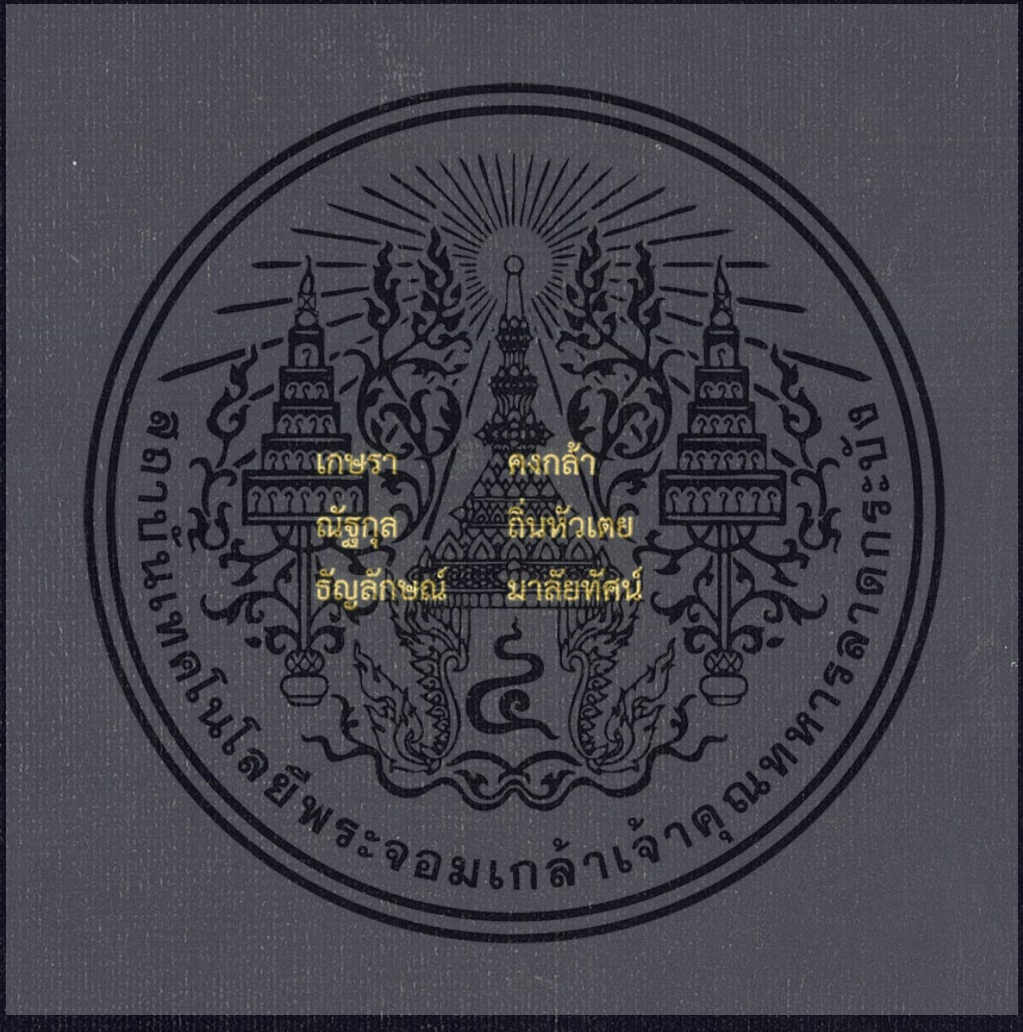
การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค iPBS และการระบุเพศของนกปรอดหัวโขน *(Pycnonotus jocosus)*

GENETIC DIVERSITY WITH iPBS TECHNIQUE AND SEXING OF *Pycnonotus jocosus*



เกษรา คงกล้า
ณัฐกุล ถิ่นหัวเตย
ธัญลักษณ์ มาลัยทัศน์

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2557

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค iPBS และการระบุเพศของนกปรอดหัวโขน (*Pycnonotus jocosus*)

GENETIC DIVERSITY WITH iPBS TECHNIQUE AND SEXING OF *Pycnonotus jocosus*

T142274

เกษรา คงกล้า
ณัฐกุล ถิ่นหัวเตย
ธัญลักษณ์ มาลัยทัศน์

เลขหมู่ 142274
เลขทะเบียน
วัน,เดือน,ปี 29 เม.ย. 2558
b 12772793
i

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2557

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

GENETIC DIVERSITY WITH iPBS TECHNIQUE AND SEXING OF *Pycnonotus jocosus*

KATESARA KONGKLA
NATTAKUL THINHUATOEY
THANYALAK MALAITAD

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIRMENT FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE
IN BIOTECHNOLOGY
DEPARTMENT OF BIOLOGY
FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2014

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค iPBS และการระบุเพศของนกปรอดหัวโขน (*Pycnonotus jocosus*) Genetic Diversity with iPBS Technique and Sexing of *Pycnonotus jocosus*
ชื่อนักศึกษา	นางสาวเกษรา คงกล้า รหัสนักศึกษา 54050355
	นางสาวณัฐกุล ถิ่นหัวเตย รหัสนักศึกษา 54050371
	นางสาวธัญลักษณ์ มาลัยทัศน์ รหัสนักศึกษา 54050388
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา	ชีววิทยา
ปีการศึกษา	2557
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ปีการศึกษา 2557

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม ประธานกรรมการ	
คุณไกรรัตน์ เอี่ยมอำไพ กรรมการ	
ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค iPBS และการระบุเพศของนกปรอดหัวโขน (*Pycnonotus jocosus*)
ชื่อนักศึกษา	นางสาวเกษรา คงกล้า รหัสนักศึกษา 54050355
	นางสาวณัฐกุล ถิ่นหัวเตย รหัสนักศึกษา 54050371
	นางสาวธัญลักษณ์ มาลัยทัศน์ รหัสนักศึกษา 54050388
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา	ชีววิทยา
ปีการศึกษา	2557
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม

บทคัดย่อ

นกปรอดหัวโขน (Red-whiskered bulbul; *Pycnonotus jocosus*) จัดอยู่ในกลุ่ม sexually monomorphic ซึ่งมีลักษณะภายนอกของเพศผู้และเพศเมียเหมือนกัน ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อระบุเพศนก และศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิคระดับโมเลกุล โดยเก็บตัวอย่างเลือดนกจำนวน 77 ตัวอย่าง จากสถานีเพาะเลี้ยงสัตว์ป่าพัทลุง จังหวัดพัทลุง และสถานีเพาะเลี้ยงสัตว์ป่าพังงา จังหวัดพังงา ในสภาพที่นกอยู่ในกรง และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในตำแหน่งยีน *Chromo-helicase-DNA-binding* (*CHD*) ด้วยไพรเมอร์ P2/P8 สามารถระบุเพศได้โดยเป็นเพศผู้จำนวน 21 ตัว เพศเมียจำนวน 53 ตัว และไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ จำนวน 3 ตัว ส่วนการประยุกต์ใช้เทคนิค inter Primer Binding Sites (iPBS) ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและความสัมพันธ์ของนกปรอดหัวโขน นกปรอดคอลาย (*Pycnonotus finlaysoni*) และนกปรอดโอ่งท้องสีน้ำตาล (*Alophoixus ochraceus*) จากการคัดเลือกไพรเมอร์จำนวน 32 ไพรเมอร์ ที่จัดจำแนกเป็น 4 กลุ่ม ตามค่า optimal annealing temperature (T_a) พบว่ามี 5 ไพรเมอร์ (2077, 2272, 2224, 2232 และ 2374) ที่ให้แถบดีเอ็นเอชัดเจน เมื่อนำทั้ง 5 ไพรเมอร์ มาวิเคราะห์กับตัวอย่างจำนวน 15 ตัวอย่าง พบจำนวนแถบดีเอ็นเอเฉลี่ย 18.60 แถบต่อไพรเมอร์ เมื่อสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ด้วยโปรแกรม NTSYSpc 2.1X วิธี UPGMA สามารถแบ่งกลุ่มออกเป็น 2 กลุ่มอย่างชัดเจนตามสกุล และแสดงค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนหรือความใกล้ชิดกัน (coefficient) อยู่ระหว่าง 0.48-1.00

คำสำคัญ : การระบุเพศ ความหลากหลายทางพันธุกรรม นกปรอดหัวโขน เทคนิค iPBS

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Genetic diversity with iPBS technique and sexing of *Pycnonotus jocosus*		
Students	Miss Katesara	Kongkla	Student ID 54050355
	Miss Nattakul	Thinhuatoey	Student ID 54050371
	Miss Thanyalak	Malaitad	Student ID 54050388
Degree	Bachelor of Science (Biotechnology)		
Department	Biology		
Academic Year	2014		
Advisor	Asst. Prof. Dr. Supattra Poeaim		

Abstract

Red-whiskered bulbul (*Pycnonotus jocosus*) is sexually monomorphic birds–meaning that the male looks practically identical to the female. In this work, the molecular technique was used to determine the gender and genetic diversity. The seventy-seven blood samples were taken from Phatthalung Wildlife Breeding Center, Phatthalung Province and Phangnga Wildlife Breeding Center, Phangnga Province. The *chromo-helicase-DNA-binding* (*CHD*) genes was amplified with P2/P8 primer. The sample consisted of 21 males, 53 females and three samples can not amplify. We were used the iPBS (inter Primer Binding Site) technique to assess genetic diversity and relationships in *P. jocosus*, *Pycnonotus finlaysoni* and *Alophoixus ochraceus*. The 32 primers which divided to four groups by optimal annealing temperature (T_a) were used for screening. Amplification was successful with 5 primers (2077, 2272, 2224, 2232 and 2374) that showed clearly of DNA band. These five primers were used for analysis of the fifty samples that generated bands with an average of 18.60 bands per primer. A dendrogram was generated using NTSYSpc software with UPGMA. The dendrogram revealed two main clusters, clearly separating the *Pycnonotus* and *Alophoixus* genus and similarity coefficients ranged from 0.48 to 1.00.

Keywords: Sexing, Genetic diversity, *Pycnonotus jocosus*, iPBS technique

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษเล่มนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี เนื่องจากผู้จัดทำได้รับความช่วยเหลือจากบุคคลผู้มีพระคุณหลายท่านดังนี้

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษที่ให้คำแนะนำให้คำปรึกษาอย่างใกล้ชิดและเสนอแนวทางการแก้ปัญหา รวมทั้งตรวจโครงงานพิเศษเล่มนี้ให้มีความสมบูรณ์มากขึ้น

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม ประธานกรรมการ ที่ให้คำแนะนำแก้ไขโครงงานพิเศษเล่มนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบคุณคุณไกรรัตน์ เอี่ยมอำไพ หัวหน้าสถานีวิจัยสัตว์ป่าบึงบอระเพ็ด จังหวัดนครสวรรค์ รวมทั้งสถานีเพาะเลี้ยงสัตว์ป่าจังหวัดพัทลุง และสถานีเพาะเลี้ยงสัตว์ป่า จังหวัดพังงา ที่อนุญาตให้เก็บตัวอย่างรวมถึงเจ้าหน้าที่ทีมงานทุกท่านที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเก็บตัวอย่าง และให้ความรู้เกี่ยวกับลักษณะทางด้านสัณฐานวิทยาของนกปรอด

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการที่อำนวยความสะดวกในด้านอุปกรณ์ เครื่องมือวิทยาศาสตร์ ขอบคุณเพื่อนๆ พี่และน้องทุกคนที่ให้กำลังใจและคอยให้ความช่วยเหลือตลอดระยะเวลาในการทำโครงงานพิเศษ สุดท้ายนี้ผู้จัดทำขอขอบพระคุณ บิดา มารดา และบุคคลในครอบครัวที่สนับสนุนและให้กำลังใจในการทำโครงงานพิเศษครั้งนี้ จนสามารถสำเร็จได้อย่างที่คาดหวัง หากโครงงานพิเศษเล่มนี้มีความผิดพลาดประการใดผู้จัดทำขออภัย ณ ที่นี้ด้วย

นางสาวเกษรา คงกล้า
นางสาวณัฐกุล ถิ่นหัวเตย
นางสาวธัญลักษณ์ มาลัยทัศน์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ข
กิตติกรรมประกาศ ..... ค
สารบัญ ..... ง
สารบัญตาราง ..... ฉ
สารบัญรูป ..... ช
คำย่อและสัญลักษณ์ ..... ซ
บทที่ 1 บทนำ 1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ 1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ 2
1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ 2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 3
2.1 ลักษณะและความสำคัญ 3
2.1.1 ลักษณะสำคัญของนกปรอดหัวโขน 3
2.1.2 ลักษณะสำคัญของนกปรอดคอลาย 3
2.1.3 ลักษณะสำคัญของนกปรอดโอ่งท้องสีน้ำตาล 4
2.2 การระบุเพศนก 5
2.3 เทคนิคการตรวจสอบความหลากหลายพันธุกรรม 9
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย 11
3.1 วัสดุและอุปกรณ์ 11
3.2 สารเคมี 11
3.3 วิธีการ 12
3.3.1 การเก็บตัวอย่างเลือดนก 12
3.3.2 การทำให้ดีเอ็นเอบนกระดาษ FTA บริสุทธิ์ 13
3.3.3 การสกัดดีเอ็นเอจากเลือดนก 13
3.3.4 การระบุเพศด้วยเทคนิคพีซีอาร์ 13
3.3.5 การทำผลิตภัฑณ์พีซีอาร์ให้บริสุทธิ์ 14
3.3.6 การหาตำแหน่งเกาะไพรเมอร์ P2/P8 ในตำแหน่งยีน *CHD-Z* 14
3.3.7 การศึกษาความหลากหลายด้วยเทคนิค inter Primer Binding Site (iPBS) 14
3.3.8 การวิเคราะห์ผลความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้โปรแกรม NTSYSpc2.1X 15
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล 16
4.1 ผลการระบุเพศด้วยเทคนิคพีซีอาร์ 16
4.2 ผลการหาตำแหน่งเกาะของไพรเมอร์ P2/P8 ในตำแหน่งยีน *CHD-Z* 17

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.3 ผลการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค iPBS 19

4.4 การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรม NYSYpc 2.1X และโปรแกรม SPSSInc 22

บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ 24

5.1 สรุปผลการทดลอง 24

5.2 ข้อเสนอแนะ 24

เอกสารอ้างอิง 25

ภาคผนวก 30

ภาคผนวก ก 31

ภาคผนวก ข 34

ภาคผนวก ค 44

ภาคผนวก ง 46

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
3.1	การแบ่งกลุ่มของไพรเมอร์ตามค่าอุณหภูมิ optimal annealing temperature (T_a) ด้วยเทคนิค iPBS	12
3.2	สภาวะที่เหมาะสมในปฏิกิริยาพีซีอาร์	14
3.3	สภาวะที่เหมาะสมของการวิเคราะห์ความหลากหลายด้วยเทคนิค iPBS	15
ก-1	ผลการระบุเพศนกปรอดหัวโขนด้วยไพรเมอร์ P2/P8 จำนวน 77 ตัวอย่าง	32
ค-1	ค่า similarity coefficient โดยเลือกวิธีการจัดแบบ UPGMA ด้วยโปรแกรม NTSYSpc 2.1X ของนกปรอดจำนวน 14 ตัวอย่าง	44
ค-2	ค่า similarity coefficient โดยเลือกวิธีการจัดแบบ UPGMA ด้วยโปรแกรม NTSYSpc 2.1X ของนกปรอดหัวโขนจำนวน 10 ตัวอย่าง	45

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	ลักษณะของนกปรอดหัวโขน	3
2.2	ลักษณะของนกปรอดคอลาย	4
2.3	ลักษณะนกปรอดโอ่งท้องสีน้ำตาล	5
2.4	ลักษณะของนกแก้วอิเลคตัสที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาแบบ sexually dimorphic	5
2.5	ลักษณะของแพนกวินอเดลีที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาแบบ sexually monomorphic	6
2.6	โครโมโซมเพศในนกเพศผู้ (homogamatic: ZZ) และนกเพศเมีย (heterogamatic: ZW)	6
2.7	ผลการตรวจแยกเพศโดยเทคนิคพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์เมื่อแสดงผลบนอะกาโรสเจล ซึ่งเรืองแสงอุลตร้าไวโอเลต เพศผู้จะปรากฏเพียงแบนเดียว ในขณะที่เพศเมียจะปรากฏสองแบน (M = marker DNA M = เพศผู้ F = เพศเมีย)	7
2.8	ลักษณะยีน *CHD-W* และ *CHD-Z* และความยาวบริเวณอินทรอน (Intron)	7
4.1	ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่แปลผลด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้ไพรเมอร์ P2/P8 จากตัวอย่างทั้งหมด 12 ตัวอย่าง โดย F คือเพศเมีย M คือเพศผู้	16
4.2	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *CHD-Z* ในตัวอย่าง BPG03 และ BPG05 โดยใช้ไพรเมอร์ forward primer (P2) และ reveres primer (P8)	18
4.3	ลักษณะแถบดีเอ็นเอในเทคนิค iPBS ของไพรเมอร์ในกลุ่มที่ 1 กับกลุ่มที่ 4 (ก) และกลุ่มที่ 2 กับกลุ่มที่ 3 (ข) เทียบกับเครื่องหมายดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส	20
4.4	ตัวอย่างลักษณะแถบดีเอ็นเอของไพรเมอร์ที่นำมาใช้จำนวน 3 ไพรเมอร์ คือ ไพรเมอร์ 2272 (ก) ไพรเมอร์ 2224 (ข) และไพรเมอร์ 2374 (ค) โดยเทียบกับเครื่องหมายดีเอ็น-เอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส	21
4.5	แผนภูมิความสัมพันธ์ (dendrogram) ของนกปรอดที่ศึกษาด้วยโปรแกรม NTSYSpc 2.1X	23
4.6	แผนภาพการกระจายตัวของประชากรกลุ่มนกปรอดจำนวน 14 ตัวอย่าง โดยแบ่งกลุ่มตัวอย่างออกเป็น 3 กลุ่ม	23

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำย่อและสัญลักษณ์

คำย่อ	ความหมาย
BPG	ตัวอย่างนกปรอดหัวโขนจังหวัดพังงา
BPL	ตัวอย่างนกปรอดหัวโขนจังหวัดพัทลุง
CHD gene	ยีน *Chromo-helicase*-DNA-binding protein
CHD-W	ยีน *CHD* ที่อยู่บน W–chromosome
CHD-Z	ยีน *CHD* ที่อยู่บน Z–chromosome
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
iPBS	inter Primer Binding Site technique
LTR	Long Terminal Repeat
M	โมลาร์
mg/ml	มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
mM	มิลลิโมลาร์
pmol	พิโคโมล
SRAP	Sequence-Related Amplified Polymorphism technique
T_a	Optimal Annealing Temperature
TBE buffer	Tris-Borate-EDTA buffer
TE buffer	Tris-EDTA buffer
µM	ไมโครโมลาร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

นกในวงศ์นกปรอด (Pycnonotidae) จัดเป็นสัตว์ป่าคุ้มครองที่เพาะพันธุ์ได้ พบอาศัยอยู่ทั่วไปตั้งแต่บริเวณที่ราบต่ำไปจนถึงบนยอดดอยสูง มีอยู่ด้วยกันทั้งหมด 109 สปีชีส์ แต่ประเทศไทยพบ 36 สปีชีส์ เช่น นกปรอดคอลาย (*Pycnonotus finlaysoni*) นกปรอดสวน (*P. blanfordi*) นกปรอดหน้านวล (*P. goiavier*) รวมทั้งนกปรอดหัวโขน (*P. jocosus*) เป็นต้น ซึ่งนกปรอดหัวโขนเป็นนกที่นิยมนำมาเลี้ยงเป็นสัตว์เลี้ยงเพื่อฟังเสียงร้องอันไพเราะและเลี้ยงเพื่อการแข่งขันเสียงร้อง โดยนกปรอดหัวโขนมีชื่อเรียกหลายชื่อ เช่น นกกรงหัวจุก นกปรอดหัวจุก และนกปรอดเคราแดง (สมิทธิ์, 2547) ลักษณะทั่วไปของนกปรอดหัวโขนมีขนาดยาวประมาณ 20 เซนติเมตร มีปากเรียวแหลม ปลายปากโค้งเล็กน้อย และมีขนสั้นแข็งบริเวณโคนปาก คอสั้น ลำตัวเพรียว ปีกสั้น หางยาว โดยนกปรอดหัวโขนมีขนหงอนยาวสีดำตั้งชันขึ้นมาบนหน้าผากเป็นลักษณะเด่น มองดูคล้ายกับคนที่สวมหัวโขนหรือชฎาที่มียอดแหลมขึ้นมา ลักษณะพิเศษของนกปรอดหัวโขนจะมีปากดำ กระหม่อมดำเช่นเดียวกับหงอน แก้มสีขาว และมีเส้นสีดำลากจากโคนปาก ลงมาต่อกับแถบสีดำข้างคอ ใต้ตามีแต้มสีแดง ลำตัวด้านบนสีน้ำตาล ลำตัวด้านล่าง สีขาว โคนหางด้านล่างสีแดง ปลายขอบหางสีขาว ขาสีดำ (มนตรี, 2552) พบว่านกปรอดหัวโขนเพศผู้และเพศเมียมีลักษณะภายนอกเหมือนกันหรือมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาเป็นแบบ sexually monomorphic ทำให้ไม่สามารถระบุเพศจากลักษณะภายนอกได้ ดังนั้นจึงมีการศึกษาการระบุเพศด้วยเทคนิคทางโมเลกุลเพื่ออนุรักษ์และเพิ่มประชากรนก (สมชาติ และดุจฤดี, 2557) นอกจากนี้ยังมีข้อมูลการลักลอบและการขนส่งนกปรอดหัวโขนอย่างผิดกฎหมาย ทำให้มีการส่งนกปรอดหัวโขนจากภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือลงสู่ภาคใต้ และกรุงเทพฯ (สีฟ้า, 2552) ทั้งนี้ยังไม่มีการรายงานความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกปรอดในประเทศไทย ดังนั้นจึงสนใจศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมเพื่อเป็นฐานข้อมูลนำมาสู่การวางแผนการควบคุม และลดปัญหาการลุกคามต่อนกชนิดนี้ต่อไป

การระบุเพศนิยมใช้ยีน *Chromo-helicase-DNA-binding Protein* (*CHD*) ซึ่งเป็นยีนบนโครโมโซมเพศของนกทุกสปีชีส์ โดยอาศัยความยาวที่แตกต่างกันของยีน *CHD-W* และ *CHD-Z* ในการกำหนดเพศ โดยเพศผู้มียีนแบบ *CHD-Z* จำนวน 2 อัลลีล ส่วนเพศเมียมียีนแบบ *CHD-W* และ *CHD-Z* (สุคนทิพย์ และคณะ, 2549; สุพัตรา และคณะ, 2555; ณิชาภัทร และคณะ, 2556) โดยการศึกษาใช้เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสหรือพีซีอาร์ (PCR) ซึ่งได้มีการศึกษากรระบุเพศด้วยวิธีนี้ในนกชนิดอื่น เช่น นกเหยี่ยวนิ้วสั้น (Sacchi และคณะ, 2004) นกกินหอยปากแดง (Watson และคณะ, 2004) และนกปากช้อนหน้าดำ (Cheng และคณะ, 2006) รวมทั้งมีรายงานการวิจัยพบว่าดีเอ็นเอของนกสามารถสกัดได้จากขน (Jensen และคณะ, 2003; Sacchi และคณะ, 2004) มูลนก (Faux และคณะ, 2014) ทั้งนี้ยังมีการศึกษาลำดับนิวโอไทด์เพื่อยืนยันผลการระบุเพศ

สำหรับการศึกษาความหลากหลายใช้เทคนิคทางโมเลกุล คือเทคนิค inter Primer Binding Site (iPBS) เป็นเทคนิครูปแบบใหม่พัฒนาขึ้นโดย Kalendar และคณะ (2010) โดยได้นำเทคนิค iPBS ศึกษาในแกะ วัว จามรี และไก่ แต่ยังไม่มีการศึกษาเทคนิคนี้ในนกจึงสนใจศึกษาเทคนิคนี้ในนกปรอด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เนื่องจากข้อดีของเทคนิคนี้คือ ผู้วิจัยไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลเกี่ยวกับลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมายมาก่อน รวมถึงเป็นเทคนิคที่ทำได้ง่าย ไม่ซับซ้อน ให้ข้อมูลมาก ค่าใช้จ่ายไม่สูง ใช้ปริมาณดีเอ็นเอน้อย (25-100 นาโนกรัมต่อปฏิกิริยา) และให้รูปแบบดีเอ็นเอที่ความคงตัวสูง จากนั้นแปลผลด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส และนำมาให้ค่าคะแนนแบบ binary เพื่อวิเคราะห์หาความหลากหลายของนกปรอดทั้ง 3 ชนิดที่เรียกว่า dendrogram (การหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม) ทำให้ทราบความสัมพันธ์หรือความใกล้ชิดกันของกลุ่มตัวอย่างที่ศึกษา

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1.2.1 เพื่อระบุเพศนกปรอดหัวโขนด้วยเทคนิคพีซีอาร์

1.2.2 เพื่อประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกปรอดหัวโขนด้วยเทคนิคทางโมเลกุล

1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

ศึกษาเฉพาะตัวอย่างนกปรอดหัวโขนที่เก็บตัวอย่างจากสถานีเพาะเลี้ยงสัตว์ป่าจังหวัดพัทลุง และสถานีเพาะเลี้ยงสัตว์ป่าจังหวัดพังงาในเดือน กรกฎาคม พ.ศ.2557 โดยการระบุเพศศึกษาเฉพาะบริเวณยีน *Chromo-helicase-DNA-binding protein (CHD)* ด้วยไพรเมอร์ P2/P8 และประเมินความหลากหลายด้วยเทคนิค inter Primer Binding Site (iPBS)

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 เพื่อเป็นฐานข้อมูลด้านความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกปรอดหัวโขน

1.4.2 ส่งเสริมการเพาะเลี้ยงนกปรอดหัวโขนในสภาพกรงเพื่อประโยชน์ในการอนุรักษ์ และลดการคุกคามต่อนกปรอดหัวโขนในธรรมชาติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ลักษณะและความสำคัญ

2.1.1 ลักษณะสำคัญของนกปรอดหัวโขน

นกปรอดหัวโขน (Red-whiskered Bulbul) มีชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Pycnonotus jocosus* อยู่ในวงศ์นกปรอด (Pycnonotidae) ชื่อสปีชีส์มาจากรากศัพท์ภาษาละติน คือ iocosus แปลว่ารื่นเริง สนุกสนาน ตลกขบขัน ซึ่งหมายถึง นกที่ไม่ชอบอยู่นิ่งกับที่หรือนกที่มีแก้มสีแดงคล้ายกับตัวตลก นอกจากนี้นกปรอดหัวโขนยังมีชื่ออื่นๆ เช่น นกปรอดหัวโขนเคราแดง นกปรอดหัวจุก นกกรงหัวจุก โดยพบครั้งแรกที่ประเทศจีน ทั่วโลกมี 9 สปีชีส์ย่อย ประเทศไทยพบ 2 สปีชีส์ย่อย คือ *Pycnonotus jocosus pattani* Deignan ชื่อชนิดย่อยมาจากชื่อสถานที่ที่พบคือ จังหวัดปัตตานี และ *Pycnonotus jocosus emeria* Linnaeus ชื่อชนิดย่อยมาจากรากศัพท์ภาษากรีกคือ emer,-o แปลว่าสัตว์เลี้ยง โดยเป็นนกที่นิยมเลี้ยงเป็นสัตว์เลี้ยง พบที่รัฐเบงกอล ประเทศอินเดีย (http://www.dnp.go.th/wildlifednp/)

รุ่งโรจน์ (2549) รายงานว่า นกชนิดนี้พบได้ในหลายภูมิประเทศ พบตามที่ราบลุ่มหรือในชุมชนเมือง และตามสวนสาธารณะ ลักษณะทั่วไปเป็นนกขนาดเล็ก (20 เซนติเมตร) มีหงอนขนสีดำเป็นพุ่มบนหัว ใต้ตามีแถบสีแดง แก้มสีขาว และใต้แก้มมีแถบสีดำ ขนคลุมโคนขนหาง ด้านบนไม่มีแถบสีจาง ขนหางคู่นอกมีลายแถบสีขาว คอหอยสีขาว อกด้านข้างมีลายแถบสีน้ำตาล ขนคลุมโคนขนหางด้านล่างสีแดง ตัวไม่เต็มวัยไม่มีลายแถบสีแดงใต้ตา ขนคลุมโคนขนหางด้านล่างสีชมพู ดังรูปที่ 2.1

รูปที่ 2.1 ลักษณะของนกปรอดหัวโขน
(ที่มา: http://www.naturefocused.com/photography/hawaii/bulbul.html)

2.1.2 ลักษณะสำคัญของนกปรอดคอลาย

นกปรอดคอลาย (Stripe-throated Bulbul) มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Pycnonotus finlaysoni* อยู่ในวงศ์นกปรอด (Pycnonotidae) เป็นนกที่พบได้บ่อยที่สุดชนิดหนึ่ง ตามป่าแทบทุกประเภท โดยหากินในพุ่มไม้รกๆ ที่ไม่สูงจากพื้นดินมากนัก มักส่งเสียงร้องให้ได้ยินตลอดเวลา ลำตัวมีสีน้ำตาลอมเทา ส่วนปีก หางและและขนคลุมใต้หางมีสีน้ำตาลอมเหลืองดังที่แสดงในรูปที่ 2.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยเสียงร้องของนกปรอดคอลายไพเราะ และคล้ายคลึงกับเครือญาติวงศ์นกปรอดด้วยกัน จึงถูกนำมาเลี้ยงและรู้จักกันในชื่อ “นกกรงคอลาย” หากยังมีการนำมาเลี้ยงต่อไปอาจมีแนวโน้มหายไปจากภาคใต้เช่นเดียวกับนกปรอดหัวโขน (http://www.oknation.net/blog/plainswanderer/2013)

รูปที่ 2.2 ลักษณะของนกปรอดคอลาย
(ที่มา: http://www.oknation.net/blog/plains-wanderer/2013/08/25/entry-1)

2.1.3 ลักษณะสำคัญของนกปรอดโอ่งท้องสีน้ำตาล

นกปรอดโอ่งท้องสีน้ำตาล (Ochraceous Bulbul) มีชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Alophoixus ochraceus* (Moore, 1854) อยู่ในวงศ์นกปรอด (Pycnonotidae) มีขนหงอนชี้ฟู ขนคอฟูฟ่องสีขาว ดังที่แสดงในรูปที่ 2.3 อาศัยอยู่ทางภาคตะวันตก ภาคตะวันออก และภาคใต้ โดยมีนกที่มีลักษณะคล้ายคลึงกันคือ นกปรอดโอ่งเมืองเหนือ (Puff-throated Bulbul) ที่อยู่ทางภาคเหนือและภาคอีสาน โดยสีลำตัวด้านบนของปรอดโอ่งเมืองเหนือนั้นอมเขียว และด้านล่างอมเหลืองมากกว่า นอกจากนี้แก้มยังสีเทาไม่อมน้ำตาล ต่างจากนกปรอดโอ่งท้องสีน้ำตาลที่สีออกน้ำตาลๆ ทั่วทั้งตัว นกปรอดโอ่งท้องสีน้ำตาลในเมืองไทยอาศัยอยู่ตามป่าต่ำ (lowland forests) เป็นหลัก แต่ทางฝั่งตะวันออกของภาคใต้ตอนล่างลงไปจนถึงมาเลเซีย อยู่ในป่าดิบเขาระดับต่ำ ส่วนบนเกาะบอร์เนียวนั้นถือว่าเป็นนกป่าดิบเขา (montane species) อย่างแท้จริง (http://www.oknation.net/blog/plains-wanderer/)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 2.3 ลักษณะนกปรอดโอ่งท้องสีน้ำตาล
(ที่มา: http://www.oknation.net/blog/plains-wanderer/2014/09/21/entry-1)

2.2 การระบุเพศนก

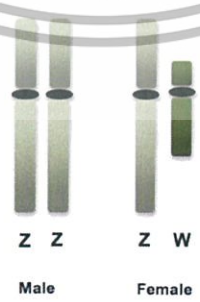
การระบุเพศนกเป็นประโยชน์ทางด้านการขยายพันธุ์ การอนุรักษ์เผ่าพันธุ์นก และทางการค้าในนกบางชนิด สุคนธ์ทิพย์ และสายชล (2549) กล่าวโดยทั่วไปว่า การระบุเพศนกสามารถสังเกตได้จากลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกันระหว่างเพศ (sexually dimorphic) ดังเช่น นกแก้วอิเลคตัสที่แสดงในดังรูปที่ 2.4 ซึ่งจะสังเกตจากลักษณะภายนอกได้อย่างชัดเจนว่า เพศผู้จะมีขนสีเขียว ปากสีเหลือง ส่วนเพศเมียจะมีขนสีแดงเข้มปนม่วง ปากสีดำ สำหรับนกชนิดอื่นๆ เช่น นกอพยพ นกทะเล และนกเลี้ยงบางชนิดมีลักษณะภายนอกของนกเพศผู้ และเพศเมียไม่แตกต่างกัน (sexually monomorphic) จึงไม่สามารถแยกเพศจากลักษณะภายนอกได้ ดังรูปที่ 2.5 ทำให้เกิดปัญหาทางด้านการเพิ่มจำนวนประชากรนกในกรง เพื่อการอนุรักษ์ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องหาวิธีที่หลากหลายสำหรับการระบุเพศนก

รูปที่ 2.4 ลักษณะของนกแก้วอิเลคตัสที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาแบบ sexually dimorphic
(ที่มา: http://upic.me/i/3x/electus--parrot.jpg)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

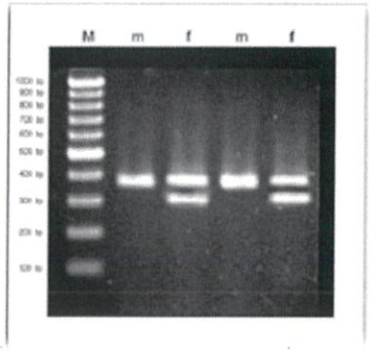
รูปที่ 2.5 ลักษณะของแพนกวินอเดลีที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาแบบ sexually monomorphic (ที่มา: http://upic.me/i/3x/electus--parrot.jpg)

การระบุเพศนกสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การจัดตะเกียบหรือกระดูกเชิงกราน (สุคนทิพย์ และคณะ, 2549) การตรวจสอบฮอร์โมน (Cerit และ Avanus, 2007) การผ่าตัดเปิดช่องท้อง (ธนากร, 2546) ซึ่งเป็นการระบุเพศจากลักษณะทางกายภาพ ทำให้นกเกิดการบาดเจ็บมาก และใช้เวลานาน จึงมีการใช้การระบุเพศด้วยโครโมโซม ดังงานวิจัยของ Cortes และคณะ (1999) ซึ่ง รายงานว่าโครโมโซมเพศในนกมี 2 ชนิด คือ โครโมโซม Z และโครโมโซม W ดังแสดงในรูปที่ 2.6 โดย Griffiths และ Tiwari (1995) ได้พบยีนที่เกี่ยวกับการสร้างโปรตีน *CHD (Chromo-helicase-DNA binding protein)* บนโครโมโซม W ของนก ซึ่งต่อมาพบว่ามียีนลักษณะเดียวกันบนโครโมโซม Z ซึ่งหลักการแยกเพศอาศัยความยาวที่แตกต่างกันของโครโมโซมเพศทั้งสองชนิด โดยบนโครโมโซมเพศทั้งสองชนิดนั้นมี conserved gene ที่ชื่อว่า *CHD* ซึ่งยีน *CHD* ที่อยู่บนโครโมโซม W เรียกว่า *CHD-W* และยีน *CHD* ที่อยู่บนโครโมโซม Z เรียกว่า *CHD-Z* โดยนกเพศเมียจะพบ 2 แถบของ *CHD-W* และ *CHD-Z* ส่วนนกเพศผู้จะพบเพียง 1 แถบคือ *CHD-Z* มี 2 อัลลีล (http://issuu.com/vpatjournal/docs/vol21no4/18) ดังรูปที่ 2.7 ซึ่งลักษณะดังกล่าวมีคุณสมบัติที่ดีในการตรวจแยกเพศนก (Griffiths และ Korn, 1997) เนื่องจากว่าเป็นยีนที่มีวิวัฒนาการช้า และแม้จะเป็นสัตว์ปีกต่างชนิดกันก็สามารถพบยีนนี้ได้ ยกเว้นสัตว์ปีกในกลุ่ม ratites ซึ่งได้แก่ นกกระจอกเทศ และนกอีมู เป็นต้น



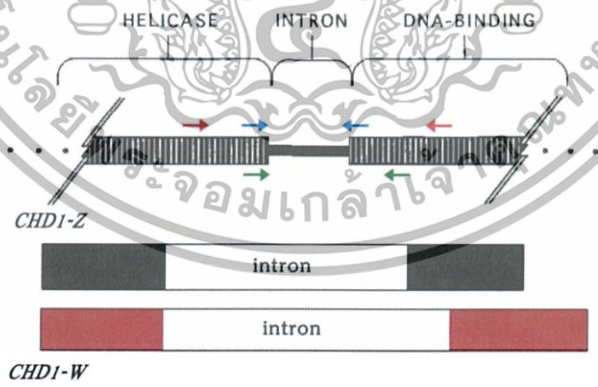
รูปที่ 2.6 โครโมโซมเพศในนกเพศผู้ (homogamatic: ZZ) และนกเพศเมีย (heterogamatic: ZW) (ที่มา: http://blog.tepapa.govt.nz/tag/avian/)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.7 ผลการตรวจแยกเพศโดยเทคนิคพีซีอาร์ ด้วยไพรเมอร์ P2/P8 เมื่อแสดงผลบนเจลอะกาโรส ซึ่งเรืองแสงอุลตร้าไวโอเลต เพศผู้จะปรากฏเพียงแบนเดียว ในขณะที่เพศเมียจะปรากฏสองแบน (M = DNA ladder, m = เพศผู้, f = เพศเมีย)
(ที่มา: http://issuu.com/vpatjournal/docs/vol21no4/18)

การออกแบบไพรเมอร์ที่เหมาะสมเพื่อสร้างสายดีเอ็นเอในตำแหน่งที่ครอบคลุมส่วนอินทรอนของยีน *CHD* ส่งผลให้สามารถแยกความแตกต่างชิ้นส่วนของยีน *CHD-W* และ *CHD-Z* ได้ ซึ่งไพรเมอร์ที่นิยมใช้ ได้แก่ ไพรเมอร์ P2/P8 (Griffiths และคณะ, 1998) พบว่ามีตำแหน่งเจาะจงบริเวณ DNA binding protein ซึ่งในงานวิจัยของคุณัญญา และคณะ (2556) ได้ศึกษาหาไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการระบุเพศนกปรอดหัวโขน โดยใช้ไพรเมอร์ P2/P8 ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในตำแหน่งยีน *CHD* ที่อยู่บนโครโมโซม Z และโครโมโซม W นอกจากนี้ยังมีไพรเมอร์ 1237L/1272H (Kahn และคณะ, 1998) และไพรเมอร์ 2550F/2718R (Fridofsson และ Ellegren, 1999) ที่มีตำแหน่งเจาะจงบริเวณส่วนปลายของอินทรอนที่อยู่ระหว่าง helicase กับ DNA binding ดังแสดงในรูปที่ 2.8



รูปที่ 2.8 ลักษณะยีน *CHD-W* และ *CHD-Z* และความยาวบริเวณอินทรอน (Intron)
(ที่มา: ดัดแปลงจาก Kahn และคณะ, 1998)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากงานวิจัยของ Watson และคณะ (2004) ทำการระบุเพศนกกินหอยปากแดง (*Eurasian oystercatcher*) โดยทำการเก็บตัวอย่างจากขนบริเวณอกของนกนำมาสกัดดีเอ็นเอ รวมทั้งวัดขนาดของปากเพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างเพศ และลักษณะทางสัณฐาน การระบุเพศด้วยเทคนิคทางโมเลกุลโดยการเพิ่มปริมาณยีน *CHD* ด้วยไพรเมอร์ P2/P8 ผลการทดลองพบว่า เพศผู้เกิด 1 แถบที่มีขนาด 380 คู่เบส เพศเมียเกิด 2 แถบ ที่มีขนาด 380 และ 400 คู่เบส จากนก 80 ตัว สามารถระบุเพศได้ 75 ตัว ไม่สามารถเพิ่มปริมาณยีน *CHD* ได้ 5 ตัว และจากการเปรียบเทียบกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าการระบุเพศด้วยการวัดความยาวปากให้ผลถูกต้องเพียง 90 เปอร์เซ็นต์

Sacchi และคณะ (2004) ทำการระบุเพศเหยี่ยวนิ้วสั้น (*Circaetus gallicus*) โดยเพิ่มจำนวนอัลลีล *CHD-W* และ *CHD-Z* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ P2/P8 พบว่าเกิดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์. 1 แถบ มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอประมาณ 380 คู่เบส ในทุกตัวอย่างของเหยี่ยวนิ้วสั้น ทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของอัลลีลทั้งสอง พบว่าอัลลีล *CHD-W* ยาวกว่าอัลลีล *CHD-Z* อยู่เพียง 9 คู่เบส (387 และ 378 คู่เบส ตามลำดับ) ซึ่งมีความแตกต่างกันน้อยมาก เมื่อนำมาวิเคราะห์ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสทำให้เพศผู้ และเมียเกิดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ 1 แถบ ไม่สามารถระบุเพศได้จึงอาศัยเทคนิคอื่นๆในการระบุเพศ เช่นเทคนิค Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะเข้ามาช่วยในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยสุ่มจับทั้งจีโนมในส่วนที่จำเพาะมากขึ้น โดยในการระบุเพศเหยี่ยวนิ้วสั้น โดยใช้เอนไซม์ 2 ชนิด ได้แก่ เอนไซม์ *Hae*III และเอนไซม์ *Asp*700I เมื่อนำมาย่อยผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่า เอนไซม์ *Hae*III มีความจำเพาะกับอัลลีล *CHD-Z* ทำให้เกิดความแตกต่างของขนาดชิ้นดีเอ็นเอ คือ เพศผู้เกิดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ 2 แถบ (303 และ 75 คู่เบส) เพศเมียเกิดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ 3 แถบ (387, 303 และ 75 คู่เบส) ส่วนเอนไซม์ *Asp*700I มีความจำเพาะกับอัลลีล *CHD-W* ทำให้เกิดความแตกต่างของขนาดชิ้นดีเอ็นเอ คือ เพศผู้เกิดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ 1 แถบ (378 คู่เบส) และเพศเมียเกิดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ 3 แถบ (378, 280 และ 107 คู่เบส) ดังนั้นการใช้เอนไซม์ *Hae*III และเอนไซม์ *Asp*700I เข้ามาช่วยย่อยผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จากไพรเมอร์ P2/P8 ทำให้เกิดความแตกต่างจึงสามารถระบุเพศนกได้

Cheng และคณะ (2006) ระบุเพศนกปากช้อนหน้าดำ (*Platalea minor*) ซึ่งเป็นนกประจำถิ่นของเอเชียตะวันออกที่ใกล้จะสูญพันธุ์ด้วยเทคนิคทางโมเลกุล เพื่อเป็นประโยชน์ในการวางแผนการอนุรักษ์หรือขยายสายพันธุ์ และศึกษานิเวศวิทยาของนก โดยตัวอย่างที่ได้เป็นตัวอย่างนกที่ตายจากการเกิดโรคระบาดของเชื้อ *Clostridium botulinum* จำนวน 26 ตัว จากนั้นทำการตรวจสอบลักษณะอวัยวะเพศ เพื่อยืนยันกับผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคทางโมเลกุลโดยการเพิ่มปริมาณยีน *CHD* ด้วยไพรเมอร์ 2550F/2718R จากผลการวิเคราะห์พบว่า เพศผู้เกิดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ 1 แถบ มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอ 600 คู่เบส (*CHD-Z*) เพศเมียเกิดเกิดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ 2 แถบ มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอ 600 และ 450 คู่เบส (*CHD-Z* และ *CHD-W*) ซึ่งผลจากการระบุเพศนกด้วยเทคนิคทางโมเลกุลให้ผลตรงกับการตรวจสอบอวัยวะเพศของนก สามารถแยกเพศได้เป็นนกเพศผู้ 14 ตัว และเพศเมีย 12 ตัว

Wang และคณะ (2007) ทำการศึกษาการระบุเพศนก จากตัวอย่าง 80 สายพันธุ์ ครอบคลุม 19 วงศ์ ทำการระบุเพศโดยอาศัยเทคนิคพีซีอาร์ที่ใช้ไพรเมอร์ 2 คู่ คือ 2550F/2718R และ 1237L/1273H ในการเพิ่มจำนวนยีน *CHD* โดยใช้สภาวะในการทำพีซีอาร์ เดียวกันคือ 95 องศาเซลเซียส 5 นาที 95 องศาเซลเซียส 45 วินาที 50 องศาเซลเซียส 45 วินาที 72 องศาเซลเซียส 45 วินาที จำนวน 35 รอบ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที ทำการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ โดยวิธีอิเล็ก-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โทรโฟรีซิสใช้อะกาโรสความเข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์ ผลที่ได้คือ ไพรเมอร์ 1237L/1273H สามารถระบุเพศนกได้ 63 สายพันธุ์ ส่วนไพรเมอร์ 2550F/2718R สามารถระบุเพศนกได้ 59 สายพันธุ์

Costantini และคณะ (2008) ระบุเพศนกแพนกวินฮัมโบลด์ (*Spheniscus humboldti*) จากการตรวจสอบยีน *CHD* ด้วยไพรเมอร์ P2/P8 พบว่า เพศผู้เกิดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ 1 แถบ (370 คู่เบส) เพศเมียเกิด 2 แถบ (370 และ 380 คู่เบส) ทำให้เกิดความคลุมเครือเนื่องจากมีความแตกต่างน้อย จึงใช้เทคนิค RFLP ที่ใช้เอนไซม์ 2 ชนิด คือ เอนไซม์ *Hae*III (310, 60 และ 380 คู่เบส) และเอนไซม์ *Asp*700I (370, 270 และ 110 คู่เบส) ทำให้แยกความแตกต่างของเพศผู้ และเพศเมียได้ดียิ่งขึ้น

ณิชาภัทร และคณะ (2556) ได้ศึกษาการระบุเพศนกในสกุลนกหัวโตซึ่งนกหัวโตเล็กเป็นนกชายเลนที่อพยพเข้ามาประเทศไทยในช่วงนอกฤดูผสมพันธุ์ซึ่งเป็นช่วงที่นกเพศผู้ และเพศเมียมีลักษณะสัณฐานวิทยาที่เหมือนกันยากต่อการระบุเพศจึงต้องอาศัยเทคนิคทางโมเลกุลในการศึกษา ครั้งนี้เก็บตัวอย่างเลือดนกในสกุลนกหัวโตเล็ก 3 สปีชีส์ คือ หัวโตทรายเล็ก (*Charadrius mongolus*) หัวโตทรายใหญ่ (*C. leschenaultii*) และหัวโตขาดำ (*C. alexandrinus*) ด้วยกระดาษ FTA (FTA card) และเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในส่วนอินทรอนของยีน *CHD* สามารถตรวจสอบเพศนกในสกุลนี้ได้ด้วยไพรเมอร์ 2550F/2718R พบว่าผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จากวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส นกเพศเมียมีแถบดีเอ็นเอ 2 แถบที่มีชิ้นดีเอ็นเอขนาด 450 คู่เบส (*CHD-W*) และขนาดประมาณ 650 คู่เบส (*CHD-Z*) และนกเพศผู้มีแถบดีเอ็นเอเพียง 1 แถบประมาณ 650 คู่เบส (*CHD-Z*) นอกจากนั้นพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *CHD-Z* ของ *C. alexandrines* มีขนาดแตกต่างจาก *C. mongolus* และ *C. leschenaultia* อยู่ 13 คู่เบส

2.3 เทคนิคการตรวจสอบความหลากหลายพันธุกรรม

ในการตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมปัจจุบันได้มีการประยุกต์ใช้เทคนิคทางโมเลกุลหลายชนิดสามารถใช้เป็นเครื่องมือในการจำแนกสิ่งมีชีวิตจากลักษณะสัณฐาน (morphology) ที่แตกต่างกันเป็นเครื่องหมายหรือลักษณะสำคัญเพียงอย่างเดียว ส่งผลให้มีข้อจำกัดหลายประการเทคนิคทางโมเลกุลจึงเป็นข้อได้เปรียบในการศึกษาวิวัฒนาการ และความหลากหลายทางพันธุกรรม เนื่องจากสามารถทำได้รวดเร็ว มีความแม่นยำ และน่าเชื่อถือมากกว่าการอาศัยลักษณะภายนอกเพียงอย่างเดียว ปัจจุบันได้พัฒนาเทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส จึงมีการใช้ประโยชน์จากเทคนิคดังกล่าวเพื่อการทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprinting) ของสิ่งมีชีวิตด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดต่างๆ ซึ่งเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะในสิ่งมีชีวิตจะมีความเหมาะสมอย่างยิ่งในการใช้ระบุชนิดสิ่งมีชีวิต การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอประกอบด้วยขั้นตอนต่างๆ คือ การสกัดดีเอ็นเอ การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอในหลอดทดลองด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดต่างๆจากนั้นนำผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้มาแยกขนาดด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้สามารถนำมาใช้ประโยชน์หลายด้าน เช่น การระบุสายพันธุ์หรือชนิดของสิ่งมีชีวิต เพื่อศึกษาวิวัฒนาการและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต (http://www.scimath.org) ดังรายงานของจุฑาพร แสงประจักษ์ (2555) อ้างถึง (Prashanth และคณะ, 2002; Martos และคณะ, 2005; Bao และคณะ, 2006; Seetharam และคณะ, 2009; Rajkumar และคณะ, 2011; Kanawapee และคณะ, 2011; Rahman และคณะ, 2012) ได้ใช้เทคนิค AFLP สำหรับศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและการปรับปรุงพันธุ์ข้าว หรือใช้เทคนิค iPBS (inter Primer Binding Site) ซึ่งเป็นเทคนิคทางโมเลกุล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปแบบใหม่พัฒนาขึ้นโดย Kalendar และคณะ (2010) อาศัยหลักการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ จากการใช้รูปแบบของไพรเมอร์ที่มีขนาด 12-18 นิวคลีโอไทด์บริเวณ tRNA เข้าไปสุ่มจับกับดีเอ็นเอเป้าหมายบริเวณ retrotransposon ของ long terminal repeat (LTR) ซึ่งเป็นบริเวณที่ลำดับเบสของดีเอ็นเอมักเกิดการผันแปรทางพันธุกรรมได้ง่าย และพบในสิ่งมีชีวิตกลุ่มยูคาริโอตทุกชนิด ดังนั้นข้อดีของเทคนิคนี้คือ จึงไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลเกี่ยวกับลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมาย ทำได้ง่ายไม่ซับซ้อน ให้ข้อมูลมาก ค่าใช้จ่ายไม่สูง ใช้ปริมาณดีเอ็นเอน้อย (25-100 นาโนกรัมต่อปฏิกิริยา) และให้รูปแบบดีเอ็นเอที่มีความคงตัวสูง ซึ่งเทคนิค iPBS นี้ นิยมใช้เป็นเครื่องหมายทางโมเลกุลในพืช เช่น พลับ (Raddova และคณะ, 2012) องุ่น (Guo และคณะ, 2013) และฝรั่ง (Mehmood และคณะ, 2013) เป็นต้น ในประเทศไทยพบรายงานการวิจัยที่ประยุกต์ใช้เทคนิค inter Primer DNA Binding Site (iPBS) และเทคนิค sequence related amplified polymorphism (SRAP) ในไผ่รวกสยาม (*Thyrsostachys siamensis*) (โองการ และเฟื่องฟ้า, 2557) นอกจากนี้จากรายงานการวิจัยของ Kalendar และคณะ (2010) ได้นำเทคนิค iPBS ศึกษาในแกะ วัว จามรี และไก่ ซึ่งในอนาคตอาจนำเครื่องหมายทางโมเลกุลเทคนิค iPBS มาใช้กับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ ได้ต่อไป

(สุรินทร์, 2552) กล่าวว่าความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นในแต่ละตัวอย่างอาจจะเกิดจากชิ้นส่วนของดีเอ็นขนาดใหญ่มาแทรกในระหว่าง 2 ตำแหน่งที่ไพรเมอร์เกาะ การหายของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เกาะกับไพรเมอร์ไปหนึ่งตำแหน่ง หรือการเปลี่ยนแปลงการแทนที่ของเบสบริเวณที่เป็นที่เกาะของไพรเมอร์ทำให้ไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ อย่างไรก็ตามเทคนิค iPBS มักจะขึ้นในลักษณะการมีหรือไม่มีแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งหนึ่งๆ มากกว่าการเปลี่ยนขนาดของแถบดีเอ็นเอ ดังนั้นแถบดีเอ็นเอของเทคนิคนี้ส่วนใหญ่จะมาจากดีเอ็นเอของนิวเคลียส ซึ่งถ่ายทอดมาจากทั้งฝ่ายพ่อและแม่ โดยเทคนิคนี้สามารถทำได้ง่าย รวดเร็ว และให้ข้อมูลได้มาก ทั้งยังไม่มีข้อเสียในเรื่องของการทดลองซ้ำที่ให้การทดลองแต่ละครั้งได้ผลไม่เหมือนเดิมอย่างเทคนิค random amplification of polymorphic DNA (RAPD)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 วัสดุและอุปกรณ์

3.1.1 Autopipette

3.1.2 Capillary tube

3.1.3 Centrifuge

3.1.4 Electrophoresis system

3.1.5 FTA card

3.1.6 Heat box

3.1.7 Microwave

3.1.8 Poucher

3.1.9 Spin down

3.1.10 Syringes size 26

3.1.11 Thermal cycler

3.1.12 Tube size 0.2 and 1.5 ml

3.1.13 Vortex

3.1.14 Water bath

3.2. สารเคมี

3.2.1 10X Standard *Taq* reaction buffer

3.2.2 2X *Taq* master mix

3.2.3 50 bp DNA ladder

3.2.4 6X gel loading dye blue

3.2.5 Agarose

3.2.6 Boric acid

3.2.7 DI water

3.2.8 dNTPs

3.2.9 Ethidium bromide

3.2.10 Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)

3.2.11 FTA purification reagent

3.2.12 GF-1 Ambiclean kit (PCR & Gel) (Vivantis,Malaysia)

3.2.13 GF-1 blood kit (Vivantis,Malaysia)

3.2.14 Nuclease free water

3.2.15 Primer (Chang และคณะ, 2010)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.15.1 P2 (5'-TCTGCATCGCTAAATCCTTT-3')

3.2.15.2 P8 (5'-CTCCCAAGGATGAGRAAYTG-3')

3.2.16 Proteinase K

3.2.17 *Taq* DNA polymerase

3.2.18 Tris-HCl

ตารางที่ 3.1 การแบ่งกลุ่มของไพรเมอร์ตามค่า optimal annealing temperature (T_a) ด้วยเทคนิค iPBS

กลุ่ม	ไพรเมอร์	ค่า T_a (°C)	ค่าเฉลี่ย T_a	กลุ่ม	ไพรเมอร์	ค่า T_a (°C)	ค่าเฉลี่ย T_a
1	2074	49.6	51	2	2251	53.2	53
	2217	51.4			2378	53	
	2252	51.6			2392	52.2	
	2253	51			2401	53	
	2256	51		3	2077	55.1	55
	2373	51			2083	54.6	
	2385	51.2			2224	55.4	
	2389	50			2232	55.4	
	2398	51			2240	55	
	2400	51			2272	55	
	2402	50			2374	53.5	
2	2219	53	53	4	2220	57	58
	2222	53			2238	56	
	2229	52.3			2273	56.5	
	2230	52.9			2295	60	
	2231	52			2415	61	

(ที่มา: ดัดแปลงจาก Kalendar และคณะ, 2010)

3.3 วิธีการ

3.3.1 การเก็บตัวอย่างเลือดนก

เก็บเลือดนกปรอดหัวโขนจากสถานีเพาะเลี้ยงสัตว์ป่าจังหวัดพัทลุง และสถานีเพาะเลี้ยงสัตว์ป่าจังหวัดพังงา ซึ่งได้รับความร่วมมือจากสถานีวิจัยสัตว์ป่าบึงบอระเพ็ด โดยเจาะเลือดด้วยเข็มเบอร์ 26 ซึ่งทำการเก็บตัวอย่าง 2 ลักษณะคือ การระบุเพศใช้กระดาษ FTA ป้ายหรือซับเลือดที่หยดออกมา หรือถ้าเลือดมีปริมาณมากให้ใช้หลอด capillary เก็บเลือด เก็บไว้ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.2 การทำให้ดีเอ็นเอบนกระดาษ FTA บริสุทธิ์

ทำความสะอาด poucher ขนาด 2 มิลลิเมตร นำไปเจาะบนกระดาษ FTA ที่มีตัวอย่างเลือด เลือกเจาะบริเวณที่เลือดบางๆ ใส่ชิ้นกระดาษที่เจาะลงในหลอดทดลองขนาด 0.2 มิลลิลิตร ทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์โดยการเติม FTA purification reagent ปริมาตร 125 ไมโครลิตร ดีดให้สารละลายเป็นฟองนำไป vortex และแช่ไว้ 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบเวลาดีดอีกรอบจนเป็นฟอง นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เมื่อครบเวลาดีดต่อแล้วดูดสารละลายออก ทำซ้ำอีกหนึ่งรอบ และหยุดการทำงานของ FTA purification reagent ด้วย 0.1 มิลลิโมลาร์ TE buffer ปริมาตร 125 ไมโครลิตร นำไป vortex จากนั้นนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที (เวลาบ่มให้กระดาษที่มีเลือดอยู่คว่ำลงมาที่สารละลาย) เมื่อครบเวลาดูดสารละลายออก ทำซ้ำอีกครั้ง แล้วนำไปทำแห้งโดยให้ความร้อนที่ 65 องศาเซลเซียส เปิดฝาหลอดทดลองไว้ บ่มจนกว่ากระดาษแห้ง ซึ่งสามารถทดสอบโดยดีดหลอดให้กระดาษเคลื่อนที่จึงถือว่าแห้ง

3.3.3 การสกัดดีเอ็นเอจากเลือดนก

ใช้ GF-1 blood kit (Vivantis, Malaysia) ในการสกัดโดยเติม buffer BB ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงในตัวอย่างเลือดปริมาตร 200 ไมโครลิตร ในหลอด 1.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex เติม proteinase K ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และผสมให้เข้ากันทันทีบ่มไว้ที่ 65 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เติม 99.5 เปอร์เซ็นต์ เอทานอลปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมกันทันทีโดยใช้ vortex หลังจากนั้นย้ายตัวอย่างลงในคอลัมน์ และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างคอลัมน์ครั้งที่ 1 ด้วย wash buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 7,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างคอลัมน์ครั้งที่ 2 ด้วย wash buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยง 7,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทำซ้ำอีกหนึ่งรอบโดยใช้ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นย้ายคอลัมน์เติม elution buffer 100 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 2 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 7,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เก็บดีเอ็นเอที่ได้ไว้ที่ 4 ถึง -20 องศาเซลเซียส

3.3.4 ระบุเพศด้วยเทคนิคพีซีอาร์

นำหลอดตัวอย่างกระดาษ FTA ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วมาเติมสารเคมีในแต่ละหลอดให้มีปริมาตร 25 ไมโครลิตร ดังนี้

2X *Taq* master mix	12.5	ไมโครลิตร
Forward primer (P2) ความเข้มข้น 20 พิโคโมลต่อไมโครลิตร	1	ไมโครลิตร
Reverse primer (P8) ความเข้มข้น 20 พิโคโมลต่อไมโครลิตร	1	ไมโครลิตร
Nuclease free water	10.5	ไมโครลิตร

นำไปเข้าเครื่อง thermal cycler เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยสภาวะที่เหมาะสมดังตารางที่ 3.2 จากนั้นทำการวิเคราะห์ผลพีซีอาร์ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้เจลอะกาโรสความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.2 สภาวะที่เหมาะสมในปฏิกิริยาพีซีอาร์

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (วินาที)	จำนวนรอบ
Initial denaturation	95	300	1
Denaturation	95	45	35
Annealing	53	45	
Extension	72	45	
Final extension	72	5	1
Cool down	4	-	-

(ที่มา: ดัดแปลงจาก Sacchi และคณะ, 2004)

3.3.5 การทำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ให้บริสุทธิ์

สุ่มตัวอย่างที่เป็นผลิตภัณฑ์พีซีอาร์นำมาวิเคราะห์ผลด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้เจลอะกาโรสความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ใช้ปริมาตร 10-15 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปส่องยูวีแล้วตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณที่ต้องการ แล้วใช้ชุด GF-1 Ambiclean kit (PCR & Gel) ทำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ให้บริสุทธิ์ตามคู่มือของบริษัท Vivantis

3.3.6 การหาตำแหน่งเกาะไพรเมอร์ P2/P8 ในยีนตำแหน่ง *CHD-Z*

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ในตัวอย่าง BPG03 และ BPG05 ซึ่งเป็นตัวอย่างเพศผู้ตำแหน่งยีน *CHD-Z* โดยใช้ไพรเมอร์ forward (P2) และไพรเมอร์ reverse (P8) (คุณัญญา และคณะ, 2556) มาจัดเรียง (alignment) และตัดแต่งด้วยโปรแกรม BioEdit ทำให้ทราบจำนวนคู่เบสของยีน *CHD-Z*

3.3.7 การศึกษาความหลากหลายด้วยเทคนิค inter Primer Binding Site (iPBS)

นำดีเอ็นเอจากเลือดของนกปรอด ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้เทคนิค iPBS เพื่อหาไพรเมอร์ที่เหมาะสม โดยการศึกษาครั้งนี้ประกอบด้วยไพรเมอร์ทั้งหมด 32 ไพรเมอร์ ซึ่งแต่ละไพรเมอร์มีค่า optimal annealing temperature (T_a) ที่ต่างกัน จึงทำการจัดจำแนกไพรเมอร์ตามค่า T_a ได้ดังตารางที่ 3.1 จากนั้นกำหนดให้มีปริมาตรของปฏิกิริยาสุดท้ายเป็น 20 ไมโครลิตร และมีสารต่างๆดังนี้ 10X standard *Taq* reaction buffer ปริมาตร 2 ไมโครลิตร dNTPs 100 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 4 ไมโครลิตร $MgCl_2$ 50 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร *Taq* polymerase 5000 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร primer 20 พิโคโมลต่อไมโครลิตร ปริมาตร 2 ไมโครลิตร และปริมาณดีเอ็นเอ 300 นาโนกรัม ซึ่งสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค iPBS ใช้สภาวะที่ดัดแปลงจากงานวิจัยของ Kalendar และคณะ (2010) ดังตารางที่ 3.3 จากนั้นวิเคราะห์ผลพีซีอาร์ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้เจลอะกาโรสความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.3 สภาวะที่เหมาะสมของการวิเคราะห์ความหลากหลายด้วยเทคนิค iPBS

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (วินาที)	จำนวนรอบ
Initial denaturation	95	180	1
Denaturation	95	15	30
Annealing	45-50	60	
Extension	68	60	
Final extension	72	300	1

(ที่มา: ดัดแปลงจาก Kalendar และคณะ, 2010)

3.3.8 การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้โปรแกรม NTSYSpc 2.1X

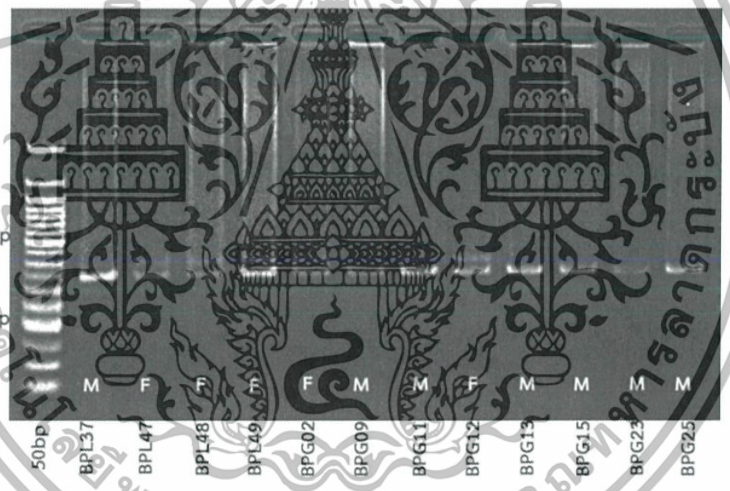
ทำการแปลผลแถบดีเอ็นเอโดยการให้คะแนนแบบ binary คือ เมื่อเกิดแถบดีเอ็นเอให้คะแนนเป็น 1 และเมื่อไม่มีแถบดีเอ็นเอเกิดขึ้น ณ ตำแหน่งเดียวกันของแต่ละตัวอย่างให้คะแนนเป็น 0 จากนั้นนำคะแนนที่เกิดจากแต่ละไพรเมอร์มาเรียงเพื่อคิดคำนวณต่อกัน แล้ววิเคราะห์สร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ (dendrogram) โดยใช้โปรแกรม NTSYSpc 2.1X (Rohlf, 2000) ตามงานวิจัยของ Kumla และคณะ (2012) โดยเลือกวิธีการจัดแบบ unweighted pair-group method using arithmetic average (UPGMA)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลและอภิปรายผลการทดลอง

4.1 ผลการระบุเพศด้วยเทคนิคพีซีอาร์

การใช้เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสหรือพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์ P2 เป็นไพรเมอร์ forward และ P8 เป็นไพรเมอร์ reverse ในการระบุเพศนกปรอดหัวโขน (*Pycnonotus jocosus*) พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมซึ่งกำหนดช่วง annealing ที่อุณหภูมิ 53 องศาเซลเซียส ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ชัดเจน ดังรูปที่ 4.1 ตัวอย่างการวิเคราะห์ผลจากจังหวัดพัทลุง (BPL) ได้แก่ BPL37, BPL47, BPL48 และ BPL49 จังหวัดพังงา (BPG) คือ BPG02, BPG09, BPG11, BPG12, BPG13, BPG15, BPG23 และ BPG25 โดยตัวอย่าง BPL47, BPL48, BPL49, BPG02 และ BPG12 ขึ้น 2 แถบ แปลผลว่า เป็นเพศเมียเพราะนกเพศเมียมีโครโมโซมเป็น ZW มี 2 อัลลีล ขนาดต่างกัน ถ้าขึ้นเพียง 1 แถบ ดังเช่นในตัวอย่าง BPL37, BPG09, BPG11, BPG13, BPG15, BPG23 และ BPG25 แปลผลว่าเป็นเพศผู้ เนื่องจากเพศผู้มีโครโมโซมเป็น ZZ ที่ทั้ง 2 อัลลีล มีขนาดเท่ากัน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ คุณัญญา และคณะ (2556)



รูปที่ 4.1 ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่แปลผลด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้ไพรเมอร์ P2/P8 จากตัวอย่างทั้งหมด 12 ตัวอย่าง โดย F แทนเพศเมีย M แทนเพศผู้

ขนาดบางส่วนของยีน *CHD* สามารถทราบได้จากการเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 50 คู่เบส โดยนกปรอดหัวโขนเพศเมียมีอัลลีล *CHD-W* กับ *CHD-Z* ขนาด 400 และ 350 คู่เบส ส่วนนกปรอดหัวโขนเพศผู้มีอัลลีล *CHD-Z* ขนาด 350 คู่เบส ที่ให้แถบชัดเจน เนื่องจากอัลลีลทั้ง 2 มีขนาดเท่ากัน

ในการระบุเพศนกปรอดหัวโขนที่เก็บตัวอย่างจากจังหวัดพังงา 29 ตัวอย่าง และจังหวัดพัทลุง 48 ตัวอย่าง รวมทั้งหมด 77 ตัวอย่าง พบว่า จังหวัดพังงา (BPG) มีสัดส่วนเพศผู้มากกว่าเพศเมีย คือ เป็นเพศเมีย 13 ตัว คิดเป็นร้อยละ 44.8 และเพศผู้ 15 ตัว คิดเป็นร้อยละ 51.72 และมี 1 ตัวอย่างไม่สามารถระบุเพศได้ คิดเป็นร้อยละ 3.4 เนื่องจากตัวอย่าง BPG06 มีปริมาณตัวอย่างน้อย ส่วนใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

จังหวัดพัทลุง (BPL) พบว่า สัดส่วนเพศผู้น้อยกว่าเพศเมีย คือเป็นเพศเมีย 40 ตัว คิดเป็นร้อยละ 83.3 และเพศผู้ 6 ตัว คิดเป็นร้อยละ 12.5 และมี 2 ตัวอย่างไม่สามารถระบุเพศได้ คิดเป็นร้อยละ 4.17 เนื่องจากตัวอย่าง BPL30 และ BPL45 มีปริมาณตัวอย่างน้อย และจากรายงานการระบุเพศของนกปรอดหัวโขนโดยใช้ปลายรากขน มีในงานวิจัยของสมชาติ และคณะ (2014) ได้ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *CHD* คือ *CHD-W* และ *CHD-Z* เพื่อการระบุเพศนกปรอดหัวโขน โดยเพิ่มปริมาณยีนด้วยเทคนิคพีซีอาร์ และใช้ไพรเมอร์ P2/P8 พบว่า นกเพศเมียมีผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ 2 แถบ คือ แถบของยีน *CHD-W* ที่มีขนาด 384 คู่เบส และ *CHD-Z* ที่มีขนาด 332 คู่เบส ในขณะที่นกเพศผู้มีผลิตภัณฑ์พีซีอาร์เพียงแถบเดียวเท่านั้น คือ แถบของยีน *CHD-Z* ที่มีขนาด 332 คู่เบส

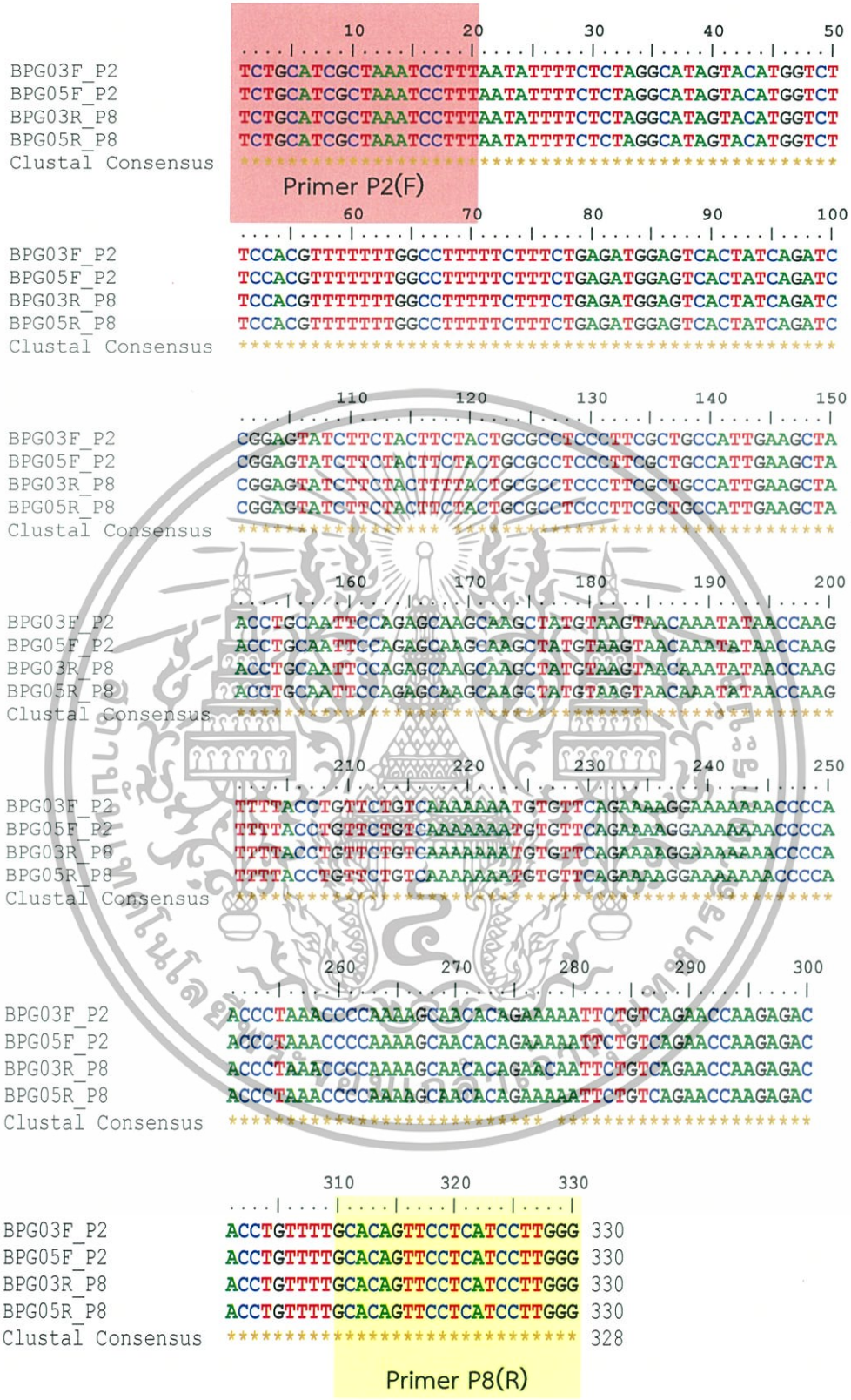
Kocijan และคณะ (2011) อ้างโดย ณิชาภัทร (2557) ในการระบุเพศนกเก็บตัวอย่างจากเลือดของนกโดยใช้กระดาษ FTA ซึ่งสามารถกักเก็บสารพันธุกรรมได้เป็นอย่างดี นอกจากนี้ยังสามารถเก็บตัวอย่างจากเนื้อเยื่อ เลือด ขนที่ผลัด หรืออุจจาระมาใช้ในการระบุเพศได้อีกด้วย (Faux และคณะ, 2014) ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้เก็บตัวอย่างที่เป็นกระดาษ FTA และเลือดที่อยู่ในหลอด capillary ทั้งจังหวัดพังงา และพัทลุง 77 ตัวอย่าง พบว่า การเก็บตัวอย่างเลือดด้วยวิธีกระดาษ FTA ช่วยลดการบาดเจ็บที่จะเกิดขึ้นกับนกได้ และเพื่อยืนยันผลการระบุเพศของนกปรอดหัวโขน ได้สุ่มผลิตภัณฑ์พีซีอาร์มาทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยนำมาเทียบกับฐานข้อมูล GenBank เพื่อเปรียบเทียบความเหมือนหรือความต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์กับสิ่งมีชีวิตจำพวกนกที่มีอยู่ในฐานข้อมูล GenBank ตัวอย่างที่สุ่มมาวิเคราะห์ คือ BPG03 และ BPG05 ซึ่งวิเคราะห์อัลลีล *CHD-Z* พบว่า มีความเหมือนกับนกปรอดหัวโขน (*P. jocosus*) ในอัลลีล *CHD-Z* 99 เปอร์เซ็นต์ โดยมี accession number คือ KM058237

4.2 การหาตำแหน่งเกาะของไพรเมอร์ P2/P8 ในยีนตำแหน่ง *CHD-Z*

เมื่อจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ (alignment) ในตัวอย่าง BPG03 และ BPG05 ซึ่งเป็นตัวอย่างเพศผู้ตำแหน่งยีน *CHD-Z* โดยใช้ไพรเมอร์ forward (P2) และไพรเมอร์ reverse (P8) ด้วยโปรแกรม BioEdit ทำให้ทราบจำนวนคู่เบสของยีน *CHD-Z* ที่แน่นอน คือ 330 คู่เบส ซึ่งเมื่อวิเคราะห์ผลด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 50 คู่เบส ยีน *CHD-Z* มีขนาด 350 คู่เบส โดยสามารถหาตำแหน่งเกาะของไพรเมอร์ forward (P2) คือ 5’ TCTGCATCGCTAAATCCTTT 3’ และตำแหน่งเกาะของไพรเมอร์ reveres (P8) คือ 5’ CACAGTTCCTCATCCTTGGGAG 3’ จากการจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ BPG03 และ BPG05 ของเส้นไพรเมอร์ reverse (P8) ดังรูปที่ 4.2 พบตำแหน่งคู่เบสที่ 118 มีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสจากเบส C เป็นเบส T ใน BPG03R ซึ่งเป็นการแทนที่เบสกลุ่มเดียวกัน (transition) ส่วนตำแหน่งคู่เบสที่ 278 มีการแทนที่เบสต่างกลุ่มกัน (transversion) ใน BPG03R จากเบส A เป็นเบส C

142274

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



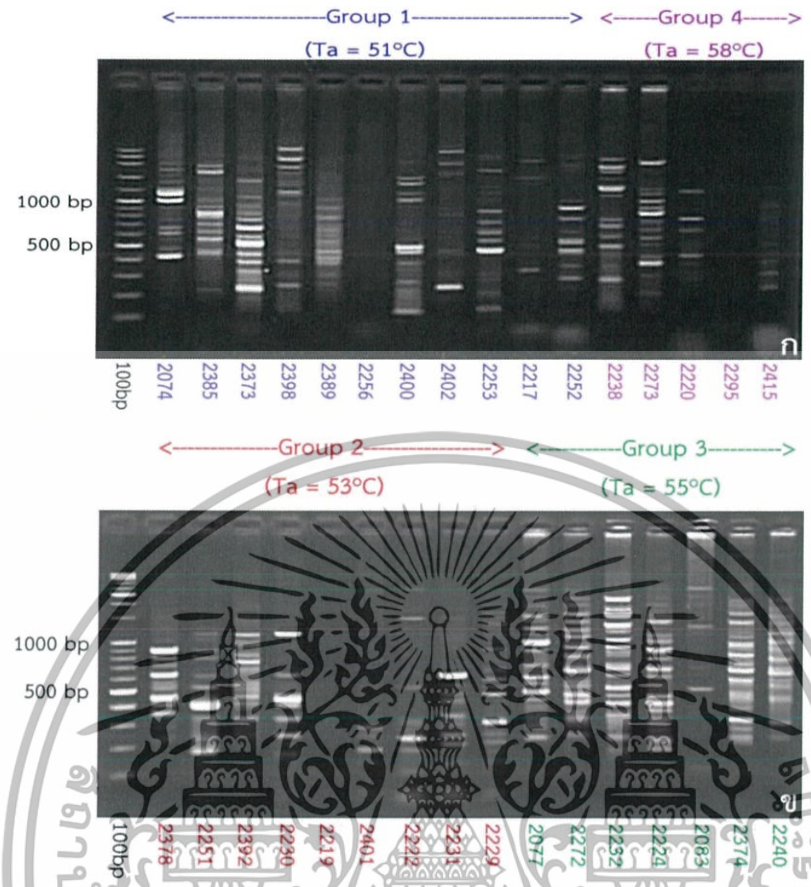
รูปที่ 4.2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *CHD-Z* ในตัวอย่าง BPG03 และ BPG05 โดยใช้ไพรเมอร์ forward (P2) และไพรเมอร์ reverse (P8)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค iPBS

การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค iPBS โดยสกัดดีเอ็นเอจากเลือดของนกปรอด และหาไพรเมอร์ที่เหมาะสมกับตัวอย่าง โดยทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยเทคนิค iPBS ซึ่งเทคนิคนี้ ได้มีการศึกษาในงานวิจัยของ Kalendar และคณะ (2010) มีไพรเมอร์ทั้งหมด 84 ไพรเมอร์ ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้เลือกมาศึกษา 32 ไพรเมอร์ โดยเลือกตามค่า PCR efficiency (โอกาสในการเกิดแถบดีเอ็นเอ) ที่พืช และสัตว์มีค่าใกล้เคียงหรือเท่ากัน จากนั้นได้จัดกลุ่มไพรเมอร์ตามค่า T_a โดยที่ T_a คือ อุณหภูมิเหมาะสมที่ให้ไพรเมอร์เข้าไปเกาะกับดีเอ็นเอต้นแบบ จึงจัดกลุ่มไพรเมอร์ตามค่า T_a ได้เป็น 4 กลุ่ม โดยเฉลี่ยอุณหภูมิ T_a ในแต่ละกลุ่มเพื่อหาไพรเมอร์ที่เหมาะสมกับตัวอย่างนกปรอด รวมสารละลายดีเอ็นเอที่เจือจางความเข้มข้นเป็น 50 นาโนกรัม จากจังหวัดพัทลุงจำนวน 2 ตัวอย่าง (BPL25 และ BPL28) และจังหวัดพังงาจำนวน 1 ตัวอย่าง (BPG30) เข้าด้วยกันอย่างละ 2 ไมโครลิตร ได้ความเข้มข้นสุดท้ายคือ 300 นาโนกรัม หลังทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ พบว่า ค่า T_a แต่ละกลุ่มปรากฏแถบดีเอ็นเอแตกต่างกัน และมีความหลากหลายของแถบดีเอ็นเอ ดังแสดงในรูปที่ 4.3ก และ 4.3ข ซึ่งเลือกกลุ่มอุณหภูมิตามค่า T_a ที่ให้แถบดีเอ็นเอหลากหลาย และชัดเจนที่สุด โดยเลือกกลุ่มที่ 3 มีทั้งหมด 7 ไพรเมอร์ ประกอบไปด้วยไพรเมอร์ 207, 2272, 2232, 2224, 2083, 2374 และ 2240 ที่มีค่า T_a เฉลี่ยเท่ากับ 55 องศาเซลเซียส ซึ่งไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอหลากหลาย และชัดเจนที่สุดเหมาะสำหรับนำมาศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมมี 5 ไพรเมอร์ คือ ไพรเมอร์ 2077, 2272, 2232, 2224 และ 2374

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

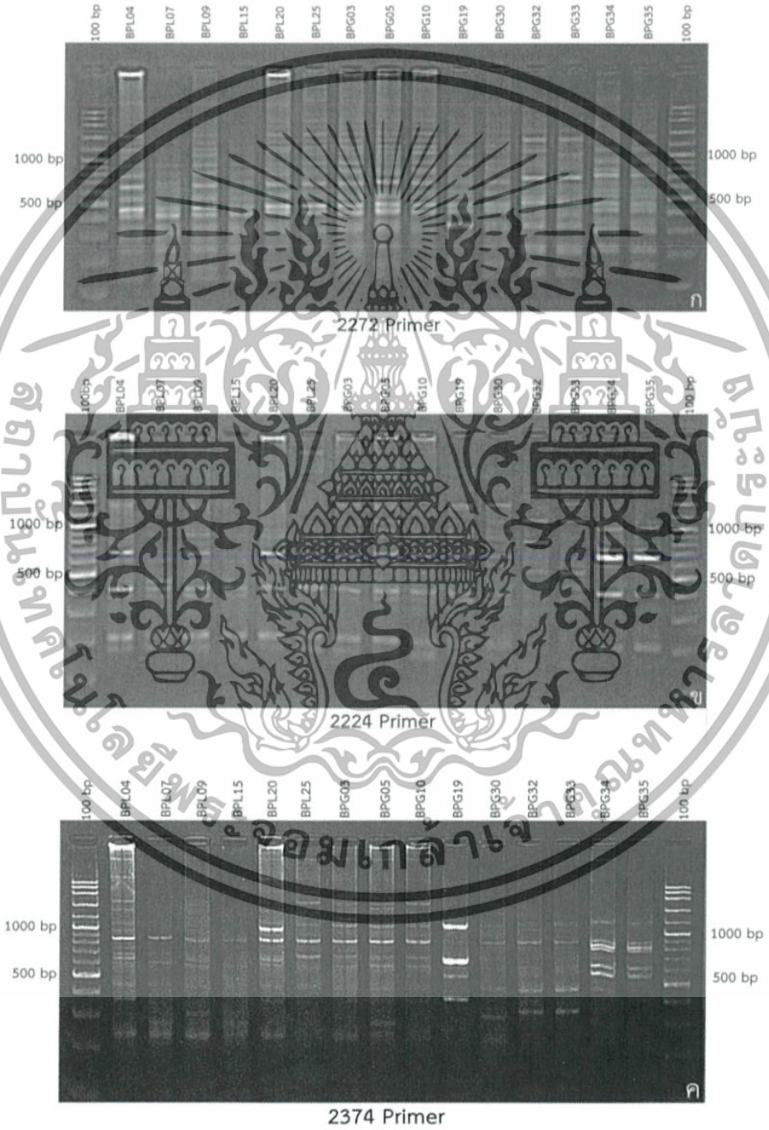


รูปที่ 4.3 ลักษณะแถบดีเอ็นเอในเทคนิค iPBS ของไพรเมอร์ในกลุ่มที่ 1 กับกลุ่มที่ 4 (ก) และกลุ่มที่ 2 กับกลุ่มที่ 3 (ข) เทียบกับเครื่องหมายดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส

จากรูปที่ 4.3 ไพรเมอร์ที่ไม่ขึ้นแถบดีเอ็นเอมีจำนวน 3 ไพรเมอร์ ซึ่งโดยส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่มที่ 1, 4 และ 2 คือ ไพรเมอร์ 2256, 2295 และ 2219 สำหรับการศึกษาความหลากหลายด้วยเทคนิค iPBS นี้ ทำการศึกษานกปรอดทั้งหมด 15 ตัวอย่าง โดยแบ่งเป็นนกปรอดหัวโขน 10 ตัวอย่างจากจังหวัดพัทลุง 6 ตัวอย่าง ได้แก่ รหัส BPL04, BPL07, BPL09, BPL15, BPL20 และ BPL25 จังหวัดพังงา 5 ตัวอย่าง ได้แก่ รหัส BPG03, BPG05, BPG10, BPG19 และ BPG30 ส่วนนกปรอดชนิดอื่นอีก 4 ตัวอย่างจากจังหวัดพังงา ได้แก่ นกปรอดโอ่งท้องสีน้ำตาล (BPG32 และ BPG33) และนกปรอดคอลาย (BPG34 และ BPG35) เมื่อนำไพรเมอร์ทั้ง 5 ไพรเมอร์ที่เหมาะสมมาทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ซึ่งสภาวะที่เหมาะสมแตกต่างกันไปตามค่า T_a ปรากฏดังรูปที่ 4.4ก-4.4ค พบว่า แต่ละไพรเมอร์ให้รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่แตกต่าง และหลากหลาย โดยไพรเมอร์ 2077, 2224, 2232, 2272 และ 2374 ให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 23, 18, 11, 21 และ 20 แถบ ตามลำดับ ดังนั้นทั้ง 5ไพรเมอร์พบแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 93 แถบ เฉลี่ย 18 แถบดีเอ็นเอต่อไพรเมอร์ ซึ่งตัวอย่างนกปรอดหัวโขนในรหัส BPG19 มีแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างจากตัวอย่างนกปรอดหัวโขนตัวอื่นๆ ส่วนตัวอย่างนกปรอดโอ่งท้องสีน้ำตาล และนกปรอดคอลายเป็นนกปรอดต่างสปีชีส์จึงมีลักษณะรูปแบบของแถบดีเอ็นเอต่างกันอย่างชัดเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยสามารถศึกษาหาความหลากหลายด้วยการให้ค่าคะแนนแบบ binary และสร้างออกมาเป็นแผนภูมิความสัมพันธ์ (dendrogram) หรือการกระจายประชากรของกลุ่มตัวอย่าง principal component analysis (PCA) ซึ่งการวิเคราะห์ และแปลผลแถบดีเอ็นเอจะใช้เพียง 14 ตัวอย่าง เพื่อป้องกันผลที่คาดเคลื่อน (error) ได้แก่ BPL04, BPL09, BPL15, BPL20, BPL25, BPG03, BPG05, BPG10, BPG19, BPG30, BPG32, BPG33, BPG34 และ BPG35 เนื่องจากการสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอของตัวอย่างรหัส BPL07 (นกปรอดหัวโขน) ในบางไพรเมอร์ปรากฏแถบดีเอ็นเอไม่ชัดเจน ซึ่งอาจเป็นเพราะมีการเก็บตัวอย่างเลือดนานเกินไป ทำให้เลือดแข็งเป็นลิ่มจึงสกัดดีเอ็นเอได้ยาก ส่งผลให้ได้ปริมาณดีเอ็นเอน้อย



รูปที่ 4.4 ตัวอย่างลักษณะแถบดีเอ็นเอของไพรเมอร์ที่นำมาใช้จำนวน 3 ไพรเมอร์ คือ ไพรเมอร์ 2272 (ก) ไพรเมอร์ 2224 (ข) และไพรเมอร์ 2374 (ค) โดยเทียบกับเครื่องหมายดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส

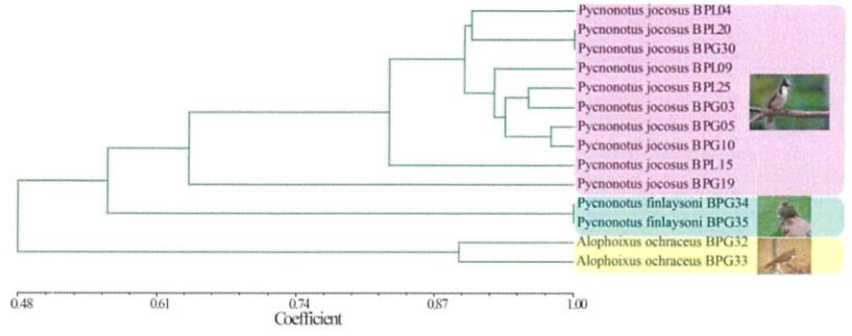
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 การวิเคราะห์ผลความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรม NTSYSpc 2.1X และโปรแกรม SPSSInc

เมื่อวิเคราะห์ความหลากหลายโดยใช้โปรแกรม NTSYSpc 2.1X ปรากฏค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์หรือความใกล้ชิดกัน (similarity coefficient) อยู่ระหว่าง 0.48-1 โดยเมื่อเปรียบเทียบในกลุ่มนกปรอดหัวโขน 10 ตัวอย่าง รหัส BPL04, BPL09, BPL15, BPL20, BPL25, BPG03 BPG05, BPG10, BPG19 และ BPG30 มีค่า similarity coefficient หรือ genetic similarity ระหว่าง 0.59-0.98 ดังแสดงในตารางภาคผนวกที่ ค-2 ซึ่งแสดงว่า นกปรอดหัวโขนมีความหลากหลายภายในสปีชีส์เดียวกัน ส่วนตัวอย่างนกปรอดโอ่งท้องสีน้ำตาลรหัส BPG32 และ BPG33 มีค่า similarity coefficient ใกล้เคียงกัน เท่ากับ 0.89 แต่เมื่อเทียบกับกลุ่มนกปรอดหัวโขน เช่น ตัวอย่างรหัส BPL04 เทียบกับ BPG32 มีค่า similarity coefficient เท่ากับ 0.47 ซึ่งสามารถอธิบายได้ว่า นก 2 สปีชีส์นี้ มีความห่างกันทางพันธุกรรม ในตัวอย่างนกปรอดคอลายรหัส BPG34 และ BPG35 มีค่า similarity coefficient เท่ากับ 1 แสดงให้เห็นว่าไม่มีความแตกต่างระหว่างสปีชีส์ ซึ่งเมื่อเทียบกับตัวอย่างในกลุ่มนกปรอดหัวโขนมีค่า similarity coefficient ที่ห่างกันเช่นเดียวกับนกปรอดโอ่งท้องสีน้ำตาล หากเทียบความสัมพันธ์หรือความใกล้ชิดของนกสกุลปรอดอื่นกับนกปรอดหัวโขน พบว่า นกปรอดคอลาย (BPG34 และ BPG35) มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันกับนกปรอดหัวโขนมากกว่านกปรอดโอ่งท้องสีน้ำตาล (BPG32 และ BPG33) โดยดูจากค่า similarity coefficient หรือ genetic similarity ซึ่งนกปรอดหัวโขน และนกปรอดคอลายเป็นนกที่อยู่ในสกุลเดียวกัน คือสกุลนกปรอดธรรมดา (*Pycnonotus*) ส่วนนกปรอดโอ่งท้องสีน้ำตาลอยู่ในสกุลปรอดโอ่ง (*Alophoxixus*) และเมื่อวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้โปรแกรม SPSSInc พบว่า มีการกระจายตัวของกลุ่มประชากรออกเป็น 3 กลุ่ม ประกอบไปด้วยกลุ่มที่ 1 ซึ่งเป็นนกปรอดหัวโขน ได้แก่ BPL04, BPL09, BPL15, BPL20, BPL25, BPG03, BPG05, BPG10, BPG19 และ BPG30 กลุ่มที่ 2 เป็นนกปรอดคอลาย ได้แก่ BPG34 และ BPG35 กลุ่มที่ 3 เป็นนกปรอดโอ่งท้องสีน้ำตาล ได้แก่ BPG32 และ BPG33 ซึ่งสอดคล้องกับการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรม NTSYSpc 2.1X ที่แบ่งกลุ่มนกปรอดหัวโขนออกจากนกปรอดโอ่งท้องสีน้ำตาล และนกปรอดคอลาย

สำหรับงานวิจัยนี้ได้ประยุกต์ใช้เทคนิค iPBS ศึกษาลักษณะทางพันธุกรรม โดยตัวอย่างนกปรอดที่นำมาศึกษา สามารถแบ่งกลุ่มนกปรอดหัวโขนออกจากนกปรอดโอ่งท้องสีน้ำตาล และนกปรอดคอลาย โดยใช้ไพรเมอร์ที่เหมาะสมที่สุด คือ 2077, 2224, 2232, 2272 และ 2374 ซึ่งกลุ่มนกปรอดหัวโขนที่นำมาศึกษานั้นมีความหลากหลายทางพันธุกรรม ยกเว้นนกปรอดหัวโขนรหัส BPL20 และ BPG30 ที่ไม่มีความแตกต่างระหว่างสปีชีส์ และยังพบว่านกปรอดหัวโขนรหัส BPG19 มีการสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างจากตัวอย่างรหัสอื่นๆชัดเจน (รูปที่ 4.4ก-4.4ค) และจากแผนภูมิความสัมพันธ์ (dendrogram) แยกกลุ่มออกมาจากนกปรอดหัวโขนอื่นๆอย่างชัดเจน (รูปที่ 4.5) ซึ่งคาดว่าอาจเกิดการผสมข้ามสปีชีส์ (cross breeding) ระหว่างนกปรอดหัวโขนกับนกสกุลปรอดชนิดอื่นๆ และตัวอย่าง BPG03 กับ BPG05 ที่ใช้ในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์มีความหลากหลายระหว่างกันในสกุลของนกปรอดหัวโขน โดยสังเกตจาก node ที่แยกออกจากกันบนแผนภูมิความสัมพันธ์ จากนั้นวิเคราะห์ด้วยค่า similarity coefficient ดังตารางภาคผนวกที่ ค-1 พบว่าตัวอย่างทั้งสองมีค่าความสัมพันธ์เท่ากับ 0.95 ซึ่งสามารถบ่งชี้ได้ว่ามีความหลากหลายในนกปรอด-หัวโขนเพียงเล็กน้อย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.5 แผนภูมิความสัมพันธ์ (dendrogram) ของนกปรอดจำนวน 14 ตัวอย่าง ที่ศึกษาด้วยโปรแกรม NTSYSpc 2.1X

รูปที่ 4.6 แผนภาพการกระจายตัวของประชากรนกปรอดจำนวน 14 ตัวอย่าง ด้วยโปรแกรม SPSSInc

จากรูปที่ 4.5 และ 4.6 เมื่อวิเคราะห์ออกมาเป็นแผนภูมิความสัมพันธ์ (dendrogram) และแผนภาพการกระจายตัวของประชากร PCA ระหว่างนกปรอดหัวโขน นกปรอดคอลาย และนกปรอดโอ่งท้องสีน้ำตาล พบว่า นกปรอดหัวโขนรหัส BPL04, BPL09, BPL15, BPL20, BPL25, BPG03, BPG05, BPG10, BPG19 และ BPG30 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับนกปรอดคอลายมากกว่านกปรอดโอ่งท้องสีน้ำตาล ซึ่งสอดคล้องในทิศทางเดียวกันว่า นกปรอดคอลายมีเสียงไพเราะใกล้เคียงกับเครือญาตินกปรอดหัวโขนด้วยกัน (http://www.oknation.net/ blog/plainswanderer/2013) แต่เมื่อเทียบความสัมพันธ์ในแต่ละตัวอย่าง โดยจากค่า similarity coefficient พบว่า BPG19 มีความสัมพันธ์หรือความใกล้ชิดกับนกปรอดโอ่งท้องสีน้ำตาล นกปรอดคอลายเท่ากับ 0.58 และ 0.53 ตามลำดับ เนื่องจาก BPG19 มีลักษณะแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างจากกลุ่มนกปรอดหัวโขนทั้งหมดดังในรูปที่ 4.4 อาจเป็นไปได้ว่าBPG19 เป็นนกปรอดหัวโขนที่เกิดจากการผสมข้ามสายพันธุ์ (cross breeding)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

นกปรอดหัวโขน (*P. jocosus*) จัดเป็นนกที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาเหมือนกันทั้งเพศผู้ และเพศเมีย ทำให้ยากต่อการระบุเพศนก ดังนั้นจึงใช้เทคนิคทางโมเลกุลในการระบุเพศนกปรอดหัวโขนจากการเก็บตัวอย่างเลือดนก 2 พื้นที่ คือสถานีเพาะเลี้ยงสัตว์ป่าพัทลุง และสถานีเพาะเลี้ยงสัตว์ป่าพังงาซึ่งนกอยู่ในสภาพกรง ในการระบุเพศเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสในส่วนของยีนตำแหน่ง *CHD* ด้วยไพรเมอร์ P2/P8 พบว่านกปรอดหัวโขนเพศผู้มียีน *CHD-Z* เพียงอัลลีลเดียวที่มีขนาดเท่ากัน ส่วนเพศเมียมีอัลลีล *CHD-Z* และ *CHD-W* ซึ่งมีขนาดแตกต่างกัน เมื่อทำการวิเคราะห์ผลผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่าเพศผู้เกิด 1 แถบ (ZZ) มีขนาดดีเอ็นเอ 350 คู่เบส เพศเมียเกิด 2 แถบ (ZW) มีขนาด 350 และ 400 คู่เบส ซึ่งในการศึกษาการระบุเพศจากสถานีเพาะเลี้ยงสัตว์ป่าพัทลุง และสถานีเพาะเลี้ยงสัตว์ป่าพังงารวมเป็น 77 ตัวอย่าง แบ่งเป็นเพศผู้ 21 ตัว คิดเป็น 27.27 เปอร์เซ็นต์ เพศเมีย 53 ตัว คิดเป็น 68.83 เปอร์เซ็นต์ และไม่สามารถระบุเพศได้ 3 ตัว คิดเป็น 3.89 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งการยืนยันผลการระบุเพศโดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งยีน *CHD-Z* กับสิ่งมีชีวิตจำพวกนกในฐานข้อมูล GenBank พบว่า ตัวอย่างที่สุ่มมาวิเคราะห์มีความเหมือนกับนกปรอดหัวโขน (*P. jocosus*) ในอัลลีล *CHD-Z* เท่ากับ 99 เปอร์เซ็นต์ โดยมี accession number คือ KM058237 และเมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อหาตำแหน่งเกาะของไพรเมอร์ P2/P8 ในตำแหน่งยีน *CHD-Z* ด้วยโปรแกรม BioEdit ทำให้ทราบจำนวนคู่เบสของยีน *CHD-Z* ที่แน่นอน คือ 330 คู่เบส

สำหรับการศึกษาหาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค iPBS โดยศึกษาไพรเมอร์ทั้งหมด 32 ไพรเมอร์ พบว่า ไพรเมอร์ที่เหมาะสมกับตัวอย่างนกปรอด 14 ตัวอย่าง โดยแบ่งเป็นนกปรอดหัวโขน 10 ตัวอย่าง จากจังหวัดพัทลุง 6 ตัวอย่าง ได้แก่ รหัส BPL04, BPL07 ,BPL09, BPL15, BPL20 และBPL25 จังหวัดพังงา 5 ตัวอย่าง ได้แก่ รหัส BPG03, BPG05, BPG10, BPG19 และ BPG30 ส่วนนกสกุลปรอดอื่นอีก 4 ตัวอย่างจากจังหวัดพังงา ได้แก่ นกปรอดโอ่งท้องสีน้ำตาล (BPG32 และ BPG33) และนกปรอดคอลาย (BPG34 และ BPG35) มีทั้งหมด 5 ไพรเมอร์ที่เหมาะสม ได้แก่ ไพรเมอร์ 2077, 2224, 2232, 2272 และ 2374 สามารถใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกปรอด ซึ่งแบ่งกลุ่มนกสกุลปรอดที่ศึกษาได้ชัดเจนและมีประสิทธิภาพ โดยในการศึกษานี้แบ่งกลุ่มนกปรอดหัวโขนออกจากนกปรอดโอ่งท้องสีน้ำตาล และนกปรอดคอลาย แสดงให้เห็นแนวโน้มน่าสนใจที่จะนำกลุ่มนกปรอดในสกุลต่างๆ มาศึกษาต่อด้วยเทคนิคทางโมเลกุลอื่นๆ

5.2 ข้อเสนอแนะ

ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมควรสุ่มตัวอย่างที่มากขึ้น และเก็บตัวอย่างจากแหล่งธรรมชาติในหลายๆพื้นที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

คุณัญญา ปัญญาภาส, ละอองดาว ภาคภูมิ และวนาพร แซ่อั้ง. 2556. "การบ่งชี้เพศนกปรอดหัวโขนด้วยเทคนิคระดับโมเลกุลกรณีศึกษา ณ สถานีเพาะเลี้ยงสัตว์ป่าห้วยขาแข้ง จังหวัดอุทัยธานี." โครงงานพิเศษวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

จุฑาพร แสงประจักษ์. 2555. "การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและการปรับปรุงพันธุ์ข้าว". *แก่นเกษตร.* 40(3) : 299-308.

ณิชาภัทร ชอบอาภรณ์, สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม, ไกรรัตน์ เอี่ยมอำไพ และสมชาย นิ่มนวล. 2556. "การระบุเพศนกในสกุลนกหัวโต." *วารสารพันธุศาสตร์.* S(1) : 383-386.

ณิชาภัทร ชอบอาภรณ์. 2557. "ความหลากหลายทางพันธุกรรมและการระบุเพศในนกสกุลหัวโตเล็ก." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาชีววิทยา สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ตรีทิพย์ รัตนวรชัย. 2552. **อณูพันธุศาสตร์เบื้องต้นมหัศจรรย์ของดีเอ็นเอ.** กรุงเทพฯ : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ธนากร ฤทธิ์ไธสง. 2546. **นกเลี้ยงสวยงาม.** พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์บริษัท ก.พล.

ปณาลี ภู่วรกุลชัย, สราวุฒิ เกตุแก้ว, เขมวรรณ ศรีตงกิม, บุปผา คงสมัย และอัญมณี อาวุชานนท์. 2551. "การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ SRAP และลักษณะคุณภาพผลของฝักทองพันธุ์การค้าของไทยบางพันธุ์." หน้า 1100-1106. ใน **การประชุมวิชาการแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ครั้งที่ 9.** นครปฐม : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน.

มนตรี แสนสุข. 2552. "นิพนธ์ สีลาเนียม คนรักนกแห่งสวนผึ้ง ราชบุรี แนะเลี้ยงนกกรงหัวจุก ให้เป็นนักรบราวเหล็ก." *เทคโนโลยีสัตว์เลี้ยง.* 22(464) : 88.

รุ่งโรจน์ จุกมงคล. 2549. **ดูนก.** กรุงเทพฯ : เจ.ฟิล์ม โพรเซส.

วังวร สังฆเมธาวี. 2551. "ขาดทุนบนกำไรนกปรอดโอ่งเมืองเหนือ." *BRT Magazine.* (26) : 48-53.

สมิทธิ์ สุติบุตร. 2547. **นกสวน-นกเมือง.** พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : อมรินทร์พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง.

สีฟ้า ละออง. 2552. "การเพาะขยายพันธุ์นกปรอดหัวโขนเคราแดงของภาคเอกชน." หน้า 1-14. ใน **ผลงานวิจัย และรายงานความก้าวหน้างานวิจัย ประจำปี 2552.** กรุงเทพฯ : กลุ่มงานวิจัยสัตว์ป่า สำนักอนุรักษ์สัตว์ป่า กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช.

สุคนธ์ทิพย์ จันทนะ และสายชล แซ่อื้อ. 2549. "การจำแนกเพศนกสวยงามด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์." ปัญหาพิเศษวิทยาศาสตรบัณฑิต. ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และการประมง. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม, ณิชาภัทร ชอบอาภรณ์, ตฤณเศรษฐ์ วีระพันธุ์, นาถสุดา พุทธรักษ์ และอนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม. 2556. "การระบุเพศในนกแก้วบางชนิด." *วารสารพันธุศาสตร์*. 5(2) : 194-202.

สุภัทร ประสพศิลป์, กุลธิดา อิทธิพร และยุรนันท์ อยู่ในวงศ์. 2557. "การรวบรวมซากนกป่าเพื่อเป็นสื่อการสอนในมหาวิทยาลัยมหิดลวิทยาเขตกาญจนบุรี." *วารสารอิเล็กทรอนิกส์มหิดล R2R*. 1(2) : 1-10.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2552. **เครื่องหมายดีเอ็นเอ: จากพื้นฐานสู่การประยุกต์**. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สมชาติ ธนะ และดุจฤดี ปานพรหมมินทร์. 2557. "ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *CHD-W* และ *CHD-Z* เพื่อการระบุเพศของนกปรอดหัวโขน." *วารสารพันธุศาสตร์*. 7(2) : 104-109.

โองการ วณิชาชีวะ และเพื่องฟ้า สีสร้อย. 2557. "การสร้างรูปแบบดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องหมายเอสอาร์เอพี และไอพีบีเอสของไผ่รากสยาม (*Thyrsostachys siamensis*)." *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี*. 3(1) : 45-56.

โอภาส ขอบเขตต์. 2541. **นกในเมืองไทยเล่ม 1**. กรุงเทพฯ : สารคดี.

Baraneka, M. Meszaros, M. Sochorovaa, J. Cechova, J. and Raddovaa, J. 2012 "Utility of retrotransposon-derived marker systems for differentiation of presumed clones of the apricot cultivar Velkopavlovicka." *Scientia Horticulturae*. 143 : 1-6.

Canon, N.R. Tell, L.A. Needham, M.L. and Gardner. 2000. "Flow cytometric analysis of nuclear DNA for sex identification in three psittacine species." *American Journal of Veterinary*. 61(7) : 847-850.

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

Chang, H.W. Chou, Y.C. Su, Y.F. Cheng, C.A. Yao, C.T. Tsai, C.L. Lee, H.C. Wen, C.H. and Cheng, C.C. 2010. "Molecular phylogeny of the *Pycnonotus sinensis* and *Pycnonotus taivanus* in Taiwan based on sequence variations of nuclear *CHD* and mitochondrial *cytochrome b* genes." *Biochemical Systematics and Ecology*. 38(2) : 195-201.

Cheng, Y.H. Kuo, T.F. Lee, D.N. and Weng, C.F. 2006. "Sex identification of the black faced spoonbill (*Platalea minor*)." *Zoological studies*. 45(1) : 104-113.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Costantini ,V. Guaricci , A.C. Laricchiuta, P. Rausa ,F. and Lacalandra,G.M. 2008. "DNA sexing in Humboldt Penguins (*Spheniscus humboldti*) from feather samples." *Animal Reproduction Science*. 106(7) : 162-167.

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

Faux, C.E. McInnes, J. and Jarman, S.N. 2014. "High-throughput real-time PCR and melt curve analysis for sexing Southern Oce an seabirds using fecal samples." *Theriogenology*. 81(6) : 870-874.

Fridolfsson, A. and Ellegren, H. 1999. "A simple and universal method for molecular sexing of non-ratite birds." *Journal Avian Biology*. 30(1) : 116-121.

Griffiths, R. Double, M.C. Orr, K. and Dawson, R.J. 1998. "A DNA test to sex most birds." *Molecular Ecology*. 7(8) : 1071-1075.

Griffiths, R. and Korn, R. 1997. "A *CHD1* gene is Z Chromosome linked in the chicken Gallus domesticus." *Gene*. 197(1-2) : 225-229.

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

Griffiths, R. and Phil, D. 2000. "Sex Identification in birds." *Seminars in avian and exotic pet medicine*. 9(1) : 14-26.

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

Jean, T.S. and Panprommin, D. 2014. "Partial nucleotide sequences of *CHD-W* and *CHD-Z* genes for sex identification of Red-whiskered Bulbul (*Pycnonotus jocosus*)." *Thai Journal of Genetics*. 7(2) : 104-109.

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(6) : 561–571.

Kahn, N.W. John, J.S. and Quinn, T.W. 1998. "Chromosome-specific intron size differences in the avian *CHD* gene provide an efficient method for sex identification in birds." *The Auk*. 115(4) : 1074-1078.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Kalendar, R. Antonius, K. Smykal, P. and Schulman, A.H. 2010. "iPBS: a universal method for DNA Wngerprinting and retrotransposonisolation." *Theorem Application Genetic*. 121(8) : 1419-1430.

Kumla, S. Doolgindachbapor, S. Sudmoon, R. and Sattayasai, N. 2012. "Genetic variation population structure and identification of yellow catfish, *Mystus nemurus* (C&V) in Thailand using RAPD, ISSR and SCAR marker." *Molecular Biology Reports*. 39(5) : 5201-5210.

Mehmood, A. Jaskani, M.J. Khan, I.A. Ahmad, S. Ahmad, R. Luo, S. and Ahmad, N.M. 2014. "Genetic Diversity of Pakistani guava (*Psidium guajava*) germplasm and its implications for conservation and breeding." *Scientia Horticulture*. 172 : 221-232.

Sacchi, P. Soglia, D. Maione, S. Meneguz, G. Campora, M. and Rasero, R. 2004. "A non-invasive test for sex identification in Short-toed Eagle (*Circaetus gallicus*)." *Molecular Cell Probes*. 18(3) : 193-196.

Rohlf, F.J. 1998. "On applications of geometrics morphometrics to studies of ontogeny and phylogeny." *Systematic Biology*. 47(1) : 147-158.

Watson, H.K. Mogg, R.J., Bond, J.M., and Durell, S.A. 2004. "Sexing Eurasian Oystercatchers *Haematopus ostralegus* from breast feathers collected when ringing." *Wader study group bulletin*. 105 : 87-89.

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.

Zhang, M. and Bai, X.J. 2013. "Genatic diversity of the Arctic fox using SRAP markers." *Genetics and Molecular Research*. 12(4) : 6176-6183.

[Online]. Available : http://ilovepenguin.exteen.com/20070321/penguin. (9 February 2014)

[Online]. Available : http://www.atriumtech.com.searchdata/Forums (9 February 2014)

[Online]. Available : http://ibc.lynxeds.com/species/styans-bulbul-pycnonotus-taivanu s. (9 February 2014)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

[Online]. Available : http://www.barascientific.com/article/DNA/dna5.php. (10 February 2014)

[Online]. Available : http://issuu.com/vpatjournal/docs/vol21no4/18 (10 February 2014)

[Online]. Available : http://blog.tepapa.govt.nz/tag/avian (11February 2014)

[Online]. Available : http://www.mun.ca/biology/scarr/Birdsexing.html. (11 February 2014)

[Online]. Available : http://en.wikipedia.org/wiki/Light-ventedbulbul (11February 2014)

[Online]. Available : http://piyanun1341.wordpress.com/2013 (11February 2014)

[Online]. Available : http://web.ku.ac.th/schoolnet/snet5/topic8/top8115.html. (11 February 2014)

[Online]. Available : http://www.rmutphysics.com/charud/scibook/bio2/chapter6/evo10.htm (12 February 2014)

[Online]. Available : http://thaibioinfonetwork.blogspot.com/2010/10/highlight.html (12 February 2014)

[Online]. Available : http://www.biotec.or.th/biotechnology-th/newsdetail. (12 February 2014)

[Online]. Available : http://www.vcharkarn.com/varticle/35768 (12 February 2014)

[Online]. Available : http://www.biology.science.cmu.ac.th/lectures/202231/MutationMolec.html (12 February 2014)

[Online]. Available : http://www.dnp.go.th/wildlifednp/ (12 February 2014)

[Online]. Available : http://www.oknation.net/blog/plainswanderer/2013 (12 May 2015)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

ตารางภาคผนวกที่ ก-1 ผลการระบุเพศนกปรอดหัวโขนด้วยไพรเมอร์ P2/P8 จำนวน 77 ตัวอย่าง

จังหวัดพังงา

รหัสห่วงขา	รหัสที่ใช้ในการวิเคราะห์	ผลการวิเคราะห์เพศ
3A29201	BPG01	ผู้
3A29202	BPG02	เมีย
3A29203	BPG03	ผู้
4A06501	BPG04	ผู้
3A29204	BPG05	ผู้
3A29205	BPG06	ระบุไม่ได้
3A29206	BPG07	ผู้
3A29207	BPG08	ผู้
3A29208	BPG09	ผู้
3A29209	BPG10	เมีย
3A29210	BPG11	ผู้
3A29211	BPG12	เมีย
3A29212	BPG13	ผู้
3A29213	BPG14	เมีย
3A29214	BPG15	ผู้
3A29215	BPG16	ผู้
3A29216	BPG17	เมีย
3A29218	BPG19	เมีย
3A29219	BPG20	เมีย
3A29220	BPG21	ผู้
3A29221	BPG22	เมีย
3A29222	BPG23	ผู้
3A29223	BPG24	เมีย
3A29224	BPG25	ผู้
3A29225	BPG26	เมีย
3A29226	BPG27	เมีย
3A29227	BPG28	เมีย
3A29228	BPG29	ผู้
3A29229	BPG30	เมีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก (ต่อ)

รหัสห่วงขา	รหัสที่ใช้ในการวิเคราะห์	ผลการวิเคราะห์เพศ
3A29230	BPG31	ระบุเพศไม่ได้
3A29231	BPG32	ระบุเพศไม่ได้
3A29232	BPG33	ระบุเพศไม่ได้
3A29233	BPG34	ระบุเพศไม่ได้
3A29234	BPG35	ระบุเพศไม่ได้
3A29235	BPG36	ระบุเพศไม่ได้

จังหวัดพัทลุง

รหัสห่วงขา	รหัสที่ใช้ในการวิเคราะห์	ผลการวิเคราะห์เพศ
3A29236	BPL01	เมีย
3A29237	BPL02	ผู้
3A29238	BPL03	เมีย
3A29239	BPL04	เมีย
3A29240	BPL05	เมีย
3A29241	BPL06	เมีย
3A29242	BPL07	เมีย
3A29243	BPL08	เมีย
3A29244	BPL09	ผู้
3A29245	BPL10	เมีย
3A29247	BPL12	เมีย
3A29248	BPL13	เมีย
3A29249	BPL14	ผู้
3A29250	BPL15	ผู้
3A29251	BPL16	เมีย
3A29252	BPL17	เมีย
3A29253	BPL18	เมีย
3A29254	BPL19	เมีย
3A29255	BPL20	เมีย
3A29256	BPL21	เมีย
3A29257	BPL22	ผู้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก (ต่อ)

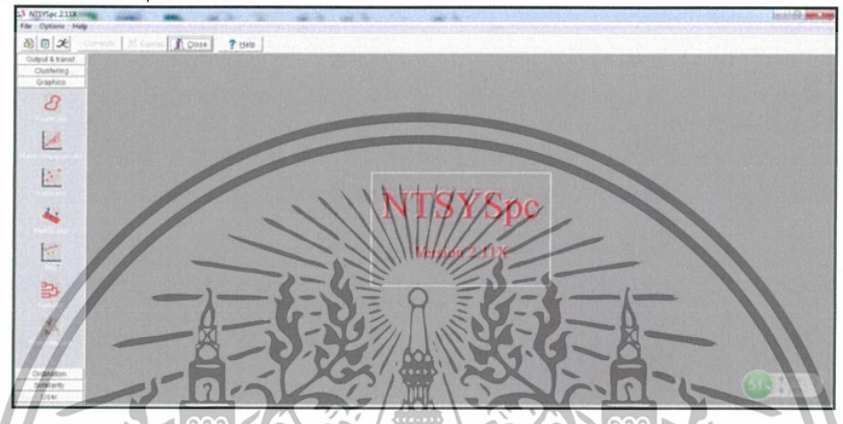
รหัสห่วงขา	รหัสที่ใช้ในการวิเคราะห์	ผลการวิเคราะห์เพศ
3A29258	BPL23	เมีย
3A29259	BPL24	เมีย
3A29261	BPL26	เมีย
3A29262	BPL27	เมีย
3A29263	BPL28	เมีย
3A29264	BPL29	เมีย
3A29265	BPL30	ระบุเพศไม่ได้
3A29266	BPL31	เมีย
3A29267	BPL32	เมีย
3A29268	BPL33	เมีย
3A29269	BPL34	เมีย
3A29270	BPL35	เมีย
3A29271	BPL36	เมีย
3A29272	BPL37	ผู้
3A29273	BPL38	เมีย
3A29274	BPL39	เมีย
3A29275	BPL40	เมีย
3A29276	BPL41	เมีย
3A29277	BPL42	เมีย
3A29278	BPL43	เมีย
3A29279	BPL44	เมีย
3A29280	BPL45	ระบุเพศไม่ได้
3A29281	BPL46	เมีย
3A29282	BPL47	เมีย
3A29283	BPL48	เมีย
3A29284	BPL49	เมีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข
วิธีการใช้โปรแกรม

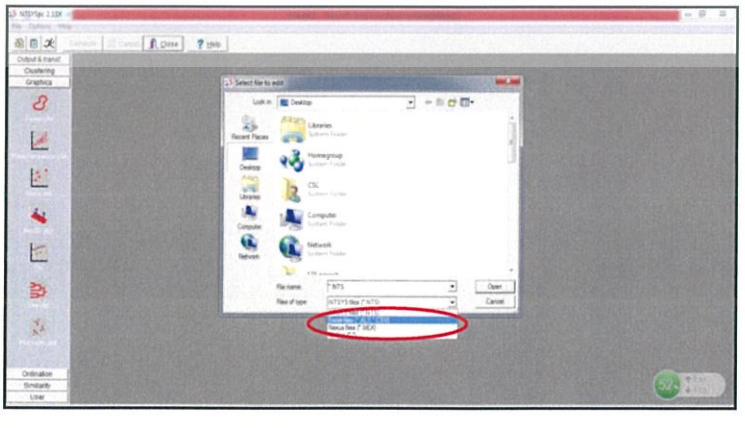
วิธีการใช้งานโปรแกรม NTSYSpc 2.1X โดยเลือกวิธีการจัดแบบ UPGMA เพื่อวิเคราะห์ผลความหลากหลายทางพันธุกรรม

1.เปิดโปรแกรม NTSYSpc 2.1X



2.เปิด File เลือก edit file

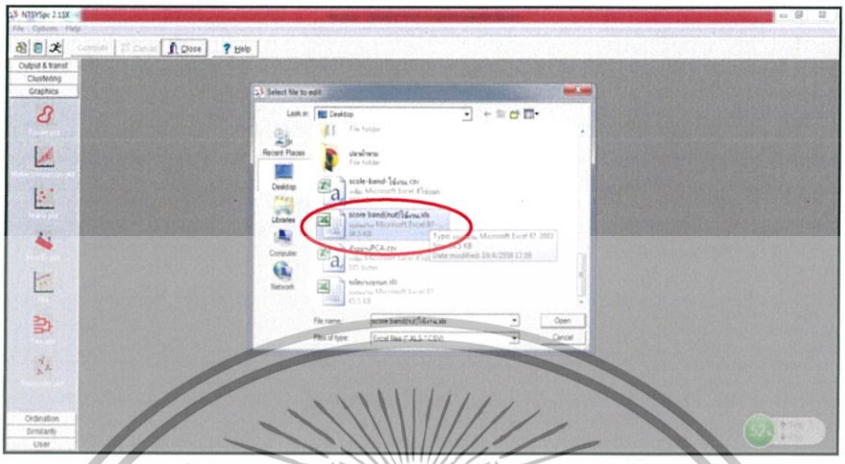
3.เปิดไฟล์ .xls



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

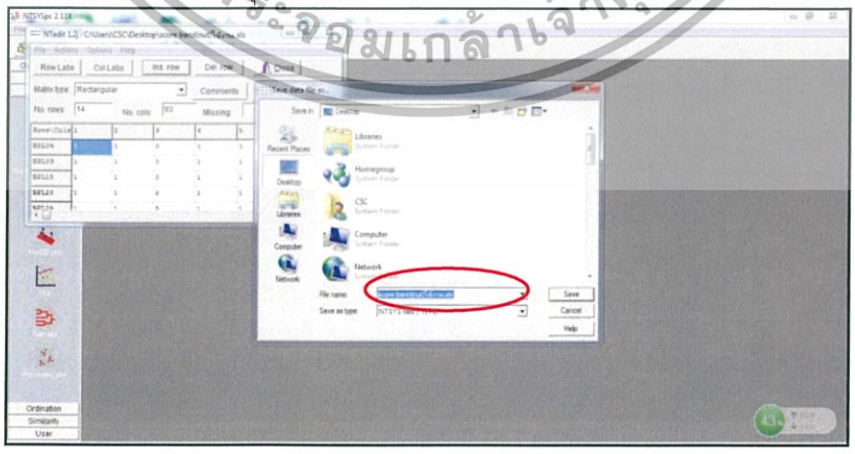
ภาคผนวก ข (ต่อ)

4. เลือกไฟล์ .xls ที่พร้อมใช้งาน



5.แสดงหน้าต่างข้อมูลตัวอย่างดังนี้

6.กด save file as เปลี่ยนนามสกุลเป็น .NTS กด save ปิดตาราง

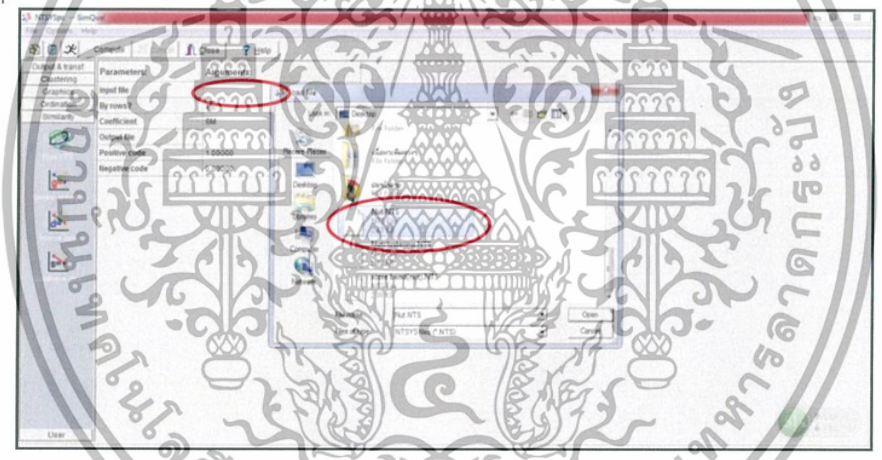


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

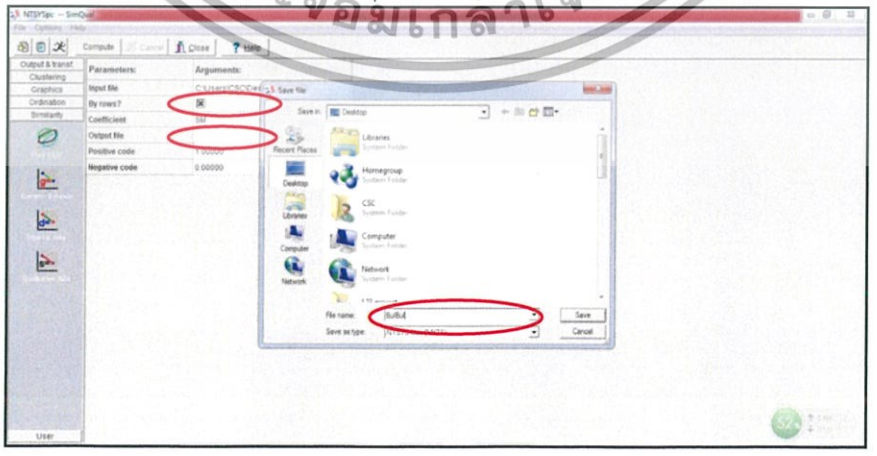
ภาคผนวก ข (ต่อ)

7.เลือก similarity เลือก Qualitative data

8.กด Input file เลือกไฟล์ที่พร้อมใช้งาน .NTS



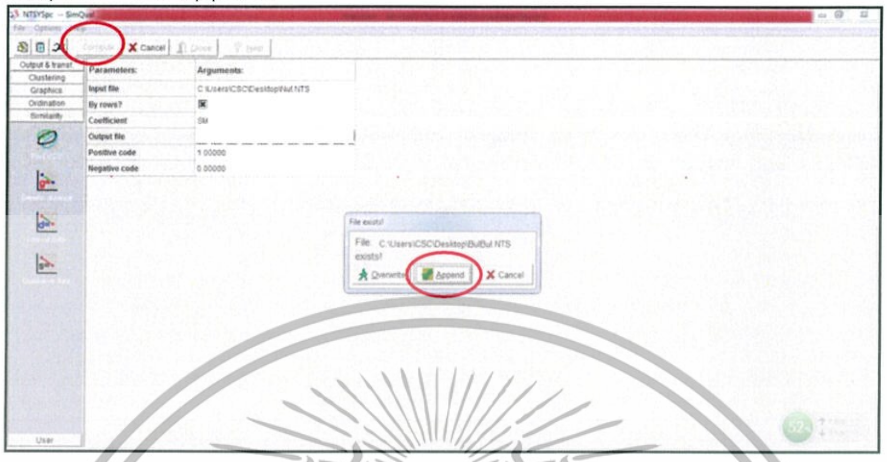
9.กด By rows ? เลือก x จากนั้นเลือก Output file กด save file ตั้งชื่อไฟล์ใหม่



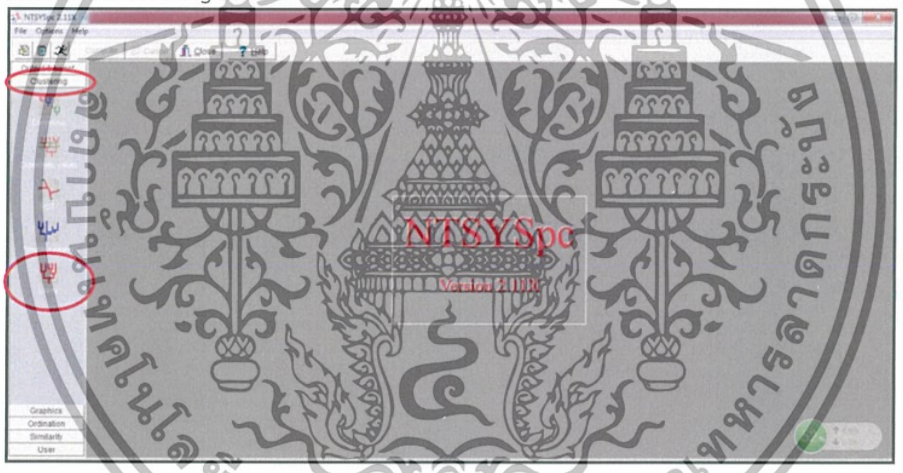
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข (ต่อ)

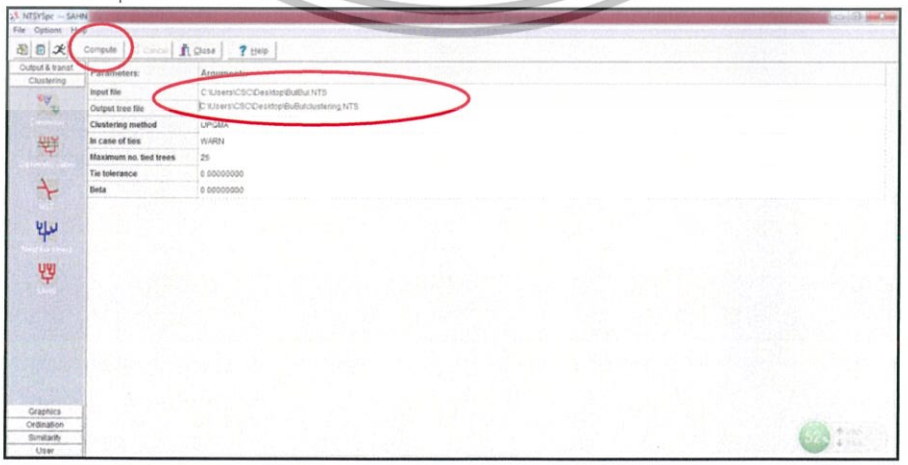
10.กด Compute เลือก Append



11.จากนั้นคลิก Clustering เลือก SAHN



12. กด Input file เลือกไฟล์ .NTS จากนั้น กด Output file save ไฟล์เป็น Clustering .NTS เสร็จแล้วกด Compute

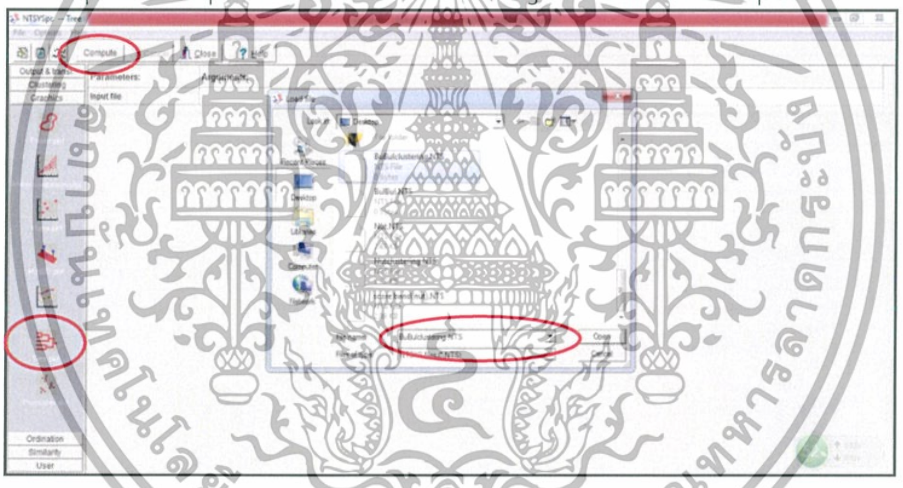


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

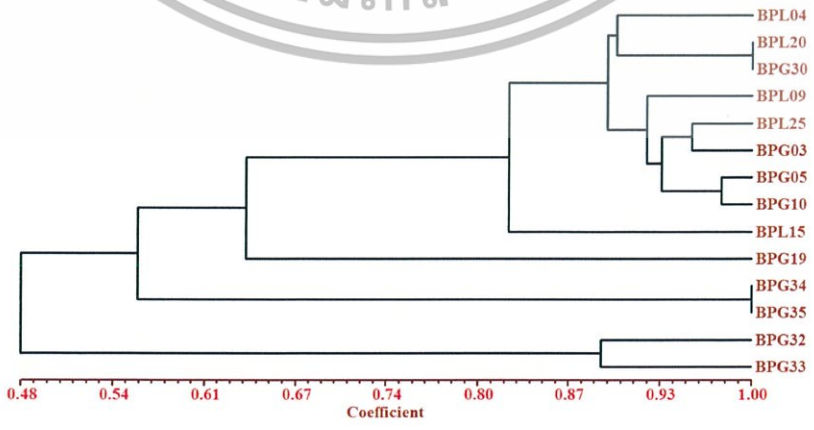
ภาคผนวก ข (ต่อ)

13.จากนั้นสร้าง Tree plot เลือก Graphics

14.เลือก Tree plot กด Input file เปิดไฟล์ที่ Clustering ไว้ จากนั้นกด Compute



15.ได้แผนภาพต้นไม้ดังนี้

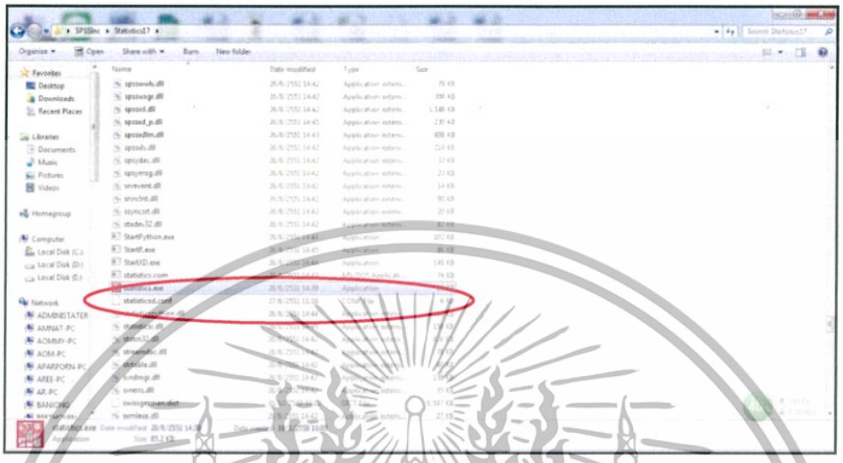


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

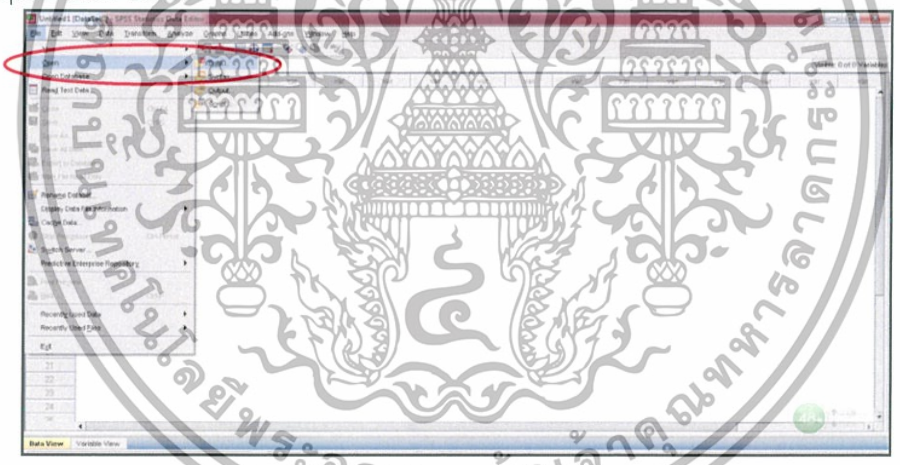
ภาคผนวก ข (ต่อ)

วิธีการใช้งานโปรแกรม SPSSInc เพื่อวิเคราะห์ผลความหลากหลายทางพันธุกรรม

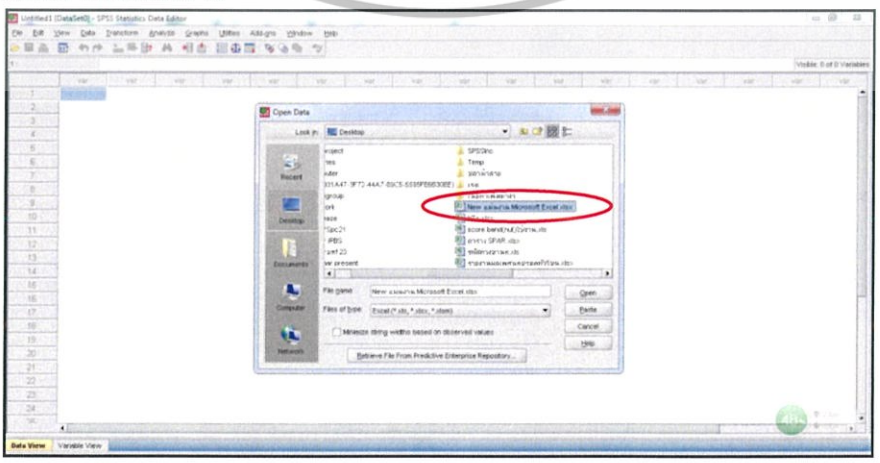
1.เปิดโปรแกรม SPSSInc เลือก Statistics



2.กด Open เลือก Data



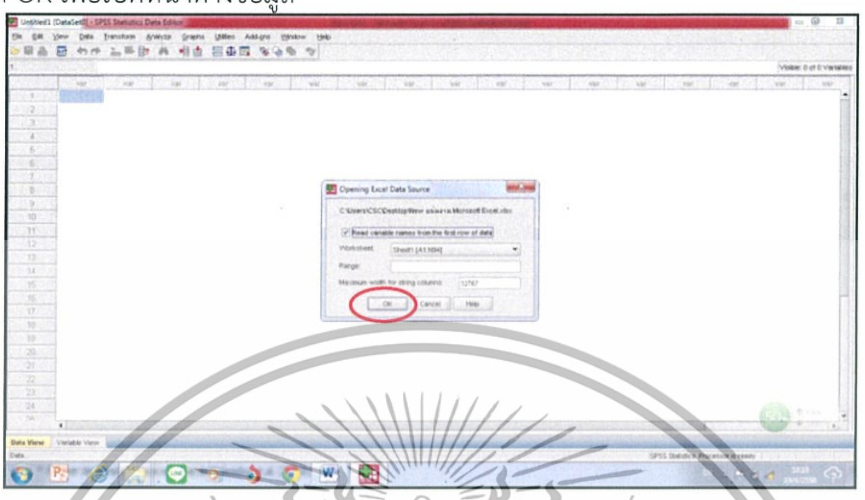
3.เลือกไฟล์.xls ที่พร้อมใช้งาน



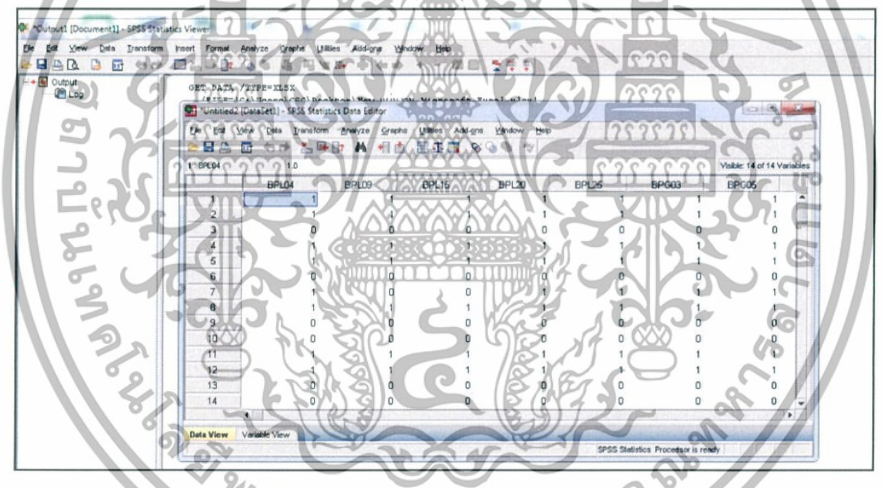
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข (ต่อ)

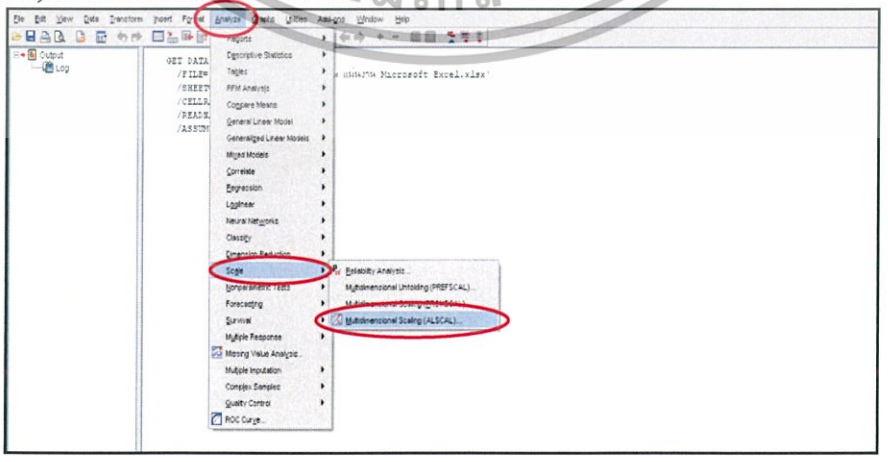
4. แล้วกด OK เพื่อเปิดหน้าต่างข้อมูล



5. แสดงหน้าต่างดังนี้



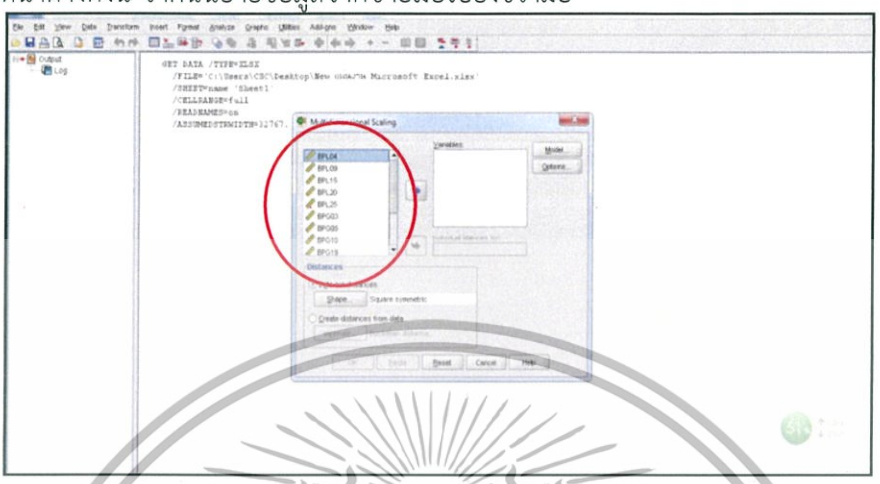
6. กด Analyze เลือก Scale → ALSCAL



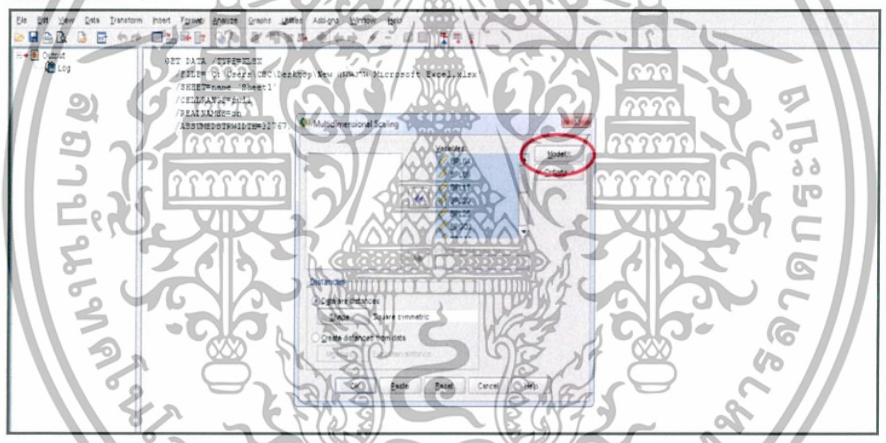
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข (ต่อ)

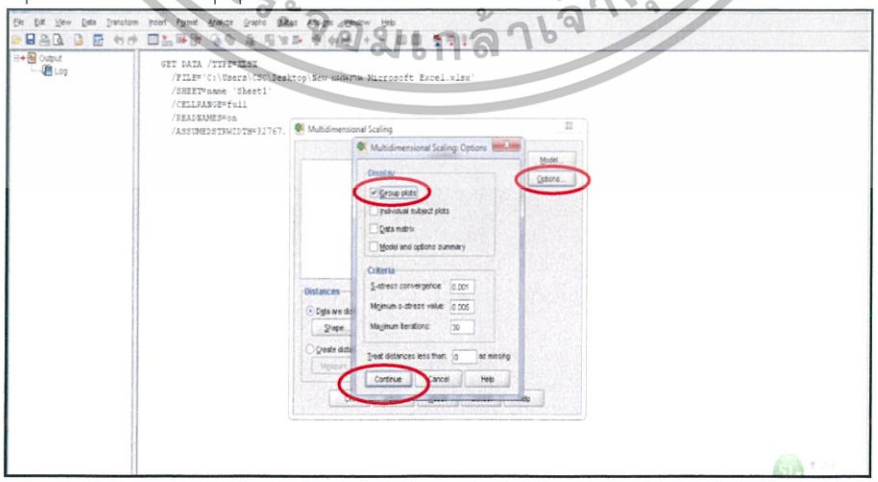
7. แสดงหน้าต่างดังนี้ จากนั้นย้ายข้อมูลจากซ้ายมือไปยังขวามือ



8. กด Model เลือก OK



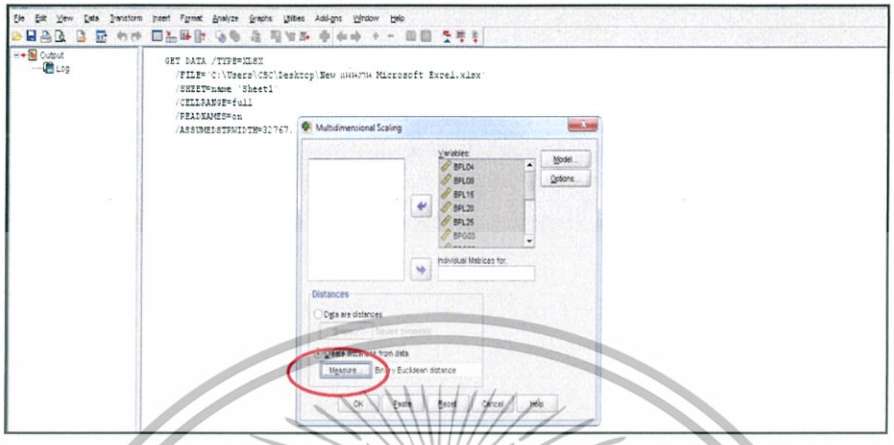
9. เลือก Option คลิก Group plots เลือก Continue



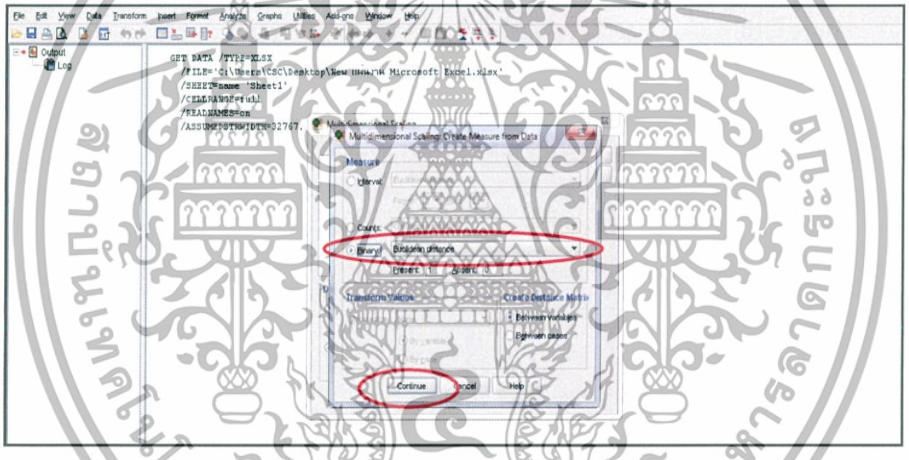
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข (ต่อ)

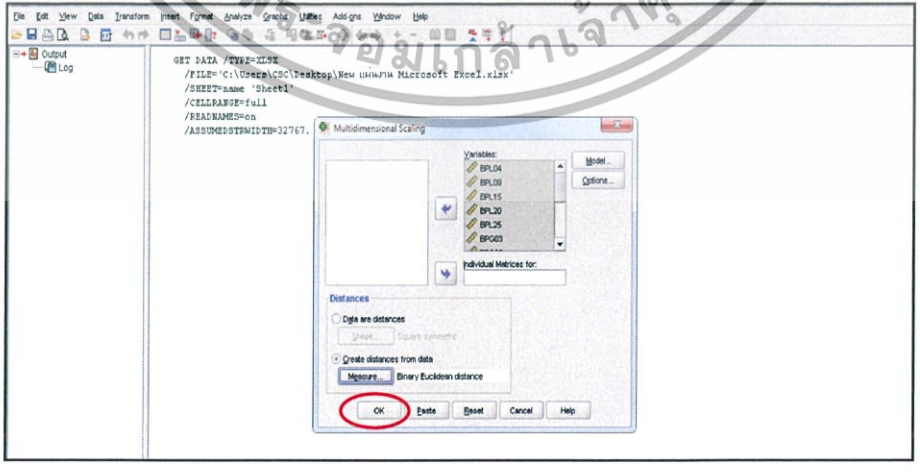
10. แสดงหน้าต่างดังนี้ กด Create distances เลือก Measure



11. แสดงหน้าต่างดังนี้ จากนั้น กด Binary เลือก Continue



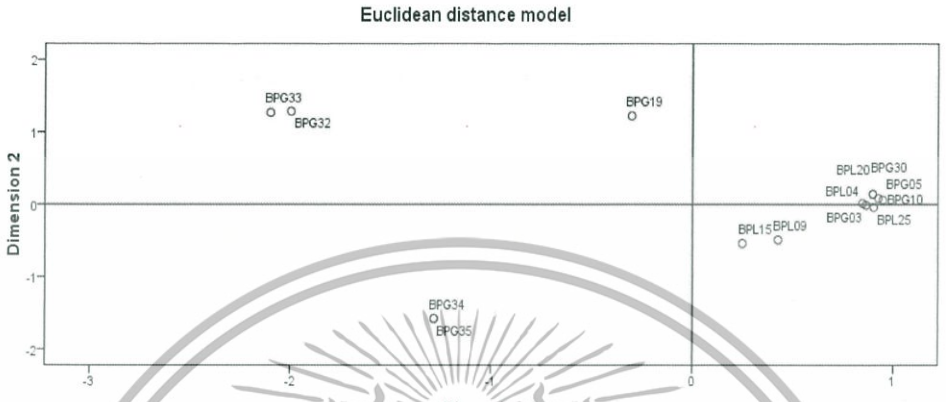
12. จากนั้นกด OK เพื่อแสดงข้อมูล



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข (ต่อ)

13. ได้แผนภาพการกระจาย PCA ดังนี้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

ตารางภาคผนวกที่ ค-1 ค่า similarity coefficient โดยเลือกวิธีการจัดแบบ UPGMA ด้วยโปรแกรม NTSYSpc 2.1X ของนกปรอดจำนวน 14 ตัวอย่าง

	BPL04	BPL09	BPL15	BPL20	BPL25	BPG03	BPG05	BPG10	BPG19	BPG30	BPG32	BPG33	BPG34	BPG35
BPL04	1													
BPL09	0.89	1												
BPL15	0.87	0.85	1											
BPL20	0.9	0.88	0.8	1										
BPL25	0.91	0.91	0.81	0.9	1									
BPG03	0.91	0.94	0.83	0.9	0.96	1								
BPG05	0.9	0.92	0.84	0.89	0.92	0.95	1							
BPG10	0.88	0.92	0.82	0.89	0.95	0.92	0.98	1						
BPG19	0.63	0.61	0.66	0.67	0.61	0.59	0.65	0.65	1					
BPG30	0.9	0.88	0.8	1	0.9	0.9	0.89	0.89	0.67	1				
BPG32	0.47	0.49	0.49	0.46	0.45	0.47	0.46	0.44	0.6	0.46	1			
BPG33	0.45	0.45	0.49	0.44	0.43	0.45	0.42	0.42	0.58	0.44	0.89	1		
BPG34	0.57	0.59	0.61	0.54	0.57	0.57	0.54	0.54	0.53	0.54	0.52	0.49	1	
BPG35	0.57	0.59	0.61	0.54	0.57	0.57	0.54	0.54	0.53	0.54	0.52	0.49	1	1

ภาคผนวก ค (ต่อ)

ตารางภาคผนวกที่ ค-2 ค่า similarity coefficient โดยเลือกวิธีการจัดแบบ UPGMA ด้วยโปรแกรม NTSYSpc 2.1X ของนกปรอดหัวโขนจำนวน 10 ตัวอย่าง

	BPL04	BPL09	BPL015	BPL20	BPL25	BPG03	BPG05	BPG10	BPG19	BPG30
BPL04	1.00									
BPL09	0.89	1.00								
BPL015	0.87	0.85	1.00							
BPL20	0.90	0.88	0.80	1.00						
BPL25	0.91	0.91	0.81	0.90	1.00					
BPG03	0.91	0.94	0.83	0.90	0.96	1.00				
BPG05	0.90	0.92	0.84	0.89	0.92	0.95	1.00			
BPG10	0.88	0.92	0.82	0.89	0.95	0.92	0.98	1.00		
BPG19	0.63	0.61	0.66	0.67	0.61	0.59	0.65	0.65	1.00	
BPG30	0.90	0.88	0.80	1.00	0.90	0.90	0.89	0.89	0.67	1.00

ภาคผนวก ง

1. การเตรียมสารละลาย

1.1 0.5 M EDTA (pH 8.0) ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

- ชั่ง EDTA มา 93.06 กรัม ลงในภาชนะ เติมน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ Megnetic Bar
- ทำการปรับ pH ให้เท่ากับ 8 โดยใช้กรด –ด่าง จากนั้นฆ่าเชื้อโดยใช้ Autoclave อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.2 10X TBE buffer ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

- ชั่ง Tris base มา 10 กรัม และ Boric Acid มา 55 กรัมลงในบีกเกอร์
- ตวง 0.5M EDTA (pH 8.0) มา40 มิลลิลิตร ใส่รวมกับสาร Tris base และ Boric Acid ที่ชั่งมาผสมให้ละลายเข้ากัน
- นำไปปรับปริมาตร โดยเติมน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร และปรับ pH ให้เท่ากับ 8
- นำไปฆ่าเชื้อโดยการใช้ Autoclave อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15นาที
- ถ้าต้องการเตรียม 1X TBE Buffer ต้องดูด 10X TBE Buffer มาปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร

1.3 1MTris-HCl(pH 8.0) ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

- ชั่ง Tris 121 กรัม ลงในบีกเกอร์ ใส่น้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร
- -ปรับ pH ให้เท่ากับ 8.0 ด้วย 1M HCl
- -นำไปฆ่าเชื้อโดยใช้ Autoclave อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15นาที

1.4 10mM TE buffer ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

- -ดูด 1M Tris –HCl (pH 8.0) มาปริมาตร 10 มิลลิลิตร และดูด 0.5 M EDTA (pH = 8.0) มาปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 100 มิลลิลิตร
- นำไปฆ่าเชื้อโดยใช้ Autoclave อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที
- -ถ้าต้องการ 0.1 mM TE Buffer ปริมาตร 40 มิลลิลิตร ต้องดูดสารจาก 10mM TE Buffer ปริมาตร 400 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 40 มิลลิลิตร

2.การเตรียมสารในเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

2.1 20 pmol/µl ไพรเมอร์ P2 และ P8 ปริมาตร 20 ไมโครลิตร

- ดูดไพรเมอร์ P2 ที่มีความเข้มข้น 100 ไมโครโมลต่อลิตร ปริมาตร 4 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วย DI water เป็น 20 ไมโครลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง (ต่อ)

- ดูดไพรเมอร์ P8 ที่มีความเข้มข้น 100 ไมโครโมลต่อลิตร ปริมาตร 4 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วย DI water เป็น 20 ไมโครลิตร

3. การเตรียมอะกาโรสเจล ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (w/v)

- ชั่งอะกาโรส 0.8 กรัม ลงในฟลาสก์ เติม 1X TBE buffer ปริมาตร 40 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน
- นำไปให้ความร้อนเพื่อให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
- เทใส่ถาดสำหรับเตรียมเจลที่มีหวี ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อให้เจลเกิดการแข็งตัว

4. การเตรียมเอธิเดียมโบรไมด์

ดูดเอธิเดียมโบรไมด์ ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร หรือ 500 ไมโครลิตร ลงในภาชนะที่เตรียมไว้ เติม 1X TBE Buffer ปริมาตร 499.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้