



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

เส้นทางบินอพยพและโครงสร้างประชากรของนกนางแอ่นบ้าน
(*Hirundo rustica*): หลักฐานจากเครื่องหมายโมเลกุล

The flyway and population structure in the barn swallow
(*Hirundo rustica*): evidence from molecular markers

ผศ.ดร.สุพัทธา โพธิ์เยี่ยม
นายไกรรัตน์ เอี่ยมอำไพ

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ 2559

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

เส้นทางบินอพยพและโครงสร้างประชากรของนกนางแอ่นบ้าน

(*Hirundo rustica*): หลักฐานจากเครื่องหมายโมเลกุล

The flyway and population structure in the barn swallow

(*Hirundo rustica*): evidence from molecular markers

ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม

นายไกรรัตน์ เอี่ยมอำไพ

๒๐๐๒๖๘๕๑๙

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ ๒๕๕๙

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงการวิจัย (ภาษาไทย)	เส้นทางบินอพยพและโครงสร้างประชากรของนกนางแอ่นบ้าน (<i>Hirundo rustica</i>): หลักฐานจากเครื่องหมายโมเลกุล
(ภาษาอังกฤษ)	The flyway and population structure in the barn swallow (<i>Hirundo rustica</i>): evidence from molecular markers
แหล่งเงิน	เงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ 2559 จำนวนเงิน 200,000 บาท
ระยะเวลาทำการวิจัย	1 ปี ตั้งแต่ 1 ตุลาคม 2558 - 30 กันยายน 2559
ชื่อ-สกุล หัวหน้าโครงการ	ผศ. ดร. สุกตรางู โปธิเอี่ยม ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง E-mail: poeaim@hotmail.com
ชื่อ-สกุล ผู้ร่วมโครงการ	นายไกรรัตน์ เอี่ยมอำไพ นักวิทยาศาสตร์ชำนาญการพิเศษ ทำหน้าที่หัวหน้าสถานีวิจัยสัตว์ป่าบึงบอระเพ็ด กลุ่มงานวิจัยสัตว์ป่า สำนักอนุรักษ์สัตว์ป่า กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช E-mail: eiam_kl@hotmail.com
คำสำคัญ:	การบ่งชี้เพศ, ยีน <i>chromo-helicase-DNA binding</i> (CHD), ความหลากหลายทางพันธุกรรม, นกนางแอ่นบ้าน (<i>Hirundo rustica</i>)
Keywords:	gender identification, <i>chromo-helicase-DNA binding</i> (CHD) gene, genetic diversity, Barn Swallow (<i>Hirundo rustica</i>)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทคัดย่อ

นกนางแอ่นบ้าน (*Hirundo rustica*) เป็นนกที่พบได้ทั่วโลก อพยพมายังประเทศไทยในช่วงฤดูหนาว เพศผู้และเพศเมียมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่คล้ายคลึงกัน และสามารถแบ่งได้เป็น 6 สปีชีส์ย่อย ได้แก่ *Hirundo rustica rustica*, *H. r. gutturalis*, *H. r. tytleri*, *H. r. transitiva*, *H. r. savignii* และ *H. r. erythrogaster* โดยสปีชีส์ย่อยจะสัมพันธ์กับแหล่งที่อยู่หรือทวีปที่นกอาศัยในช่วงฤดูผสมพันธุ์ นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าลักษณะสีขนบริเวณอกแตกต่างกันตามสปีชีส์ย่อยและเพศ ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาโครงสร้างประชากร ทั้งการระบุเพศ สปีชีส์ย่อย ความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกนางแอ่นบ้านในประเทศไทย และเส้นทางการอพยพด้วยเทคนิคทางโมเลกุล โดยเก็บตัวอย่างเลือดและขนผลัดของนกจำนวน 150 ตัว จากอำเภอปัว จังหวัดน่าน และถนนสีลม เขตบางรัก กรุงเทพมหานคร นำมาเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) ตำแหน่งยีน *Chromo-helicase-DNA-binding (CHD)* ด้วยไพรเมอร์ P2/P8 สามารถระบุเพศได้ 147 ตัว โดยแบ่งเป็นเพศผู้จำนวน 73 ตัว และเพศเมียจำนวน 74 ตัว ไม่สามารถระบุเพศได้ 3 ตัว และพบว่าความยาวจุดแต้มขาวบนขนหางคู่บนและความเว้าลึกของขนหางสัมพันธ์กับเพศ ซึ่งให้ความถูกต้องในการระบุเพศมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ และในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งยีน *Nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase subunit (ND2)* และ *Cytochrome b (Cyt-b)* ของตัวอย่างนกนางแอ่นบ้านจำนวน 20 ตัวอย่าง นกนางแอ่นบ้านส่วนใหญ่ คือจำนวน 14 ตัว มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับ *H. r. gutturalis* และ 2 ตัว มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับ *H. r. tytleri* แต่พบ 4 ตัว ไม่มีความสัมพันธ์กับสปีชีส์ย่อยในฐานข้อมูล National center for biotechnology information (NCBI) จึงอาจกล่าวได้ว่ากลุ่มตัวอย่างนกนางแอ่นบ้านที่พบในประเทศไทยมีอย่างน้อย 2 สปีชีส์ย่อย สำหรับการศึกษาลักษณะสีขนบริเวณอกไม่พบความสัมพันธ์กับสปีชีส์ย่อย แต่มีแนวโน้มสัมพันธ์กับเพศ และนกนางแอ่นบ้านในประเทศไทยมีเส้นทางการบินอพยพในรูปแบบเอเชียตะวันออกเฉียง-ออสเตรเลีย (East Asian-Australasian Flyway: EAAF)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ABSTRACT

Barn Swallows (*Hirundo rustica*) can be found around the world and migrate to Thailand in winter. Males and females are similar in their morphology and they were divided into 6 subspecies which are *Hirundo rustica rustica*, *H. r. gutturalis*, *H. r. tytleri*, *H. r. transitiva*, *H. r. savignii* and *H. r. erythrogaster*. These subspecies can be found in their continent in which they live during the breeding season. Moreover, previous report found that different feather color could be found not only in each subspecies but also in different gender. The aims of this study were to identify population structure: gender, subspecies, genetic diversity and the flyway of Barn Swallow in Thailand by molecular technique. Blood and molting feather samples, which amounted to 150 samples, were collected from Pua district, Nan and Silom road, Bangrak district, Bangkok. Afterwards, *Chromo-helicase-DNA-binding (CHD)* region was amplified by polymerase chain reaction (PCR) with P2/P8 primer. The results showed that 147 identified samples were 73 males and 74 females. However, only three samples could not be amplified by PCR. We also found that white spot length on the outer tail and tail fork were related to their gender. They can identify gender of the bird more than 80 % correctly. The genetic diversity in *Nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase subunit (ND2)* and *Cytochrome b (Cyt-b)* regions of 20 samples were analyzed. 14 samples out of the 20 sample were found to be related to *H. r. gutturalis* and 2 samples related to *H. r. tytleri*. However, other 4 samples were found to be unrelated to subspecies of National center for biotechnology information (NCBI) data. At least 2 subspecies of Barn Swallows were found in Thailand. The feather color of the breast is not related to subspecies but it is possibly relate to gender. In Thailand, the East Asian–Australasian Flyway (EAAF) is the migratory pathway of Barn Swallow.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่สนับสนุนทุนวิจัยในส่วนของเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ 2559 และภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่องมือต่างๆ ในการวิจัย

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

สุดท้ายนี้ผู้จัดทำขอขอบพระคุณบิดา มารดา และบุคคลในครอบครัวที่สนับสนุนและให้กำลังใจในการทำวิจัย นางสาวธัญลักษณ์ มาลัยทัศน์ นักศึกษาระดับปริญญาโท และลูกศิษย์ทุกคนที่ร่วมในการวิจัย และทุกท่านที่มีส่วนเกี่ยวข้อง รวมทั้งนกทุกตัวทำให้งานวิจัยนี้เสร็จสมบูรณ์ จึงขอขอบคุณมา ณ ที่นี้



สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม
สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
กิตติกรรมประกาศ.....	ง
สารบัญ.....	จ
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญรูป	ซ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	5
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	5
1.4 คำสำคัญของการวิจัย.....	5
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	6
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	7
2.1 นกนางแอ่น	7
2.1.1 ลักษณะทั่วไปและพฤติกรรมของนกนางแอ่นบ้าน	7
2.1.2 สปีชีส์ย่อยของนกนางแอ่นบ้าน	9
2.2 การสำรวจประชากรนก.....	12
2.3 การระบุเพศนก	14
2.4 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่สัมพันธ์กับเพศนก	19
2.5 การศึกษาความหลากหลายด้วยเครื่องหมายโมเลกุล	21
2.6 การศึกษาความหลากหลายของนกด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์	24
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	28
3.1 อุปกรณ์.....	28
3.2 สารเคมี	29
3.3 วิธีการทดลอง.....	32
3.3.1 การเก็บตัวอย่าง	32
3.3.2 การสกัดดีเอ็นเอ.....	32
3.3.2.1 การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเนื้อเยื่อ.....	32
3.3.2.2 การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือด	33

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.3.3 การทำให้กระดาษ FTA Card บริสุทธิ์.....	34
3.3.4 การระบุเพศด้วยเทคนิคทางโมเลกุล.....	35
3.3.5 การวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางสัณฐานวิทยากับเพศ.....	36
3.3.6 การศึกษาความหลากหลายด้วยเทคนิค iPBS.....	36
3.3.7 การระบุสปีชีส์ย่อยด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์.....	38
3.3.8 การทำให้ผลผลิตพีซีอาร์บริสุทธิ์.....	39
3.3.9 การศึกษาหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากลำดับนิวคลีโอไทด์.....	40
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล.....	41
4.1 ผลการเก็บตัวอย่างนกนางแอ่นบ้าน.....	41
4.2 ผลการระบุเพศด้วยเทคนิคทางโมเลกุล.....	45
4.2.1 สภาวะและไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการระบุเพศนกนางแอ่นบ้าน.....	45
4.2.2 การระบุเพศนกนางแอ่นบ้าน.....	47
4.3 ผลการหาความสัมพันธ์ระหว่างเพศและลักษณะทางสัณฐานวิทยา.....	49
4.4 ผลการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค iPBS.....	53
4.4.1 ผลการหาสภาวะและไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม.....	53
4.4.2 ผลการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกนางแอ่นบ้าน.....	56
4.4.3 การวิเคราะห์ผลความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรม NTSYSpc2.1X.....	58
4.5 ผลการระบุสปีชีส์ย่อยด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์.....	61
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	68
5.1 สรุปผลการวิจัย.....	68
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	69
เอกสารอ้างอิง.....	70
ภาคผนวก.....	80
หนังสือรับรองการใช้ประโยชน์จากงานวิจัยหรืองานสร้างสรรค์.....	90
ผลงานทางวิชาการ.....	91

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
3.1 ชนิดและลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษา	30
3.2 ชนิด ลำดับนิวคลีโอไทด์ ค่า T_m ค่า T_a และการแบ่งกลุ่มของไพรเมอร์ในเทคนิค iPBS ..	30
3.3 ขั้นตอน อุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตำแหน่งยีน <i>CHD</i>	36
3.4 ขั้นตอน อุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในเทคนิค iPBS ..	37
3.5 ขั้นตอน อุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตำแหน่งยีน <i>ND2</i> และ <i>Cyt-b</i>	39
4.1 จำนวนตัวอย่างนกนางแอ่นบ้านที่จับได้.....	42
4.2 จำนวนตัวอย่างนกนางแอ่นบ้านที่ใช้ในการศึกษา.....	42
4.3 รูปแบบการระบุเพศนกจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาของนกนางแอ่นบ้านด้วยโปรแกรม Rapid miner studio.....	52
4.4 จำนวนแถบ อุณหภูมิ annealing และเปอร์เซ็นต์ความหลากหลาย ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษา.....	58
4.5 เปอร์เซ็นต์การเกิด SNPs และรูปแบบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แปรผันในตำแหน่งยีน <i>ND2</i> และ <i>Cyt-b</i> ของนกนางแอ่นบ้านสปีชีส์ย่อย <i>H. r. gutturalis</i> และ <i>H. r. tytleri</i>	64

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 เขตภูมิศาสตร์ของนกนางแอ่นบ้านใน 6 สปีชีส์ย่อยที่พบทั่วโลก	12
2.2 ลักษณะของยีน CHD บนโครโมโซมเพศของนก (ก) นกเพศผู้ (ข) นกเพศเมีย	15
2.3 ความแตกต่างบริเวณอินทรอนของอัลลีล CHD-Z และอัลลีล CHD-W และการแปลผลเพศด้วยวิธีอิเล็กทรอนิกส์: (ก) บริเวณอินทรอนของอัลลีล CHD-Z มีขนาดใหญ่กว่าอัลลีล CHD-W (ข) บริเวณอินทรอนของอัลลีล CHD-W มีขนาดใหญ่กว่าอัลลีล CHD-Z.....	17
2.4 ตำแหน่งของการศึกษาด้วยเครื่องหมายทางโมเลกุล iPBS.....	23
4.1 อุปกรณ์ วิธี Mist net ที่ใช้ในการดักจับนกนางแอ่นบ้าน: (ก) การชิงตาข่ายกับแท่งสแตนเลส (ข) การตั้งตาข่าย (ค) การนำนกออกจากตาข่าย (ง) ถุงพักนก	42
4.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของนกนางแอ่นบ้านตัวเต็มวัย: (ก) สีของลำตัว (ข) หน้าผาก (ค) คอและท้อง (ง) สีขนหางและจุดแต้มขาวบนขนหาง.....	43
4.3 ลักษณะสีขนบริเวณอกนกนางแอ่นบ้าน ซึ่งแบ่งออกเป็น 5 ลักษณะ คือ (ก) ออกส้มเข้ม (ข) ออกส้มปานกลาง (ค) ออกสีส้มอ่อนปลายส่วนล่างสีส้มเข้ม (ง) ออกสีส้มอ่อน (จ) ออกขาว.....	45
4.4 การเปรียบเทียบผลิตภัณฑ์ PCR ของนกนางแอ่นบ้าน (<i>Hirundo rustica</i> : BS19 และ BS29) และไก่ (<i>Gallus gallus</i> : C1 และ C2) ที่เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยไพรเมอร์ P2/P8, 1237L/1272H และ 2550F/2718R.....	46
4.5 การระบุเพศนกนางแอ่นบ้านด้วยไพรเมอร์ P2/P8 โดยใช้อะกาโรสความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ โดย M คือ เพศผู้ และ F คือ เพศเมีย	48
4.6 การวิเคราะห์ Cluster Dendrogram ที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม R x 64 3.4.0 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเพศกับความยาวจุดแต้มขาวบนขนหางคู่บน.....	50
4.7 การวิเคราะห์ Cluster Dendrogram ที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม R x 64 3.4.0 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเพศกับความยาวสีของขนหาง	51
4.8 การวิเคราะห์ Cluster Dendrogram ที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม R x 64 3.4.0 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเพศกับความยาวหน้าแข้ง	51
4.9 คู่มือในการระบุเพศนกนางแอ่นบ้านที่อพยพมายังประเทศไทย	53
4.10 ลักษณะแถบดีเอ็นเอของไพรเมอร์ที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการศึกษาความหลากหลายด้วยเทคนิค iPBS ของนกนางแอ่นบ้าน (ก) ไพรเมอร์ 2230 (ข) ไพรเมอร์ 2231 (ค) ไพรเมอร์ 2238 (ง) ไพรเมอร์ 2242 (จ) ไพรเมอร์ 2256 (ฉ) ไพรเมอร์ 2272 (ช) ไพรเมอร์ 2374 (ช) ไพรเมอร์ 2377 (ฉ) ไพรเมอร์ 2385.....	55

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.11 ตัวอย่างลักษณะแถบดีเอ็นเอของไพรเมอร์ที่นำมาใช้จำนวน 3 ไพรเมอร์ คือ (ก) ไพรเมอร์ 2230 (ข) ไพรเมอร์ 2238 (ค) ไพรเมอร์ 2242 โดยเทียบกับแถบดีเอ็นเอ มาตรฐานขนาด 100 คู่เบส	57
4.12 แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ (Dendrogram) ของนกนางแอ่นบ้านจำนวน 30 ตัวอย่าง จากข้อมูลแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค iPBS	60
4.13 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์และตำแหน่งเกาะของไพรเมอร์ (ก) ตำแหน่งยีน <i>ND2</i> (ข) ตำแหน่งยีน <i>Cyt-b</i> ที่แตกต่างกัน	61
4.14 Phylogenetic tree ของนกนางแอ่นบ้านที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MEGA 6 ด้วยวิธี Maximun-likelihood โดยทำซ้ำ 1000 ครั้ง จากลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งยีน <i>ND2</i> และ <i>Cyt-b</i> เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล GenBank สำหรับหมายเลข ในวงเล็บแสดงสีชนบริเวณอกได้แก่ (1) อกลีส้มเข้ม (2) อกลีส้มปานกลาง (3) อกลีส้มอ่อน ปลายส่วนล่างสีส้มเข้ม (4) อกลีส้มอ่อน และ (5) อกลีขาว	63
4.15 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งยีน <i>Cyt-b</i> ของนกนางแอ่นบ้าน โดยลูกศรชี้ตำแหน่งที่แตกต่างกัน	65
4.16 Phylogenetic tree ของนกนางแอ่นบ้านที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MEGA 6 จากลำดับนิวคลีโอไทด์ (ก) ตำแหน่งยีน <i>Cyt-b</i> และ (ข) ตำแหน่งยีน <i>ND2</i> เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล GenBank.....	66

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของการวิจัย

การอพยพของนกมีความสัมพันธ์กับความสมบูรณ์ของสิ่งแวดล้อม แหล่งอาหาร และความเหมาะสมของแหล่งอาศัยหากิน แต่ในปัจจุบันกิจกรรมต่างๆของมนุษย์มีอิทธิพลอย่างมากต่อการอพยพ เช่นการเปลี่ยนแปลงการเดินสายไฟฟ้าฝังลงใต้ดิน การก่อสร้างและการใช้รถไฟฟ้ามหานคร และการตัดต้นไม้บริเวณเกาะกลางของถนนสี่ลม ส่งผลให้นกนางแอ่นบ้าน (*Barn Swallow: Hirundo rustica* Linnaeus, 1758) ที่อพยพมาอาศัยอยู่บริเวณถนนสี่ลมมีจำนวนลดลงทุกปี แต่อย่างไรก็ตามมีรายงานถึงการหนีหนาวของนกนางแอ่นบ้านมายังจังหวัดน่านเป็นจำนวนมาก ซึ่งกลุ่มงานวิจัยสัตว์ป่า สำนักอนุรักษ์สัตว์ป่า กรมอุทยานแห่งชาติสัตว์ป่าและพันธุ์พืช กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อมได้ดำเนินโครงการเฝ้าระวังโรคในนกธรรมชาติ และการศึกษาเส้นทางของนกอพยพ โดยการดักจับและทำเครื่องหมายด้วยวิธีใส่ห่วงขา บันทึกลักษณะต่างๆของนก และเก็บตัวอย่างเพื่อตรวจหาเชื้ออุบัติใหม่ พร้อมกับการให้ความรู้แก่ประชาชน มาตั้งแต่ปี พ.ศ. 2534 ถึงปัจจุบัน (<http://www.dnp.go.th/wildlifednp>) และเมื่อวันที่ 26 มกราคม พ.ศ. 2558 คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ได้เข้าร่วมกิจกรรมดังกล่าว พร้อมเก็บตัวอย่างของเนื้อเยื่อปอดขน เพื่อศึกษาความหลากหลายของนกนางแอ่นบ้านด้วย

นกนางแอ่น (*Swallow*) อยู่ในอันดับนกจับคอน (order Passeriformes) วงศ์นกนางแอ่น (family Hirundinidae) ที่แบ่งออกเป็น 2 วงศ์ย่อย โดยประเทศไทยพบทั้ง 2 วงศ์ย่อย คือ (1) วงศ์ย่อยนกนางแอ่นแม่น้ำ (subfamily Pseudochelidoninae: River Martins) และ (2) วงศ์ย่อยนกนางแอ่น (subfamily Hirundininae: Martins and Swallows) ทั่วโลกพบจำนวน 13 สกุล แต่ประเทศไทยพบเพียง 5 สกุล คือสกุลนกนางแอ่นทราย (*Riparia* sp.) สกุลนกนางแอ่นลาย (*Cecropis* sp.) สกุลนกนางแอ่นมาร์ติน (*Delichon* sp.) สกุลนกนางแอ่นผาสีคล้ำ (*Ptyonoprogne* sp.) และสกุลนกนางแอ่นบ้าน (*Hirundo* sp.) โดยนกในสกุล *Hirundo* มีจำนวนสปีชีส์มากที่สุด (Dickinson, 2003; Turner, 2004) แต่เนื่องจากนกสกุลนี้มีการเปลี่ยนแปลงด้านสัณฐานวิทยาน้อยมาก จึงมีการศึกษาวิจัยและหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ ทั้งความสัมพันธ์ในระดับสปีชีส์และระดับสปีชีส์ย่อย (species and subspecies levels) โดยศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ในไมโทคอนเดรียและในนิวเคลียส ซึ่ง Sheldon และคณะ (2005) จัดจำแนกนกนางแอ่น (*Swallow*) ในระดับวงศ์ย่อยด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ และแสดงให้เห็นความสัมพันธ์ภายในสกุล *Hirundo* จำนวน 12 สปีชีส์ จากทั้งหมด 14 สปีชีส์ทั่วโลก โดยขาดข้อมูลของ *H. megaensis* และ *H. nigrorufa* ต่อมา Dor และคณะ (2010) ได้ศึกษาหาความสัมพันธ์ของนกในสกุล *Hirundo* จำนวน 14 สปีชีส์ จากสถานที่ต่างๆ ทั่วโลก ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ในยีน *nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาค้นคว้าเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

subunit2 (ND2) และ *cytochrome b (Cyt-b)* แต่อย่างไรก็ตามในการศึกษาครั้งนี้ไม่มีการเก็บตัวอย่างจากประเทศไทย

นกนางแอ่นบ้าน (*Hirundo rustica*: Barn Swallow) เป็นนกอพยพขนาดเล็ก ที่สามารถจับแมลงกินในอากาศ และเป็นนกอีกชนิดหนึ่งที่ทั้งนักวิทยาศาสตร์และประชาชนทั่วไปนิยมนำมาศึกษา เนื่องจากเป็นตัวอย่างของการศึกษาในเรื่องวิวัฒนาการและพฤติกรรม เช่น พฤติกรรมการเลือกคู่ พฤติกรรมการผสมพันธุ์ และการอพยพและย้ายถิ่น รวมทั้งเป็นนกที่อาศัยอยู่ใกล้ชิดกับมนุษย์ โดยพบเห็นการทำรังได้ทั่วไปทั้งโรงนา สะพาน และอาคารบ้านเรือน (Turner, 2006) รวมทั้งมีความหลากหลายทางพันธุกรรม โดย Dickinson และ Dekker (2001) ได้รวบรวมการรายงานถึงการแบ่งนกนางแอ่นบ้านในระดับสปีชีส์ย่อยในยูเรเชีย (Eurasia) โดยแบ่งตามแหล่งที่พบและลักษณะภายนอก สามารถแบ่งนกนางแอ่นบ้านได้ 3 สปีชีส์ย่อย คือ *H. r. rustica* ที่พบในยุโรปและรัสเซีย ตะวันตก *H. r. tytleri* ที่พบในทะเลสาบไบคาลของรัสเซียและมองโกเลีย และ *H. r. gutturalis* ที่พบในรัสเซียตะวันออก จีน เกาหลี และญี่ปุ่น หรืออาจกล่าวได้ว่าสปีชีส์ย่อย *H. r. rustica* และ *H. r. tytleri* พบมากในทวีปเอเชีย และมีข้อแตกต่างของลักษณะภายนอกอย่างชัดเจน และจัดให้นกนางแอ่นบ้านที่นอกเหนือจากทั้งสองสปีชีส์ย่อยเป็น *H. r. gutturalis* แต่อย่างไรก็ตามในโลกตะวันออกมีการรายงานที่แตกต่างออกไป โดยมีรายงานว่านกนางแอ่นบ้านที่พบในอเมริกาคือ *H. r. erythrogaster* ที่มีปีกที่สั้นกว่า มีหางแฉกลี้น้อยกว่า และมีรายงานเพิ่มเติมถึง 3 สปีชีส์ย่อย คือ *saturata*, *kamtschatica* และ *mandshurica* ซึ่งเป็นลักษณะชื่อพ้องของ *gutturalis* แต่อย่างไรก็ตามในช่วงการอพยพจะมีการผลัดขนซึ่งจะมีความผันแปรของสีขนอย่างมาก ทำให้มีความยากลำบากในการบ่งชี้ถึงระดับสปีชีส์ย่อย และในปัจจุบันเมื่อพิจารณาจากแหล่งที่อยู่สามารถแบ่งนกออกเป็น 6 สปีชีส์ย่อย (Dickinson และ Dekker, 2001; Dickinson, 2003) คือ (1) *H. r. rustica* ที่อาศัยอยู่ในทวีปยุโรป ทวีปแอฟริกา และเอเชียตะวันตก (2) *H. r. gutturalis* พบบริเวณตอนใต้และตะวันออกของทวีปเอเชีย (ด้านตะวันออกของเทือกเขาหิมาลัยถึงประเทศญี่ปุ่นและประเทศพม่า และภาคตะวันออกเฉียงเหนือของรัสเซีย) (3) *H. r. tytleri* พบได้ในบริเวณภาคตะวันออกเฉียงเหนือของทวีปเอเชีย (ตอนกลางของไซบีเรีย และภาคเหนือของมองโกเลีย) (4) *H. r. transitiva* พบในบริเวณภาคตะวันออกเฉียงเหนือของทะเลเมดิเตอร์เรเนียน (อิสราเอล เลบานอน จอร์แดน และซีเรีย) (5) *H. r. savignii* พบได้ทั่วไปตามแม่น้ำไนล์ในประเทศอียิปต์ และ (6) *H. r. erythrogaster* ที่พบได้ในโลกใหม่ คือในทวีปอเมริกาเหนือ รวมทั้งในประเทศอาร์เจนตินา นอกจากแหล่งที่พบแล้วในการบ่งบอกระดับสปีชีส์ย่อยนี้มีความแตกต่างกันทางลักษณะทางสัณฐานวิทยา เช่น ขนาดของตัว สัณฐานท้อง ขอบเขตของเส้นบริเวณหน้าอก ความยาวของหาง รวมทั้งรูปแบบของการอพยพและย้ายถิ่น (Turner, 2004, 2006) และพฤติกรรมการส่งสัญญาณในการเลือกคู่ (Safran และ McGraw, 2004; Safran และคณะ, 2005) อย่างไรก็ตามเมื่อ Dor และคณะ (2010) ได้นำตัวอย่างของนกนางแอ่นบ้าน (*H. rustica*) จำนวน 29 ตัวอย่าง ครอบคลุมทั้ง 6 สปีชีส์ย่อยดังที่กล่าวมาแล้ว มาศึกษามาหาความสัมพันธ์ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ในยีน *ND2* และ *Cyt-b* สามารถแบ่งออกตามพื้นที่ คือ European-Middle

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้นำไปใช้จะเขียนตามการคัด

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Eastern clade และ Asian-American clade โดย (1) กลุ่ม European-Middle Eastern ที่มีแถบ
 ขนาคาบบริเวณอกกว้างและชัดเจน ประกอบด้วย 3 สปีชีส์ย่อย คือ *H. r. rustica* ที่พบกระจายอยู่
 ทั่วไปในยุโรป และเอเชียกลาง สำหรับอีก 2 สปีชีส์ย่อยพบกระจายในตะวันออกกลาง โดย *H. r.*
savignii พบในประเทศอียิปต์ และ *H. r. transitiva* พบด้านตะวันออกของทะเลเมดิเตอร์เรเนียน
 และ (2) กลุ่ม Asian-American ซึ่งมีขนาคาบบริเวณอกแคบกว่าและไม่ชัดเจน โดยกลุ่มนี้สามารถแบ่ง
 ออกเป็น 2 กลุ่มย่อยอย่างชัดเจน โดยกลุ่มย่อยที่ 1 คือ *H. r. gutturalis* จากเอเชียตะวันออก และ
 กลุ่มย่อยที่ 2 ประกอบด้วย 2 สปีชีส์ย่อย คือ *H. r. erythrogaster* ที่พบในทวีปอเมริกา และ *H. r.*
tytleri จากเอเชียตะวันตกเฉียงเหนือ โดย 2 สปีชีส์ย่อยนี้ใกล้ชิดกันเนื่องจากการอพยพระหว่างทวีป
 อเมริกาเหนือมายังเอเชีย และยังพบว่าสปีชีส์ย่อยของแระเทศอาร์เจนตินาเป็น *H. r. erythrogaster*
 เช่นเดียวกับที่พบในทวีปอเมริกาเหนือ

โดยสถานภาพของนกนางแอ่นบ้านในประเทศไทยเป็นนกที่อพยพมายังประเทศไทยช่วงนอกฤดู
 ผสมพันธุ์หรือในฤดูหนาว เป็นนกที่พบได้บ่อยและปริมาณมาก ประเทศไทยมีเพียงการรายงานพบ
 3 สปีชีส์ย่อย คือ *H. r. tytleri* พบในภาคตะวันออกเฉียงใต้ และภาคกลาง *H. r. mandshurica* พบ
 ในภาคเหนือ และ *H. r. gutturalis* พบทั่วทุกภาคของประเทศ (โอบาส ขอบเขตต์, 2544) แม้ว่านก
 นางแอ่นบ้านเป็นนกที่พบได้โดยทั่วไป และมีลักษณะภายนอกที่แตกต่างกันในแต่ละสปีชีส์ย่อย
 (Safran, 2010) แต่อย่างไรก็ตามลักษณะสีขนและความยาวของหางขึ้นกับอายุและเพศ (Lifield และ
 คณะ, 2011) และนิยมศึกษาในช่วงฤดูการผสมพันธุ์ในแถบซีกโลกเหนือ มีเพียงการรายงานถึง
 ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่าง *H. r. erythrogaster* และ *H. r. transitiva* เปรียบเทียบระหว่าง
 ฤดูการผสมพันธุ์และอพยพในประเทศอังกฤษและประเทศในตะวันออกกลาง (Dor และคณะ, 2012)
 แต่ยังไม่มีการรายงานความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกนางแอ่นบ้านที่สุ่มเก็บตัวอย่างจาก
 ประเทศไทย รวมทั้งยังไม่มีรายงานการศึกษาในระดับสปีชีส์ย่อยของนกนางแอ่นบ้านในประเทศไทย
 ทั้งศึกษาจากลักษณะภายนอกและ/หรือระดับโมเลกุล จึงควรมีการศึกษาทั้งการระบุสปีชีส์ย่อยของ
 นกนางแอ่นบ้านด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ เพื่อนำไปเปรียบเทียบกับพื้นที่ต่างๆทั่วโลก และการศึกษา
 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) เพื่อประโยชน์ในการทราบความหลากหลายของนกนางแอ่น
 บ้านที่อพยพเข้ามาในประเทศไทย จะเป็นประโยชน์ทางด้านฐานข้อมูลทางพันธุกรรมและโครงสร้าง
 ประชากรของนกนางแอ่นบ้าน การสำรวจประชากรนกอพยพที่เข้ามาตามแหล่งพื้นที่ต่างๆทั่วประเทศ
 นำมาเป็นดัชนีชี้วัดความหลากหลายของนกอพยพ ความอุดมสมบูรณ์ของพื้นที่บริเวณต่างๆที่นก
 อพยพเข้ามาอาศัย เป็นประโยชน์ในการวางแผนทางการควบคุม ดูแล และลดการคุกคามต่อนก
 นอกจากนี้ยังอาจทำให้ทราบเส้นทางการอพยพของนกนางแอ่นบ้านในประเทศไทย ส่งเสริมและ
 พัฒนาความร่วมมือระหว่างประเทศเกี่ยวกับจัดทำแผนความร่วมมือระหว่างประเทศ เพื่อการอนุรักษ์
 และการคุ้มครองนกอพยพระหว่างประเทศที่อยู่ในเส้นทางอพยพของนก ทั้งประโยชน์ด้านพฤติกรรม
 และนิเวศวิทยาและการติดตามโรคระบาดที่มากับนกธรรมชาติ รวมทั้งการค้นพบสายพันธุ์ย่อยใหม่อีก

ด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การจำแนกเพศของสิ่งมีชีวิตเป็นลักษณะหนึ่งที่เป็นในการศึกษาทางนิเวศวิทยาและโครงสร้างประชากร การศึกษาข้อแตกต่างระหว่างเพศทั้งในเรื่องพฤติกรรม นิเวศวิทยา และวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต นกนางแอ่นบ้านเป็นนกชนิดหนึ่งที่มีรายงานถึงข้อแตกต่างระหว่างเพศผู้และเพศเมีย เช่น ความยาวของหาง (tail length) โดยเฉพาะการนำความยาวของขนหางคู่นอกสุด (outermost tail feather) มาใช้ในการบ่งชี้เพศ โดยเพศผู้จะมีความยาวของหางคู่นอกสุดมากกว่า 112 มิลลิเมตร และเพศเมียมีความยาวน้อยกว่า 93 มิลลิเมตร (Svensson, 1992; Møller, 1994) โดยในเพศผู้ทั้งของ american barn swallows (*H. r. erythrogaster*) และ european barn swallows (*H. r. rustica*) จะมีความยาวมากกว่าเพศเมีย (Smith และ Montgomerie, 1991) ซึ่งความยาวหางดังกล่าวสัมพันธ์กับอัตราความสำเร็จในการผสมพันธุ์อีกด้วย (Saino และคณะ, 1997; Kleven และคณะ, 2006) การประเมินการเว้าลึกของหาง (tail fork depth) โดยจะมีการเว้าลึกของหางในตัวเต็มวัยเพศผู้ (> 58 มิลลิเมตร) มากกว่าตัวเต็มวัยเพศเมีย (<51 มิลลิเมตร) (Svensson, 1992) การบ่งชี้เพศจากการวิเคราะห์ในหลายตัวแปร เช่น น้ำหนักตัว ความยาวหน้าแข้ง ความยาวหาง รวมทั้งระดับความเข้มข้นของอัลบูมิน (albumin concentration) และความเข้มข้นของเม็ดเลือด (hematocrit) (Saino และคณะ, 2002) ความยาวของขนหางคู่นอกสุด ความยาวของขนหางคู่ในสุด และความยาวของกระดูกอก (Hermosell และคณะ, 2007) แต่อย่างไรก็ตามในการบ่งชี้เพศอาจเกิดการผิดพลาดได้เมื่อนกมีการผลัดขนหรือขนเสียหายจากการบินอพยพ โดยเฉพาะในช่วงนอกฤดูผสมพันธุ์หรือฤดูอพยพ ทำให้ค่าความยาวของหางและ/หรือการเว้าลึกของหางมีข้อจำกัดและไม่น่าเชื่อถือ (Rubolini และ Schiavi, 2002; Robson และ Barriocanal, 2008) นอกจากนั้นแล้วมีรายงานถึงค่าเฉลี่ยของพื้นที่จุดสีขาวของขนหางทั้งห้า เพื่อใช้บอกข้อแตกต่างระหว่างเพศผู้และเพศเมีย (Cramp และ Brooks, 1988; Møller และคณะ, 1995; Kose และ Møller, 1999) แต่อย่างไรก็ตามวิธีการนี้ทำได้ยากในการนำมาใช้ในการบ่งชี้เพศในภาคสนาม เนื่องจากต้องใช้เวลาในการวัดพื้นที่ทั้งหมดของจุดสีขาวบริเวณหาง ซึ่งอาจทำให้นกเกิดความเครียดมากขึ้นและนกอาจได้รับบาดเจ็บ ดังนั้นเพื่อความสะดวกในการนำมาใช้ได้จริงในภาคสนาม และใช้กับนกที่อยู่นอกฤดูผสมพันธุ์จึงใช้ความยาวของจุดสีขาวเฉพาะหางคู่นอกสุดในการบ่งชี้เพศ โดยเพศเมียจะมีความยาวน้อยกว่า 17.5 มิลลิเมตร และเพศผู้จะมีความยาวมากกว่า 29.5 มิลลิเมตร และเมื่อใช้ความยาวของจุดสีขาวร่วมกับความยาวหาง และการเว้าลึกของหาง สามารถระบุเพศได้ถูกต้องมากขึ้น (Duijns และคณะ, 2011) ดังนั้นจึงควรมีข้อมูลของลักษณะภายนอกที่สามารถนำมาใช้ในการระบุเพศในภาคสนาม จึงมีแนวทางในการศึกษาหาความสัมพันธ์ของลักษณะภายนอกที่สามารถใช้ได้จริงในภาคสนามกับเพศ โดยการยืนยันเพศนกจะอาศัยเทคนิคทางโมเลกุลที่เป็นเทคนิคที่มีความรวดเร็วและถูกต้องแม่นยำสูง ซึ่งเทคนิคทางโมเลกุลที่นิยมนำมาใช้ในการระบุเพศนกนั้นเกิดขึ้นหลังการค้นพบยีน *chromo-helicase-DNA binding (CHD) บนโครโมโซม W* (Griffiths และ Tiwari, 1995) และโครโมโซม Z (Griffiths และ Korn, 1997) เนื่องจากนกมีลักษณะของโครโมโซมเพศแตกต่างจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โดยนกเพศเมียมีโครโมโซมเพศที่แตกต่างกัน (heterogametic sex: ZW) ในขณะที่นกเพศผู้มีโครโมโซมเพศที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่หรือใช้ในการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เหมือนกัน (homogametic sex: ZZ) ร่วมกับหลักการที่มีความแตกต่างของความยาวบริเวณ intron ของยีน *CHD* ระหว่างโครโมโซม Z (*CHD-Z*) กับโครโมโซม W (*CHD-W*) (Griffiths และ Tiwari, 1995; Ellegren, 1996; Griffiths และ Korn, 1997) โดยการศึกษาเพศในนกนางแอ่นบ้านด้วยเทคนิคทางโมเลกุลนิยมนำมาบ่งชี้เพศเพื่อหาความสัมพันธ์ของลักษณะภายนอก (Saino และคณะ, 2002) การสร้างรังของเพศผู้หรือเมีย (Boncoraglio และคณะ, 2008) ดังนั้นการระบุเพศและศึกษาอัตราส่วนระหว่างเพศเป็นแนวทางในการประเมินประชากรและโครงสร้างประชากรของนกนางแอ่นบ้าน ซึ่งจะเป็นข้อมูลและประโยชน์ในการติดตามการเปลี่ยนแปลงประชากรนก อัตราส่วนของเพศ พฤติกรรมการผสมพันธุ์ นิเวศวิทยา และการอนุรักษ์ จึงสนใจศึกษาหาความสัมพันธ์ของลักษณะภายนอกกับเพศ ที่สามารถนำไปใช้ในการระบุเพศได้จริงในภาคสนามต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกนางแอ่นบ้าน (*Hirundo rustica*) ในประเทศไทยด้วยเครื่องหมายโมเลกุล

1.2.2 วิเคราะห์เส้นทางบินอพยพ และจำแนกสปีชีส์ย่อยของนกนางแอ่นบ้าน (*H. rustica*) ในประเทศไทยด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์

1.2.3 บ่งชี้เพศนกนางแอ่นบ้าน (*H. rustica*) ด้วยเทคนิคระดับโมเลกุล

1.3 ขอบเขตการวิจัย

โครงการวิจัยนี้จะเก็บตัวอย่างนกนางแอ่นบ้าน บริเวณหน้าอาคารซีพีทาวเวอร์ ถนนสีลม กรุงเทพมหานคร และเทศบาลตำบลปัว อำเภอปัว จังหวัดน่าน เนื่องจากเป็นแหล่งที่นกอพยพมาอาศัยเป็นจำนวนมาก ซึ่งการเก็บตัวอย่างอยู่ภายใต้การทำงานของผู้เชี่ยวชาญ และเจ้าหน้าที่ในโครงการการศึกษาเส้นทางอพยพของนกโดยการติดเครื่องหมายติดตามตัวสัตว์ และเฝ้าระวังโรคอุบัติใหม่ โดยสถานีวิจัยสัตว์ป่าบึงกระพืด กลุ่มงานวิจัยสัตว์ป่า สำนักอนุรักษ์สัตว์ป่า กรมอุทยานแห่งชาติสัตว์ป่า และพันธุ์พืช และในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกในประเทศไทยด้วยเครื่องหมายโมเลกุลชนิด inter-Primer Binding Site (iPBS) และวิเคราะห์เส้นทางบินอพยพ และจำแนกสปีชีส์ย่อยของนกด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์อย่างน้อย 1 ตำแหน่ง คือ ยีน *nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase subunit 2 (ND2)* หรือ *cytochrome b (Cyt-b)* และบ่งชี้เพศนกโดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของยีน *CHD*

1.4 คำสำคัญของการวิจัย

การบ่งชี้เพศ (gender identification) ยีน *chromo-helicase-DNA binding (CHD)* (*chromo-helicase-DNA binding (CHD)* gene) ความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) นกนางแอ่นบ้าน (*Hirundo rustica*: Barn Swallow)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

หากงานวิจัยนี้ประสบผลสำเร็จหน่วยงานต่างๆ และกรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพันธุ์พืช มีข้อมูลการศึกษาอัตราส่วนระหว่างเพศ เพื่อใช้เป็นแนวทางในการประเมินประชากรของนกนางแอ่นบ้าน ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการวางแผนและบริหารจัดการนกนางแอ่นบ้านในประเทศไทย ทราบความหลากหลายของประชากรนก ระบุสปีชีส์ย่อยของนกนางแอ่นบ้าน รวมทั้งทราบเส้นทางการอพยพของนกนางแอ่นบ้าน เนื่องจากยังไม่มีรายงานการเก็บตัวอย่างจากประเทศไทยและเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เพื่อใช้เป็นข้อมูลการติดตามโรคอุบัติใหม่ที่อาจมากับนกในธรรมชาติ และส่งเสริมและพัฒนาความร่วมมือระหว่างประเทศเกี่ยวกับจัดทำแผนความร่วมมือระหว่างประเทศในการอนุรักษ์และการคุ้มครองนกอพยพระหว่างประเทศที่อยู่ในเส้นทางอพยพของนก ประโยชน์ด้านพฤติกรรมและนิเวศวิทยา รวมทั้งโครงสร้างประชากรนก



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 นกนางแอ่น

นกนางแอ่น (Swallow) เป็นสัตว์ป่าคุ้มครองตามพระราชบัญญัติสงวนและคุ้มครองสัตว์ป่า ปี 2535 โดยจัดอยู่ในอันดับนกจับคอน (order Passeriformes) วงศ์นกนางแอ่น (family Hirundinidae) โดยนกในวงศ์นี้มีการปรับตัวเพื่อหาอาหารในอากาศ เช่น มีลำตัวเรียวยาวเพื่อความสะดวกตัว ปีกแหลมยาวและปากสั้น กว้าง ขาเหมาะสำหรับเกาะมากกว่าจะใช้เดิน ทั่วโลกแบ่งออกเป็น 2 วงศ์ย่อย จำนวน 14 สกุล ประเทศไทยพบทั้ง 2 วงศ์ย่อย คือ (1) วงศ์ย่อยนกนางแอ่นแม่น้ำ (subfamily Pseudochelidoninae: River Martins) และ (2) วงศ์ย่อยนกนางแอ่น (subfamily Hirundininae: Martins and Swallows) โดยวงศ์ย่อยนกนางแอ่นแม่น้ำมีลักษณะปากเป็นรูปสามเหลี่ยมและวงใบตาดชัดเจน ขนหางคู่กลางมีแกนขนยื่นยาวออกไป โดยทั่วโลกมีเพียง 2 สปีชีส์ คือนกนางแอ่นแม่น้ำแอฟริกา (*Pseudochelidon eurystomina*) ที่พบในลุ่มน้ำคองโกในทวีปแอฟริกา และนกเจ้าฟ้าหญิงสิรินธรหรือนกตาพอง (*P. sirintarae*: White-eyed River Martin) ที่พบเฉพาะในบริเวณบึงบอระเพ็ด จังหวัดนครสวรรค์ ซึ่งปัจจุบันจัดนกเจ้าฟ้าหญิงสิรินธรเป็นสัตว์ป่าที่ใกล้จะสูญพันธุ์อย่างยิ่ง (Humphrey และ Bain, 1990) และวงศ์ย่อยนกนางแอ่นมีลักษณะของวงศ์ย่อยไม่แตกต่างจากลักษณะของวงศ์ ทั่วโลกพบจำนวน 13 สกุล แต่ในประเทศไทยพบจำนวน 5 สกุล คือ สกุลนกนางแอ่นทราย (*Riparia* sp.) สกุลนกนางแอ่นลาย (*Cecropis* sp.) สกุลนกนางแอ่นมาร์ติน (*Delichon* sp.) สกุลนกนางแอ่นผาสีคล้ำ (*Ptyonoprogne* sp.) ที่ในบางรายงานรวมอยู่ในสกุลนกนางแอ่นบ้าน และสกุลนกนางแอ่นบ้าน (*Hirundo* sp.) (Humphrey and Bain, 1990) โดยวงศ์ย่อยนกนางแอ่นมีความหลากหลายมากถึง 82 สปีชีส์ และพบในประเทศไทยอย่างน้อย 12 สปีชีส์ ที่มีสถานะทั้งนกอพยพ และประจำถิ่น ได้แก่ในสกุล *Riparia* เช่น นกนางแอ่นทรายสร้อยคอดำ (*Riparia riparia*) และนกนางแอ่นทรายสีน้ำตาล (*R. paludicola*) สกุล *Cecropis* เช่น นกนางแอ่นตะโพกแดง (*Cecropis daurica*) นกนางแอ่นลาย (*C. striolata*) และนกนางแอ่นท้องแดง (*C. badia*) สกุล *Delichon* เช่น นกนางแอ่นมาร์ตินพันธุ์ไซบีเรีย (*Delichon urbica*) นกนางแอ่นมาร์ตินพันธุ์เอเชียใต้ (*D. dasypus*) นกนางแอ่นมาร์ตินพันธุ์เนปาล (*D. nipalensis*) ที่เป็นนกอพยพและหายาก สกุล *Ptyonoprogne* เช่นนกนางแอ่นผาสีคล้ำ (*Ptyonoprogne concolor*) รวมทั้งนกในสกุล *Hirundo* เช่น นกนางแอ่นหางลวด (*Hirundo smithii*) นกนางแอ่นแปซิฟิก (*H. tahitica*) และนกนางแอ่นบ้าน (*H. rustica*)

2.1.1 ลักษณะทั่วไปและพฤติกรรมของนกนางแอ่นบ้าน

นกนางแอ่นบ้าน (Barn swallow: *Hirundo rustica*) เป็นนกอพยพมายังประเทศไทยในช่วงฤดูหนาว และบางส่วนเป็นนกประจำถิ่น (สมิทธิ, 2547) ซึ่งงานวิจัยของ โอภาส (2542) เอกสารนี้เป็นเอกสารที่กรมอนุรักษ์ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อมได้ดำเนินการวิจัยเกี่ยวกับนกนางแอ่นบ้านในประเทศไทย ซึ่งงานวิจัยของ โอภาส (2542) ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อ้างอิง Hodgson (1836) กล่าวว่านกชนิดนี้มีลักษณะใกล้เคียงกับนกในอันดับ Apodiformes วงศ์ Apodidae เช่น นกแอ่นบ้าน (House Swift) นกแอ่นกินรัง (German's Swiftlet) และนกแอ่นตาล (Asian Palm Swift) เป็นต้น โดยนกเหล่านี้เป็นนกประจำถิ่น แต่มีสกุลที่ต่างกับนกนางแอ่นบ้าน (Barn Swallow) ที่เป็นนกอพยพ

นกนางแอ่นบ้านเป็นนกอพยพขนาดเล็ก (15 เซนติเมตร) ที่สามารถจับแมลงกินในอากาศ ขนหางคู่บนอาจยาว 5 เซนติเมตรหรือมากกว่า ในขณะที่บินจะเห็นหางสีขาวทั้งด้านบนและด้านล่าง ตัวเต็มวัยด้านบนลำตัวสีน้ำตาลเงินเข้ม ออกมีลายพาดสีเช่นเดียวกับลำตัว คอหอยและหน้าผากสีน้ำตาลเหลือง หางเว้าลึกโดยขนหางคู่บนจะมีขนาดยาวมาก ขนหางแต่ละเส้นยกเว้นคู่ในสุดมีจุดสีขาว ลำตัวด้านล่างรวมทั้งใต้ปีกสีขาวจนถึงสีน้ำตาลเหลือง (รุ่งโรจน์, 2553) ตัวไม่เต็มวัยด้านบนลำตัวสีจะเป็นมันน้อยกว่า และมีลายแต้มสีออกน้ำตาล ลายแถบที่อกเป็นสีน้ำตาลเข้ม ขนหางคู่บนไม่ยาวมากนัก นกนางแอ่นบ้านพบได้ทั่วไปในทุกแหล่งที่อยู่อาศัย ทั้งโล่ง แหล่งน้ำทั่วไป และในเมือง ตั้งแต่พื้นราบจนกระทั่งความสูง 2,000 เมตรจากระดับน้ำทะเล (โอบาส, 2544) บางครั้งอาจพบเป็นฝูงใหญ่ และมักเกาะพักตามสายไฟฟ้าหรือปลายกิ่งไม้ (สมิทธิ, 2547) นกนางแอ่นบ้านเป็นนกอพยพชนิดแรกของฤดูกาลอพยพที่บินหนีหนาวมาจากประเทศในแถบซีกโลกเหนือและจะเพิ่มมากขึ้นเมื่อเข้าสู่ฤดูหนาว และเป็นนกอีกชนิดหนึ่งที่ทั้งนักวิทยาศาสตร์และประชาชนทั่วไปนิยมนำมาศึกษา (Turner, 2006) เนื่องจากเป็นตัวอย่างของการศึกษาในเรื่องวิวัฒนาการและพฤติกรรม เช่น พฤติกรรมการเลือกคู่ พฤติกรรมการผสมพันธุ์ และการอพยพและย้ายถิ่น รวมทั้งเป็นสปีชีส์ที่มีการกระจายตัวทั่วไป และมีพฤติกรรมที่อาศัยอยู่ใกล้ชิดกับมนุษย์ โดยพบเห็นการทำรังได้ทั่วไปทั้งโรงนา สะพาน และอาคารบ้านเรือน และเนื่องจากกินแมลงเป็นอาหารทำให้เป็นประโยชน์สำหรับมนุษย์ นอกจากนี้แล้วยังเกี่ยวข้องกับความสำเร็จในหลายประเทศ รวมทั้งเป็นนกประจำชาติของประเทศออสเตรเลียและเอสโตเนียอีกด้วย (Turner, 2006) นอกจากนี้แล้วยังใช้นกนางแอ่นบ้านเป็นตัวบ่งชี้ทางนิเวศ (ecological indicator) ดังเช่นกรณีพบว่านกนางแอ่นบ้านมีลักษณะสีขนภายนอกเปลี่ยนไปหลังการได้รับรังสี โดยพบขนสีขาวกระจายเป็นหย่อมๆ บริเวณใต้คาง ซึ่งการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวมีผลเสียต่อก่อน เช่นความสามารถในการเลือกคู่ จับคู่ลดลงในช่วงฤดูผสมพันธุ์ การวางไข่ มีผลต่อจำนวนประชากร (<http://www.the-scientist.com/news/>)

Boncoraglio และคณะ (2008) กล่าวถึงพฤติกรรมการเลี้ยงดูลูกของนกนางแอ่นบ้าน โดยลูกนกเพศผู้จะได้รับอาหารและการดูแลจากพ่อแม่มากกว่าลูกนกเพศเมีย เนื่องจากลูกนกเพศผู้จะมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่โดดเด่น คือ มีลักษณะต่างๆที่สมบูรณ์ ทำให้ได้รับการเลี้ยงดูเป็นพิเศษจากพ่อแม่ หรือนกนางแอ่นบ้านบางคู่มีจำนวนลูกนกเพศผู้ในรังน้อยกว่าลูกนกเพศเมีย จึงทำให้พ่อแม่ดูแลลูกนกเพศผู้มากกว่าลูกนกเพศเมีย ด้วยเหตุนี้จึงทำให้เพศผู้มีขนาดใหญ่กว่าเพศเมีย ทั้งยังทำให้อัตราการรอดชีวิตของเพศผู้มากกว่าเพศเมีย เพราะลักษณะทั่วไปของสิ่งมีชีวิตที่มีขนาดใหญ่กว่าจะแข็งแรงและมีพลังกำลังมากกว่าสิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก ทำให้มีอัตราการรอดชีวิตในการอพยพได้มากกว่าเพศเมีย จึงกล่าวได้ว่าเพศผู้มีอัตราส่วนมากกว่าเพศเมีย แต่มีงานวิจัยของ Saino และคณะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาค้นคว้าเท่านั้น ไม่นิยมนำไปเผยแพร่
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(1999) กล่าวถึงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของลูกนกเพศเมียที่มีความสมบูรณ์เช่นเดียวกับลูกนกเพศผู้ จะได้รับการเลี้ยงดูพิเศษจากพ่อแม่เช่นกัน

นกนางแอ่นบ้านจะทำรังเกือบตลอดทั้งปี ตามสิ่งก่อสร้างหรือหน้าผา โดยใช้ ส่วนประกอบหลักเป็นดินโคลนผสมกับวัสดุอื่นๆ เช่น ขนนก ใบหญ้า หรืออุจจาระของมัน ซึ่งรังจะมี ลักษณะคล้ายถ้วย (รุ่งโรจน์, 2542) นกนางแอ่นบ้านจะผสมพันธุ์กันอย่างน้อยปีละ 2 ครั้ง และช่วยกันทำรัง พร้อมทั้งช่วยกันฟักไข่และเลี้ยงลูกในรังจนกว่าลูกนกจะบินออกจากรังได้ นกชนิดนี้มี นิสัยครองคู่เดียว และจะจับคู่กันไปตลอดชีวิต ถ้าหากตัวใดตายก่อน ตัวที่ยังมีชีวิตอยู่ก็จะไปจับคู่ใหม่ และครองคู่กันไปตลอดชีวิต ดังนั้นนกนางแอ่นบ้านน่าจะมีอัตราส่วนของเพศผู้ต่อเพศเมียใกล้เคียงกัน (Kleven และคณะ, 2006) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Saino และคณะ, (2002) ที่พบว่าลักษณะทาง สัณฐานวิทยา การวางไข่ และลำดับการฟักไข่ของลูกนกไม่มีความสัมพันธ์กับอัตราส่วนของเพศลูกนก แต่พบว่าเพศผู้และเพศเมียจะแบ่งกันเลี้ยงลูกในอัตราส่วนที่เท่ากัน ทั้งนี้จำนวนของลูกนกจะขึ้นอยู่กับ ขนาดของรังที่เพศผู้และเพศเมียใช้ฟักไข่ และสำหรับเพศเมียที่มีอายุมากขึ้นจะมีจำนวนลูกนกที่ น้อยลงในการเลี้ยงดู นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการผสมพันธุ์ของนกนางแอ่นบ้าน (*H. r. gutturalis*) โดยเก็บตัวอย่างจากคู่ผสมพันธุ์จำนวน 18 คู่ ในตอนใต้ของประเทศจีน พบการผสมพันธุ์ในพื้นที่เขตร้อนช่วงเดือนเมษายนถึงเดือนกรกฎาคม ใน 1 รังจะประกอบไปด้วยลูกนกประมาณ 2-5 ตัว และพ่อแม่ นกมักจะมีน้ำหนักรังที่น้อย อีกทั้งการฟักไข่ยังขึ้นกับอุณหภูมิอีกด้วย (Pagani-Nunez และคณะ, 2016)

2.1.2 สปีชีส์ย่อยของนกนางแอ่นบ้าน

สปีชีส์ย่อย หมายถึง กลุ่มประชากรที่มีลักษณะสำคัญเหมือนกัน กลุ่มประชากรนี้จะ ครอบครองที่อยู่อาศัยแตกต่างกันไป จึงทำให้เกิดสปีชีส์ย่อยตามเขตภูมิศาสตร์ (Geographical subspecies) หรือสปีชีส์ย่อยทางนิเวศวิทยา (Ecological subspecies) โดยนกในสกุล *Hirundo* มี จำนวนสปีชีส์มากที่สุดและจัดอยู่ในนกที่ทำรังจากโคลน (mud-nesting) เช่นเดียวกับสกุล *Ptyonoprogne* สกุล *Delichon* และสกุล *Cecropis* (Dickinson, 2003; Turner, 2004) แต่ เนื่องจากนกสกุลนี้มีการเปลี่ยนแปลงด้านสัณฐานวิทยาน้อยมาก จึงมีการศึกษาวิจัยและหา ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ โดยเฉพาะการศึกษาเครื่องหมายโมเลกุล (molecular markers) ทั้ง ความสัมพันธ์ในระดับสปีชีส์และระดับสปีชีส์ย่อย โดยศึกษาทั้งลำดับนิวคลีโอไทด์ในไมโทคอนเดรีย และในนิวเคลียส (Sheldon และ Winkler, 1993; Sheldon และคณะ, 2005) ซึ่ง Sheldon และ คณะ (2005) ศึกษาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ยืนยันการแบ่งนกนางแอ่น (Swallow) เป็น 2 กลุ่มใหญ่ ซึ่งเทียบได้ในระดับวงศ์ย่อย คือกลุ่มนกนางแอ่นแม่น้ำ (River Martins: *Pseudochelidoninae*) และกลุ่มนกนางแอ่นบ้าน (Typical Swallows: *Hirundininae*) โดยกลุ่มนกนางแอ่นบ้านนี้ยังแบ่ง ออกเป็น 3 กลุ่ม คือกลุ่มที่ 1 กลุ่มที่ทำรังจากโคลนที่สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อย คือ (1.1) กลุ่ม ย่อยสกุลนกนางแอ่นบ้าน (Barn Swallows: *Hirundo* sp.) และสกุลนกนางแอ่นผาสีคล้ำ (*crag martins: Ptyonoprogne*) โดยนกสองสกุลนี้ใกล้ชิดกัน สอดคล้องกับการให้ชื่อวิทยาศาสตร์ที่มีทั้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาค้นคว้าเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่หรือใช้
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Hirundo concolor และ *Ptyonoprogne concolor* และ (1.2) กลุ่มย่อยสกุลนางแอ่นตะโพกแดง (Red-rumped Swallows: *Cecropis* sp.), Cliff Swallows (*Petrochelidon* sp.) และนกนางแอ่นมาติน (House Martins: *Delichon* sp.) กลุ่มที่ 2 กลุ่ม Core Martins ที่ประกอบด้วยสกุล *Phedina*, Sand Martins (*Riparia* sp.) และกลุ่มที่ 3 Basal Relicts ที่ประกอบด้วย Australian white-backed Swallow (*Cheramoeca* sp.), African grey-rumped Swallow (*Pseudhirundo* sp.) และ African saw-wings (*Psaldiprocne* sp.) และยังคงแสดงให้เห็นความสัมพันธ์ภายในสกุล *Hirundo* จำนวน 12 สปีชีส์ แต่อย่างไรก็ตามยังขาดข้อมูลของนกสกุลนี้อีก 2 สปีชีส์ คือ *H. megaensis* และ *H. nigrorufa*

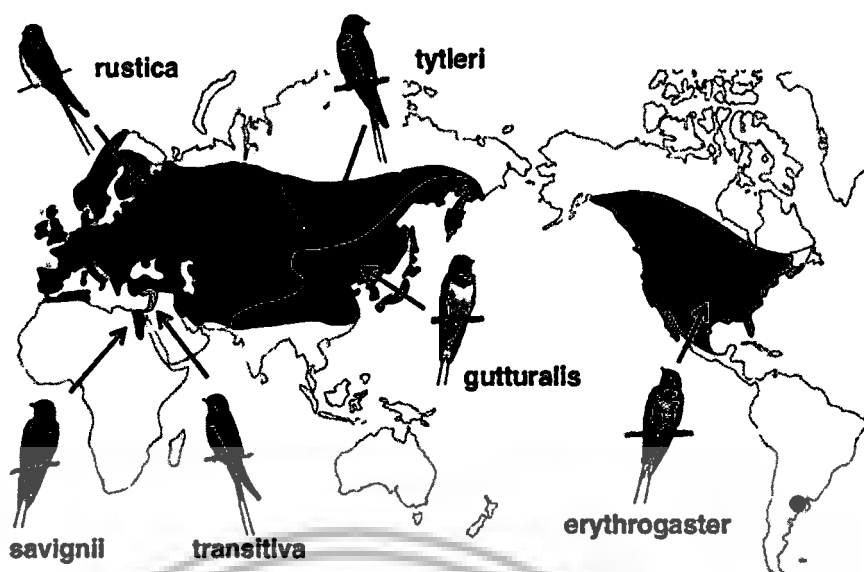
ต่อมา Dor และคณะ (2010) ศึกษาเปรียบเทียบหาความสัมพันธ์ในนกสกุล *Hirundo* จำนวน 14 สปีชีส์ จากสถานที่ต่างๆทั่วโลก (ไม่มีรายงานการเก็บตัวอย่างจากประเทศไทย) โดยมี *H. megaensis* และ *H. nigrorufa* ที่ไม่ได้ศึกษาโดย Sheldon และคณะ (2005) รวมอยู่ด้วย ร่วมกับ *Ptyonoprogne fuligula* (Rock Martin), *Petrochelidon fulva* (Cave Swallow) และ *Tachycineta bicolor* (Tree Swallow) โดยศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ในไมโทคอนเดรีย 6 ตำแหน่ง คือ nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase subunit 2 (ND2), cytochrome b (Cyt-b), cytochrome c oxidase subunit I (COI), cytochrome c oxidase subunit 2 (COII), ATPases 6 และ ATPases 8 และในนิวเคลียส 1 ตำแหน่ง คือ b-fibrinogen intron 7 (bfib-7) เมื่อนำทั้ง 14 สปีชีส์มาหาความสัมพันธ์ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ในยีน ND2 และ Cyt-b พบว่าแบ่งออกเป็น 4 กลุ่มใหญ่ คือกลุ่มที่ 1 นกนางแอ่นบ้าน (Barn Swallow clade) ที่มีจำนวนสปีชีส์มากที่สุดถึง 7 สปีชีส์ ได้แก่ Barn Swallow (*H. rustica rustica*), Angolan Swallow (*H. angolensis*), Red-chested Swallow (*H. lucida*), Ethiopian Swallow (*H. aethiopica*), White-throated Blue Swallow (*H. nigrita*), Wire-tailed Swallow (*H. smithii*) และ White-throated Swallow (*H. albigularis*) และกลุ่มที่ 2 นกนางแอ่นแปซิฟิก (Pacific Swallow clade) ที่มีเพียง 2 สปีชีส์ ได้แก่ Pacific Swallow (*H. tahitica*) และ Welcome Swallow (*H. neoxena*) โดยกลุ่มนกนางแอ่นบ้านมีความใกล้ชิดกับกลุ่มนกนางแอ่นแปซิฟิกมาก สอดคล้องกับรายงานของ Sheldon และคณะ (2005) ซึ่งมีแนวโน้มที่จะรวมกลุ่มกัน สำหรับกลุ่มที่ 3 Pearl-breasted Swallow clade มีจำนวน 3 สปีชีส์ ได้แก่ Pearl-breasted Swallow (*H. dimidiata*), White-tailed Swallow (*H. megaensis*) และ Pied-winged Swallow (*H. leucosoma*) โดย *H. megaensis* เป็นนกประจำถิ่นในแถบเอเชียที่แสดงความใกล้ชิดกับ *H. dimidiata* แต่มีข้อแตกต่างของสีที่ปลายหางเท่านั้น และกลุ่มที่ 4 Blue Swallow clade มีจำนวน 2 สปีชีส์ ที่แสดงความใกล้ชิดกันและมีลักษณะภายนอกที่เหมือนกัน คือ Blue Swallow (*H. atrocaerulea*) และ Black-and-rufous Swallow (*H. nigrorufa*) โดยในประเทศไทยนกในสกุล *Hirundo* มีรายงานเพียง 3 สปีชีส์ คือนกนางแอ่นหางลวด (Wire-tailed Swallow: *H. smithii*) ที่มีการกระจายใน

ภาคเหนือ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ นกนางแอ่นแปซิฟิก (Pacific Swallow: *H. tahitica*) ที่มีเอกสารเป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นับญาติให้นำไปใช้ประโยชน์ทางการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การกระจายอยู่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคใต้ และนกนางแอ่นบ้าน (Barn Swallow: *H. rustica*) ที่สามารถพบได้ในทุกภาค (โอภาส, 2544)

Dickinson และ Dekker (2001) รายงานถึงการแบ่งนกนางแอ่นบ้านในระดับสปีชีส์ย่อยในทวีปเอเชีย ซึ่งแบ่งตามแหล่งที่พบและลักษณะภายนอก โดยสามารถแบ่งนกนางแอ่นบ้านในยูเรเชีย (Eurasia) ได้ 3 สปีชีส์ย่อย คือ *H. r. rustica* ที่พบในยุโรปและรัสเซียตะวันตก *H. r. tytleri* ที่พบในทะเลสาบไบคาลของรัสเซียและมองโกเลีย และ *H. r. gutturalis* ที่พบในรัสเซียตะวันออก จีน เกาหลี และญี่ปุ่น โดย *H. r. rustica* และ *H. r. tytleri* พบมากในทวีปเอเชีย และมีข้อแตกต่างอย่างชัดเจน และจัดให้นกนางแอ่นบ้านที่มีลักษณะนอกเหนือจากทั้งสองสปีชีส์ย่อยเป็น *H. r. gutturalis* แต่อย่างไรก็ตามในโลกตะวันออกมีรายงานว่านกนางแอ่นบ้านที่พบในอเมริกาเป็นชนิด *H. r. erythrogaster* ที่มีปีกสั้นกว่าและมีหางแคบสั้นน้อยกว่า และมีรายงานเพิ่มเติมอีก 3 สปีชีส์ย่อย คือ *saturata*, *kamtschatica* และ *mandschurica* เป็นลักษณะชื่อพ้องของ *gutturalis* และในช่วงการอพยพจะมีการผลัดขนซึ่งจะมีความผันแปรของสีขนอย่างมาก จึงมีความยากลำบากในการบ่งชี้ถึงระดับสปีชีส์ย่อย แต่อย่างไรก็ตามปัจจุบันเมื่อพิจารณาจากแหล่งที่อยู่สามารถแบ่งออกเป็น 6 สปีชีส์ย่อยในแถบซีกโลกเหนือ (Dickinson และ Dekker, 2001; Dickinson, 2003; Tuner 2004) แต่จะมีเพียง 4 สปีชีส์ย่อยเท่านั้นที่อพยพมายังแถบซีกโลกใต้ โดยสามารถพบได้ไกลถึงตอนกลางของอาร์เจนตินา ตอนใต้ของแอฟริกา และตอนเหนือของออสเตรเลียในช่วงฤดูหนาว ดังนี้ (1) *H. r. rustica* ที่อาศัยอยู่ในทวีปยุโรป ทวีปแอฟริกา และเอเชียตะวันตก (2) *H. r. gutturalis* พบบริเวณตอนใต้และตะวันออกของทวีปเอเชีย (ด้านตะวันออกของเทือกเขาหิมาลัยถึงประเทศญี่ปุ่น และประเทศพม่า และภาคตะวันออกเฉียงเหนือของรัสเซีย) (3) *H. r. tytleri* พบได้ในบริเวณภาคตะวันตกเฉียงเหนือของทวีปเอเชีย (ตอนกลางของไซบีเรีย และภาคเหนือของมองโกเลีย) (4) *H. r. transitiva* พบได้ทั่วไปบริเวณภาคตะวันออกของทะเลเมดิเตอร์เรเนียน (อิสราเอล เลบานอน จอร์แดน และซีเรีย) (5) *H. r. savignii* พบได้ทั่วไปตามลุ่มแม่น้ำไนล์ในประเทศอียิปต์ และ (6) *H. r. erythrogaster* ที่พบได้ในโลกใหม่ คือทวีปอเมริกาเหนือ รวมทั้งในประเทศอาร์เจนตินา ดังรูปที่ 2.1 ซึ่งในระดับสปีชีส์ย่อยนี้มีความแตกต่างกันทางลักษณะทางสัณฐานวิทยา เช่น ขนาดของตัว สปีบริเวณท้อง ขอบเขตของเส้นบริเวณหน้าอก ความยาวของหาง รวมทั้งรูปแบบของการอพยพและย้ายถิ่น (Turner, 2004; 2006) และพฤติกรรมการส่งสัญญาณในการเลือกคู่ (Safran และ McGraw, 2004; Safran และคณะ, 2005)



รูปที่ 2.1 เขตภูมิศาสตร์ของนกนางแอ่นบ้านใน 6 สปีชีส์ย่อยที่พบทั่วโลก
(ที่มา: https://sites.google.com/site/wilkinsbioresearch/_/rsrc/1467139577867/studysystem/Barn%20Swallow%20Range%20%2B%20Sampling2.tif?height=300&width=400)

สำหรับในประเทศไทยได้มีการรายงานจาก ตวงรัตน์และสุมาลี (2541) รายงานว่าพบนกนางแอ่นบ้าน (*H. rustica*) เพียง 3 สปีชีส์ย่อยเท่านั้น โดยแบ่งตามแหล่งที่พบเช่นกัน คือ *Hirundo rustica tyleri* พบในภาคกลางและภาคตะวันออกเฉียงใต้ *H. r. gutturalis* พบในภาคเหนือ และ *H. r. erythrogaster* พบทั่วทุกภาค ซึ่งการระบุสปีชีส์ย่อยตามแหล่งที่พบอาจเกิดความสับสนในการระบุบางสปีชีส์ย่อยที่สามารถพบทั่วทุกพื้นที่ หรือในช่วงการอพยพอาจมีการผลิตขนทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสี ดังนั้นจึงสนใจศึกษาการระบุสปีชีส์ย่อยจากลำดับนิวคลีโอไทด์ เพื่อให้จำแนกสปีชีส์ย่อยของนกนางแอ่นบ้านได้อย่างถูกต้องและชัดเจน

2.2 การสำรวจประชากรนก

หน่วยงานของกรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช จะทำการสำรวจประชากรนกด้วยการดักจับและติดห่วงขา (Leg ringing) เปรียบเสมือนเป็นบัตรประชาชนของนก ซึ่งเป็นการระบุเส้นทางการอพยพในแนวเส้นตรง คือ ติดห่วงขาจากแหล่งใด และพบอีกครั้งจากแหล่งใด นอกจากนี้ยังมีการติดธงสี (Leg flag) เพื่อบ่งบอกว่านกได้บินอพยพผ่านประเทศนั้นๆ โดยประเทศไทยจะมีสัญลักษณ์ธงสี คือ สีเขียวและสีดำ จากงานวิจัยของสมชาย และคณะ (2554) ศึกษาเส้นทางการอพยพของนกชายเลน โดยพบนกที่ติดธงสีจากประเทศไทยอพยพไปยังต่างประเทศ จำนวน 6 ประเทศ ได้แก่ ประเทศออสเตรเลีย ประเทศจีน ประเทศอินโดนีเซีย ประเทศเกาหลี ประเทศมาเลเซีย และประเทศสิงคโปร์ ประกอบด้วย 12 สปีชีส์ จำนวนทั้งหมด 110 ตัว และในประเทศไทย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษานานาชาติ และสงวนสิทธิ์ในการเผยแพร่ข้อมูลนี้โดยไม่ได้รับอนุญาต
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ยังพบนกอพยพที่ติดธงสีจากต่างประเทศจำนวน 9 ประเทศ ได้แก่ ประเทศออสเตรเลีย ประเทศจีน ประเทศฮ่องกง ประเทศอินโดนีเซีย ประเทศญี่ปุ่น ประเทศมาเลเซีย ประเทศรัสเซีย ประเทศสิงคโปร์ และประเทศไต้หวัน ประกอบด้วย 13 สปีชีส์ จำนวนทั้งหมด 60 ตัว ดังนั้นการติดห่วงขา และธงสีสามารถติดตามเส้นทางการอพยพ ประชากร และเผ่าละวางโรคอุบัติใหม่ หรือโรคอุบัติซ้ำ แต่จากรายงานของดวงรัตน์ (2554) ที่ศึกษานกตามธรรมชาติกับความเสี่ยงต่อการเป็นพาหะนำโรคไข้หวัดนกจากนก 117 สปีชีส์ รวมถึงนกนางแอ่นบ้านในพื้นที่ต่างๆ ทั่วประเทศไทย จำนวน 4,076 ตัวอย่าง แต่ยังไม่พบเชื้อไข้หวัดนก (H5N1)

สำหรับนกนางแอ่นบ้านจัดอยู่ในกลุ่มนกบกที่เป็นนกอพยพย้ายถิ่นในช่วงฤดูหนาว โดยเป็นนกที่ตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิได้อย่างรวดเร็ว เมื่ออุณหภูมิลดต่ำลงจะเริ่มอพยพทันที ดังนั้นกลุ่มนี้จึงเหมือนสัญลักษณ์แห่งฤดูกาลอพยพ โดยจากรายงานของกรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืชกล่าวว่า นกนางแอ่นบ้านจะทำรังวางไข่ในทวีปอเมริกาเหนือ ทวีปยุโรป และทวีปเอเชีย เมื่อถึงฤดูหนาวจะอพยพมายังทวีปอเมริกาใต้ ทวีปแอฟริกา ทวีปเอเชียตอนใต้ และบางส่วนของทวีปออสเตรเลีย เพื่อหนีสภาพอากาศหนาว และหาแหล่งอาหารเพื่อการอยู่รอด โดยนกนางแอ่นบ้านบินอพยพจากทางทิศเหนือสู่ทิศใต้ของประเทศไทย เกาะนอนพักตามสายไฟฟ้า บริเวณ อำเภอบัว จังหวัดน่าน ถนนสีลม กรุงเทพมหานคร และอำเภอบางตอง จังหวัดยะลา เป็นต้น ทางกรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืชจึงได้ทำการดักกับนกนางแอ่นบ้านและติดห่วงขา ทำให้ทราบข้อมูล ประชากร นิเวศวิทยา และเส้นทางการอพยพในแนวตรง ซึ่งเป็นเส้นทางที่ยังไม่ชัดเจน เพราะนกอาจบินนอกเส้นทางการอพยพได้ เนื่องจากสภาพภูมิศาสตร์ และสภาพแวดล้อมเป็นตัวกำหนดเส้นทางการอพยพของนก (Cotton และคณะ, 2003)

นกนางแอ่นบ้านจัดเป็นสัตว์ป่าคุ้มครอง ดังนั้นการดักจับนกเพื่อเก็บตัวอย่างมาศึกษา จึงต้องทำด้วยความปลอดภัยกับนก ให้นกได้รับบาดเจ็บน้อยที่สุด สำหรับอุปกรณ์ในการดักจับนกอพยพนั้นมีหลายประเภทของกรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช ได้แก่ ตาข่ายดักนก ตาข่ายเวหา สวิงกรง กับดัก แห ข่ายดักปลา และท่อยิงตาข่ายจับสัตว์ เป็นต้น ในการสุ่มจับนกนางแอ่นบ้านจะใช้ อุปกรณ์ตาข่ายดักนก (Mist net) ซึ่งเป็นวิธีจับนกขนาดเล็กถึงขนาดกลาง โดยวิธีนี้เป็นวิธีที่เกิดอันตรายกับสัตว์ปีกได้น้อย เนื่องจากตาข่ายทำมาจากเส้นใยไนลอน หรือโพลีเอสเตอร์ แม้ว่ามียารายงานกล่าวถึงการบาดเจ็บที่เกิดขึ้นกับปีกของนกเมื่อใช้วิธีการดักจับนี้ แต่พบความเสี่ยงในการเกิดอันตรายเพียง 0.61 เปอร์เซ็นต์ (Spotswood และคณะ, 2011) ส่วนการติดตั้งตาข่ายดักนกนางแอ่นบ้าน ทำโดยขึงตาข่ายติดกับแท่งสแตนเลส แล้วใช้เชือกไนลอนผูกกับแท่งสแตนเลสกับเสาหรือต้นไม้ เพื่อวางบริเวณที่นกบินผ่านเป็นประจำ เมื่อนกติดตาข่ายต้องรีบนำนกออกจากตาข่าย โดยทั่วไปวิธี Body pluck คือ วิธีนำนกออกจากตาข่ายจากการจับลำตัวนกออก ซึ่งต้องอาศัยความชำนาญ และคำนึงถึงความปลอดภัยของนกมากที่สุด แต่หากลำตัวของนกติดตาข่ายแน่นและหลายส่วนจนเกินไป ให้เลือกใช้วิธี Feet first คือ วิธีนำนกออกจากตาข่ายโดยนำเท้านกออกก่อนอันดับแรก และจึงนำส่วนอื่น ๆ ออก (Ralph และคณะ, 1993, Smith และคณะ, 1997) หลังจากนั้นนำนกพักในถุงผ้า ทั้งนี้ใน

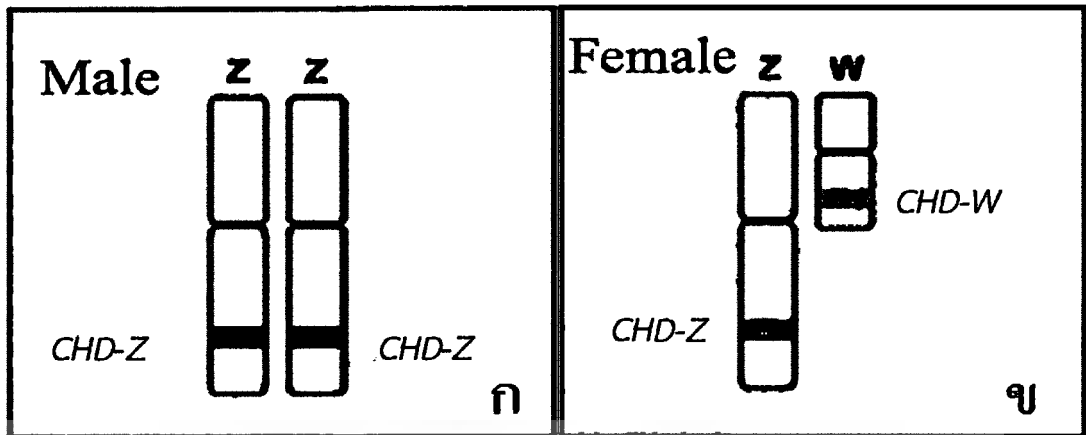
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อผู้ดูแลเห็นชอบจะยื่นคำให้การคำ
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

งานวิจัยนี้จะเก็บตัวอย่างเลือด และขนของนกนางแอ่นบ้านที่ติดห่วงขา โดยการติดห่วงขาจะเป็นประโยชน์ในการศึกษาข้อมูลด้านประชากร และนิเวศวิทยาต่อไป

2.3 การระบุเพศนก

การระบุเพศในนกเป็นประโยชน์ในการติดตามการเปลี่ยนแปลงประชากรนก อัตราส่วนของเพศ (sex ratio) พฤติกรรมการผสมพันธุ์ นิเวศวิทยา การอนุรักษ์ และวิวัฒนาการ รวมทั้งความถูกต้องแม่นยำในการจับคู่เพื่อเพาะขยายพันธุ์เพื่อการค้า ซึ่งการระบุเพศของนกเป็นไปได้ยากในขณะที่ยังไม่แสดงลักษณะเฉพาะของเพศ นอกจากนี้ยังพบว่าประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ ของนกทั้งหมดมีลักษณะภายนอกเหมือนกันทั้งในเพศผู้และเพศเมีย (sexually monomorphic) ทำให้ไม่สามารถระบุเพศโดยดูจากลักษณะภายนอกได้ แม้ได้พยายามหาความสัมพันธ์ของลักษณะและพฤติกรรมระหว่างเพศ เช่น นกเพศผู้จะมีสีขนที่เข้มและสดใสมากกว่าเพศเมีย และมีขนาดที่เล็กกว่านกเพศเมีย การศึกษาเกี่ยวกับฮอร์โมน การตรวจโครโมโซมเพศ การผ่าหรือส่องกล้องเพื่อตรวจดูอวัยวะเพศภายใน ซึ่งนอกจากทำให้นกบาดเจ็บแล้ว ยังมีปัจจัยที่ทำให้การแปลผลคลาดเคลื่อนได้ เช่น อายุ ฤดูกาลผสมพันธุ์ และขนาดของลำตัว เป็นต้น รวมทั้งมีผลทำให้นกบาดเจ็บได้ (Bermúdez-Humarán และคณะ, 2002) ดังนั้นจึงได้มีการพัฒนาการระบุเพศด้วยเทคนิคทางโมเลกุลชั้น (Cerit และ Avanus, 2007) โดยเทคนิคที่นิยมนำมาใช้ในการระบุเพศนกนั้นเกิดขึ้นหลังการค้นพบยีน *chromo-helicase-DNA binding (CHD)* บนโครโมโซม W (Griffiths และ Tiwari, 1995) และโครโมโซม Z (Griffiths และ Korn, 1997) เนื่องจากนกมีลักษณะของโครโมโซมเพศแตกต่างจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โดยนกเพศเมียมีโครโมโซมเพศที่แตกต่างกัน (heterogametic sex: ZW) ในขณะที่นกเพศผู้มีโครโมโซมเพศที่เหมือนกัน (homogametic sex: ZZ) ร่วมกับหลักการที่มีความแตกต่างของความยาวบริเวณ intron ของยีน *CHD* โดยอยู่บนโครโมโซม Z เรียกว่าอัลลีล *CHD-Z* และบนโครโมโซม W เรียกว่าอัลลีล *CHD-W* ดังนั้นนกเพศเมียจะมีอัลลีล *CHD-W* และอัลลีล *CHD-Z* อย่างละ 1 อัลลีล ส่วนนกเพศผู้จะมีอัลลีล *CHD-Z* จำนวน 2 อัลลีล ดังรูปที่ 2.2 ก และ ข (Griffiths และ Tiwari, 1995; Ellegren, 1996; Griffiths และ Korn, 1997; Griffiths, 2000) จึงนำมาใช้ในการระบุเพศนกได้เป็นอย่างดี ยกเว้นนกที่บินไม่ได้ และเมื่อแปลผลด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่าหากปรากฏ 2 แถบของอัลลีล *CHD-Z* และอัลลีล *CHD-W* จะแปลผลว่าเป็นเพศเมีย แต่ถ้าปรากฏเพียง 1 แถบของ *CHD-Z* แปลผลเป็นเพศผู้ ซึ่งอาศัยความแตกต่างบริเวณอินทรอนของอัลลีล *CHD-W* และ *CHD-Z* ในการระบุเพศ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.2 ลักษณะของยีน *CHD* บนโครโมโซมเพศของนก (ก) นกเพศผู้ (ข) นกเพศเมีย
(ที่มา: Morinha และคณะ, 2012)

ไพรเมอร์คู่แรกที่นำมาใช้ในการระบุเพศนก คือไพรเมอร์ P2/P3 (Griffiths และ Tiwari, 1995) แต่ไม่เป็นที่นิยมเนื่องจากเป็นการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในส่วนของ exon ของยีน *CHD* ที่ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอระหว่าง *CHD-W* และ *CHD-Z* แตกต่างกันประมาณ 60-110 คู่เบส ขึ้นอยู่กับแต่ละสปีชีส์ และได้มีการพัฒนา universal primers ที่สามารถนำมาใช้ในการระบุเพศนก ได้แก่ P2/P8 (Griffiths และคณะ, 1998), 1237L/1272H (Kahn และคณะ, 1998) และ 2550F/2718R (Fridolfsson และ Ellegren, 1999) ซึ่งไพรเมอร์ P2/P8 และ 1237L/1272H จะเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน *CHD* บริเวณ intron เดียวกัน และไพรเมอร์ 2550F/2718R จะเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน *CHD* บริเวณ intron ที่ต่างไป สำหรับ universal primer ทั้ง 3 คู่นี้เหมาะกับการระบุเพศในนกแตกต่างกันไป (Dalton และคณะ, 2010, Dawson และคณะ, 2001) รวมทั้งในวงศ์นกเป็ดน้ำ (Anatidae family) (Ong และ Vellayan, 2008)

Wang และคณะ (2007) ได้ศึกษาการนำไพรเมอร์มาใช้ในการระบุเพศนกจำนวน 73 สปีชีส์ รวม 19 วงศ์ พบว่าไพรเมอร์ 1237L/1272H สามารถระบุเพศนกได้ถึง 78.75 เปอร์เซ็นต์ และไม่สามารถระบุเพศได้ 21.25 เปอร์เซ็นต์ โดยไม่สามารถระบุเพศในวงศ์ Ciconiidae, Muscipidae, Timaliidae และบางส่วนของ Psittacidae ซึ่งสามารถระบุเพศได้ด้วยไพรเมอร์ 2550F/2718R แต่สำหรับไพรเมอร์ 2550F/2718R สามารถระบุเพศนกได้เพียง 73.75 เปอร์เซ็นต์ โดยไม่สามารถใช้ไพรเมอร์นี้ในวงศ์ Accipitridae, Cracidae, Caprimulgidae, Musophagidae, Pycnonotidae และบางส่วนของ Threskiornithidae, Anatidae, Phasianidae และ Psittacidae แต่อย่างไรก็ตาม universal primers นี้ไม่สามารถนำมาใช้ในการระบุเพศนกบินไม่ได้ เช่น นกกระจอกเทศ (Ostrich: *Struthio camelus*) (Griffiths และคณะ, 1998)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซึ่งนกอพยพที่สนใจศึกษาครั้งนี้เพศผู้และเพศเมียมีลักษณะสัณฐานแตกต่างกันเล็กน้อย ทำให้ยากต่อการระบุเพศ ดังนั้นจึงต้องอาศัยเทคนิคทางโมเลกุลเพื่อการระบุเพศนก โดยการเปรียบเทียบความแตกต่างของยีน *CHD* (*chromosome-helicase-DNA-binding*) ที่อยู่บนโครโมโซมเพศ ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส (PCR) ซึ่งนกบางสปีชีส์จะพบขนาดอินทรอนของอัลลีล *CHD-Z* ใหญ่กว่าอัลลีล *CHD-W* (Griffiths และคณะ, 1998) เมื่อแปลผลด้วยวิธีอิเล็กทรอนิกส์จะพบ *CHD-Z* ปรากฏอยู่ด้านบน *CHD-W* ดังรูปที่ 2.3 ก ดังเช่นรายงานของ นิชาภัทร และคณะ (2556) ได้ระบุเพศนกในสกุลหัวโตทรายเล็ก (*Charadrius* spp.) พบว่าเมื่อใช้ไพรเมอร์ 2550F/2718R เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม และวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยวิธีอิเล็กทรอนิกส์ นกเพศผู้เกิดขึ้นดีเอ็นเอ 1 แถบ ที่มีขนาดประมาณ 650 คู่เบส ส่วนนกเพศเมียเกิดขึ้นดีเอ็นเอ 2 แถบ ที่มีขนาดประมาณ 650 และ 450 คู่เบส

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

สำหรับนกบางสปีชีส์จะพบขนาดของอินทรอนของอัลลีล *CHD-W* ขนาดใหญ่กว่าอัลลีล *CHD-Z* เมื่อแปลผลด้วยวิธีอิเล็กทรอนิกส์จะพบอัลลีล *CHD-W* ปรากฏอยู่ด้านบนอัลลีล *CHD-Z* (Jensen และคณะ, 2003) ดังรูปที่ 2.3 ข เช่น Watson และคณะ (2004) ระบุเพศนกกินหอยปากแดง (*Eurasian oystercatcher*) โดยเก็บตัวอย่างจากชนบริเวณนอกของนกจากนั้นนำมาสกัดดีเอ็นเอรวมทั้งวัดขนาดของปากเพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างเพศและลักษณะทางสัณฐาน การระบุเพศด้วยเทคนิคทางโมเลกุลโดยการเพิ่มปริมาณยีน *CHD* ด้วยไพรเมอร์ P2/P8 พบว่านกเพศผู้เกิด 1 แถบ ที่มีขนาด 380 คู่เบส นกเพศเมียเกิด 2 แถบ ที่มีขนาด 380 และ 400 คู่เบส และจากการระบุเพศนกจำนวน 80 ตัว สามารถระบุเพศได้ 75 ตัว ไม่สามารถเพิ่มปริมาณยีน *CHD* ได้จำนวน 5 ตัว และจากการเปรียบเทียบพบว่า การระบุเพศด้วยการวัดความยาวปากให้ผลถูกต้องเพียง 90 เปอร์เซ็นต์

Wang และคณะ (2007) ศึกษาการระบุเพศนกจากตัวอย่างจำนวน 80 สายพันธุ์ ครอบคลุม 19 วงศ์ โดยอาศัยเทคนิคพีซีอาร์ที่ใช้ไพรเมอร์ 2 คู่ คือ 2550F/2718R และ 1237L/1273H ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในตำแหน่งยีน *CHD* โดยใช้สภาวะในการทำพีซีอาร์เดียวกันคือ 95 องศาเซลเซียส 5 นาที 95 องศาเซลเซียส 45 วินาที 50 องศาเซลเซียส 45 วินาที 72 องศาเซลเซียส 45 วินาที

จำนวน 35 รอบ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที เมื่อวิเคราะห์ผลผลิตพีซีอาร์โดยวิธีอิเล็กทรอนิกส์ที่ความ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่ขึ้นต้นการตีพิมพ์
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คู่เบส) และเพศเมียเกิดผลผลิตพีซีอาร์ 3 แถบ (378, 280 และ 107 คู่เบส) ดังนั้นการใช้เอนไซม์ *Haelll* และเอนไซม์ *Asp700I* มาช่วยย่อยผลผลิตพีซีอาร์จากไพรเมอร์ P2/P8 ทำให้เกิดความแตกต่างของชิ้นดีเอ็นเอที่สามารถระบุเพศนกได้ รวมทั้งงานวิจัยของ Costantini และคณะ (2008) พบปัญหาเช่นเดียวกันในการระบุเพศนกแพนกวินฮัมโบลต์ (*Spheniscus humboldti*) จากการตรวจสอบยีน *CHD* ด้วยไพรเมอร์ P2/P8 ผลการทดลองพบว่าเพศผู้เกิดผลผลิตพีซีอาร์ 1 แถบ (370 คู่เบส) เพศเมียเกิด 2 แถบ (370 และ 380 คู่เบส) ทำให้เกิดความคลุมเครือ เนื่องจากขนาดชิ้นดีเอ็นเอมีความแตกต่างกันน้อย จึงใช้เทคนิคอาร์เอฟแอลพีที่ใช้เอนไซม์ 2 ชนิด คือ เอนไซม์ *Haelll* (310, 60 และ 380 คู่เบส) และเอนไซม์ *Asp700I* (370, 270 และ 110 คู่เบส) ทำให้แยกความแตกต่างของเพศผู้และเพศเมียได้ดียิ่งขึ้น นอกจากนั้นแล้วยังมีการพัฒนาเทคนิคอื่นๆ เช่นเทคนิคอาร์เอฟดี (Random amplified polymorphic DNA: RAPD) (Wu และคณะ, 2007) รวมทั้งการใช้เทคนิค Real time รวมทั้งการวิเคราะห์ melting curve ที่สามารถแยกผลผลิตพีซีอาร์ที่มีความแตกต่างกัน จากค่าของ T_m (melting temperatures) โดยนำมาใช้ในการระบุเพศนกจากการตรวจสอบอัลลิล *CHD-Z* และ *CHD-W* ที่มีค่า T_m ต่างกัน ซึ่งวิธีการระบุเพศนกด้วยเทคนิคนี้เป็นวิธีที่มีความรวดเร็ว แต่มีข้อระมัดระวังคือการเลือกใช้ไพรเมอร์ต้องมีความเหมาะสม (Morinha และคณะ, 2012)

นอกจากนี้สามารถแก้ปัญหาขนาดใกล้เคียงกันของอัลลิล *CHD-W* และอัลลิล *CHD-Z* จากการใช้ไพรเมอร์ P2/P8 โดยการออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่ออัลลิล *CHD-W* (W-specific primer) ดังเช่นการระบุเพศแร้งเทาหลังขาว (*Gyp bengalensis*) จำนวน 46 ตัวอย่าง ด้วยไพรเมอร์ P2/P8 ที่พบอัลลิล *CHD-Z* ขนาด 383 คู่เบส และอัลลิล *CHD-W* ขนาด 389 คู่เบส ซึ่งแตกต่างกันเพียง 6 คู่เบส อาจทำให้แปลผลด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสผิดพลาดได้ ดังนั้นจึงใช้เทคนิค W-specific PCR ซึ่งใช้ P2 เป็น Forward primer และใช้ W-specific เป็น Reverse primer พบว่าเพศเมียเกิด 1 แถบ ของอัลลิล *CHD-W* ขนาด 263 คู่เบส แต่เพศผู้ไม่ปรากฏแถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (Ghorpade et al., 2012) แม้ว่าคู่ไพรเมอร์ P2/P8 จะให้ขนาดของอัลลิล *CHD-Z* และ *CHD-W* มีความแตกต่างกันน้อย แต่สามารถระบุเพศนกได้หลายสปีชีส์ (Cerit and Avanus, 2007) อีกทั้งพบการใช้ไพรเมอร์ P2/P8 ในการระบุเพศลูกนกนางแอ่นบ้าน ซึ่งใช้อุณหภูมิ Annealing ที่ 48 องศาเซลเซียส ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมและแปลผลด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้อะกาโรสเจล 3 เปอร์เซ็นต์ พบขนาดอัลลิล *CHD-Z* 350 คู่เบส และขนาดอัลลิล *CHD-W* 400 คู่เบส (Saino และคณะ, 2002)

นอกจากนี้มีการระบุเพศด้วยเทคนิคอื่นๆ โดย Weissmann และคณะ (2013) ได้ศึกษาการระบุเพศไข่ไก่ที่ได้รับการผสมพันธุ์แล้วด้วยการตรวจสอบระดับฮอร์โมน ได้แก่ Estradiol, Estrone sulfate และ Testosterone ใน Allantoic fluid เพื่อให้มีความเหมาะสมในการระบุเพศไข่ไก่ในระดับอุตสาหกรรม พบว่าระดับ Estrone sulfate ในวันที่ 10 ของเอ็มบริโอไข่ไก่เพศเมียจะมีค่าสูงกว่าเพศผู้ โดยเพศเมียมีค่า 0.677 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และเพศผู้มีค่า 0.193 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร การระบุเพศด้วยเทคนิค Real time PCR ซึ่งเป็นการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม โดยจะ

แสดงผลออกมาเป็นลักษณะเส้นโค้ง (Curve) ตามค่าอุณหภูมิการคลายเกลียวดีเอ็นเอ (Melting temperature) เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนูญให้เห็นาไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

temperature) ของยีนแต่ละชนิด โดยงานวิจัยของ Faux และคณะ (2014) ได้ศึกษาการระบุเพศนกทะเลทางมหาสมุทรตอนใต้จากตัวอย่างเนื้อเยื่อ 7 สกุล และเป็นตัวอย่างจากอุจจาระ 6 สกุล เปรียบเทียบกับนกแพนกวินอเดลี (*Pygoscelis adeliae*) ที่ทราบเพศแล้ว พบว่านกเพศผู้จะปรากฏ 1 curve ของอัลลีล CHD-Z ส่วนเพศเมียปรากฏ 2 curve ของอัลลีล CHD-Z และอัลลีล CHD-W

การระบุเพศด้วยเทคนิค Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR spectroscopy) โดยใช้รังสีอินฟราเรด ดังงานวิจัยของ Steiner และคณะ (2016) ศึกษาการระบุเพศนกพิราบ (*Columba livia*) โดยใช้เนื้อเยื่อบริเวณปลอกขน ฉายด้วยแสงอินฟราเรดเพื่อให้ตัวอย่างดูดกลืนแสง แล้วสังเกตหมู่ฟังก์ชัน (Functional group) ที่เป็นองค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ amide I และ amide II จากค่าการดูดกลืนแสง พบว่า เพศผู้มีปริมาณ amide มากกว่าเพศเมีย โดยทดสอบกับนกพิราบที่ทราบเพศแล้วจำนวน 17 ตัว พบว่าสามารถระบุเพศได้อย่างถูกต้องจำนวน 16 ตัว และระบุเพศไม่ได้จำนวน 1 ตัว แม้ว่าเทคนิคการระบุเพศนกด้วยระดับฮอโรโมน เทคนิค Real time PCR และเทคนิค FT-IR spectroscopy จะสามารถตรวจสอบได้อย่างรวดเร็ว แต่อาจมีการผิดพลาดหากไม่มีตัวเปรียบเทียบที่ทราบเพศแล้วเป็นตัวอ้างอิง ซึ่งไม่สามารถแปลผลครอบคลุมในนกต่างสปีชีส์ย่อยได้ อีกทั้งยังมีค่าใช้จ่ายสูงอีกด้วย

แม้มีรายงานการใช้ไพรเมอร์ 1237L/1273H ในวงศ์ Passeriformes โดยระบุเพศนกนางแอ่นบ้านจาก 6 พื้นที่ ได้แก่ ประเทศสเปน เกาะไอร์แลนด์ ประเทศอิตาลี ประเทศเยอรมนี ประเทศไซปรัส และประเทศรัสเซีย โดยอัลลีล CHD-Z มีขนาด 200 คู่เบส และอัลลีล CHD-W มีขนาด 240 คู่เบส (Guerrini และคณะ, 2014) และใช้ไพรเมอร์ 2550F/2718R ในนกนางแอ่นแปซิฟิก โดยมีสภาวะในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่แตกต่างกัน (Hasegawa และ Arai, 2017) แต่ยังไม่มีการรายงานการเก็บตัวอย่าง การบ่งชี้เพศ การบ่งชี้สายพันธุ์ย่อย และการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิคทางโมเลกุลในนกนางแอ่นบ้านที่อพยพมาในประเทศไทย ซึ่งการระบุสายพันธุ์และศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกจะเป็นประโยชน์ทางด้านฐานข้อมูลทางพันธุกรรม การศึกษาวิวัฒนาการ การสำรวจประชากรนกอพยพที่เข้ามาตามแหล่งพื้นที่ต่างๆทั่วประเทศ เพื่อเป็นดัชนีชี้วัดความหลากหลายของนกอพยพ ความอุดมสมบูรณ์ของพื้นที่บริเวณต่างๆที่นกอพยพเข้ามาอาศัย รวมทั้งเส้นทางการอพยพของนกเพื่อเป็นแนวทางในการติดตามและป้องกันการนำเชื้อโรคที่มีนิกเป็นพาหะได้

2.4 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่สัมพันธ์กับเพศนก

นกที่มีลักษณะแบบ Sexually monomorphic การระบุเพศด้วยเทคนิคทางโมเลกุลหรือเทคนิคต่างๆ จะมีความแม่นยำ แต่เทคนิคเหล่านี้ไม่สามารถใช้ระบุเพศในภาคสนามได้ ดังนั้นจึงมีงานวิจัยที่ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางสัณฐานวิทยากับเพศในนกชนิดต่างๆ โดยการระบุเพศของนกในอันดับเดียวกับนกนางแอ่นบ้าน ได้แก่ *Acrocephalus schoenobaenus* ทางตอน

เหนือของประเทศโปแลนด์ จำนวน 273 ตัว โดยใช้สมการ Discriminant function พบว่า เมื่อ
 เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อการใช้งานเฉพาะเท่านั้น มิใช่ผู้ให้เนื้อหาไปซึ่งจะขอสงวนสิทธิ์
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างความยาวปีกกับความยาวปากและความสัมพันธ์ระหว่างความยาวปีกกับความยาวหางจะให้ความถูกต้องในการระบุเพศเท่ากับ 82 และ 83 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบกับการระบุเพศด้วยเทคนิคทางโมเลกุล แต่สมการ Discriminant function ในการระบุเพศอาจให้ผลถูกต้องกับนกวัยเด็กที่พบบริเวณตอนเหนือหรือตอนกลางของทวีปยุโรปเท่านั้น (Wojczulanis-Jakubas และ Jakubas, 2011) ต่อมามีการระบุเพศของนกตักแตน (*Locustella naevia*) โดยเก็บตัวอย่างจากประเทศโปแลนด์จำนวน 224 ตัว ประกอบไปด้วยนกวัยเด็กจำนวน 161 ตัว และตัวเต็มวัยจำนวน 64 ตัว โดยเมื่อวิเคราะห์การระบุเพศจากสมการ Discriminant function พบว่า ความยาวปีก ความยาวปาก ความยาวหัวถึงปาก และความยาวของกรงเล็บ สามารถใช้ระบุเพศนกในภาคสนามได้จริง และให้ผลถูกต้อง 91 เปอร์เซ็นต์ แต่หากเลือกพิจารณาแค่ความยาวปีกหรือความยาวปากจะมีความถูกต้องถึง 94 เปอร์เซ็นต์ (Kulaszewicz และคณะ, 2013) อย่างไรก็ตาม การระบุเพศด้วยสมการ Discriminant function ยังไม่เหมาะสมกับการประยุกต์ใช้ในภาคสนาม เนื่องจากต้องมีการคำนวณทำให้ล่าช้าในการระบุเพศ

ส่วนการระบุเพศของนกนางแอ่นบ้านจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา ดังงานวิจัยของ Hermosell และคณะ (2007) สังเกตลักษณะทางสัณฐานวิทยาหลายลักษณะที่สามารถระบุเพศนกชนิดนี้ ได้แก่ ความยาวของกระดูกอก ความยาวหน้าแข้ง ความยาวของขนหางคู่นอก ความยาวของขนหางคู่ใน และความยาวปีก โดยศึกษานกนางแอ่นบ้านจากประเทศสเปนและประเทศเดนมาร์ก พบว่าจากกลุ่มตัวอย่างที่ศึกษาในแต่ละพื้นที่มีจำนวนเพศผู้มากกว่าเพศเมีย และเพศผู้มีความยาวกระดูกและขนหางมากกว่าเพศเมีย ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Møller และคณะ (2011) ที่ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเพศกับความยาวปีกและหางของนกนางแอ่นบ้านจากทวีปแอฟริกาใต้ ในช่วงฤดูอพยพ พบว่า นกนางแอ่นบ้านเพศผู้จะมีความยาวปีกและหางมากกว่าเพศเมียเช่นกัน อีกทั้งงานวิจัยของ Dor และคณะ (2011) ศึกษาความยาวขนหางคู่นอกของนกนางแอ่นบ้านจำนวน 2 สปีชีส์ย่อย ได้แก่ *Hirundo rustica rustica* จากประเทศอิสราเอลและประเทศสหรัฐอเมริกา และ *H. r. transitiva* จากประเทศอิสราเอล พบค่าความยาวขนหางคู่นอกของ *H. r. rustica* มากกว่าความยาวขนหางคู่นอกของ *H. r. transitiva* เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างความยาวหางคู่อกกับเพศ พบว่า ทั้ง 2 สปีชีส์ย่อยมีความยาวหางคู่อกของเพศผู้มากกว่าเพศเมีย อย่างไรก็ตามการระบุเพศด้วยความยาวปีก หรือความยาวหาง อาจมีข้อผิดพลาดในการระบุเพศเกิดขึ้นได้หากนกมีการผลัดขนหรือขนไม่สมบูรณ์จากการได้รับบาดเจ็บโดยเฉพาะในช่วงฤดูอพยพ

จึงมีการสังเกตพื้นที่จุดแต้มขาวจากขนหางแต่ละเส้นโดยวัดความกว้างและความยาวของขนหางทั้งหมด เพื่อบอกข้อแตกต่างระหว่างเพศผู้และเพศเมีย (Kose และ Møller, 1999) แต่วิธีนี้ค่อนข้างจะใช้เวลาในการศึกษา และนกอาจเกิดความเครียดได้ ในงานวิจัยของ Duijns และคณะ (2011) ที่ศึกษาเพศของนกนางแอ่นบ้านสปีชีส์ย่อย *H. r. rustica* จากประเทศแอมเบีย ทวีปแอฟริกา โดยสังเกตเฉพาะความยาวของขนหางคู่อก ความกว้างของขนหาง และความยาวจุดแต้มขาวของขนหางคู่อกสุด พบว่า เพศผู้จะมีความยาวของลักษณะต่างๆ มากกว่าเพศเมีย โดยกำหนดเป็นช่วง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาค้นคว้าเท่านั้น ไม่นิยามให้เข้าเป็นประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดังนี้ ความเว้าลึกของขนหาง หากน้อยกว่า 51 มิลลิเมตร ระบุเป็นเพศเมีย และมากกว่า 58 มิลลิเมตร ระบุเป็นเพศผู้ ความยาวของขนหางคู่นอก หากน้อยกว่า 93 มิลลิเมตร ระบุเป็นเพศเมีย และมากกว่า 112 มิลลิเมตร ระบุเป็นเพศผู้ และความยาวจุดแต้มขาวของขนหางคู่นอกสุด หากน้อยกว่า 17.5 มิลลิเมตร ระบุเป็นเพศเมีย และมากกว่า 29.5 มิลลิเมตร ระบุเป็นเพศผู้ ซึ่งงานวิจัยดังกล่าวทำให้สามารถระบุเพศนกได้ถูกต้องมากขึ้น แต่ยังไม่สามารถระบุเพศนกนางแอ่นบ้านที่มีค่าความยาวอยู่ในช่วงระหว่างข้อมูลข้างต้นได้ เช่น ความเว้าลึกของขนหางระหว่าง 51-58 มิลลิเมตร ความยาวของขนหางคู่นอกระหว่าง 93-112 มิลลิเมตร และความยาวจุดแต้มขาวของขนหางคู่นอกสุดระหว่าง 17.5-29.5 มิลลิเมตร

นอกจากนี้ Dor และคณะ (2011) ยังศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสีขนบริเวณอกกับเพศในนกนางแอ่นบ้าน (*H. r. transitiva*) จากประเทศอิสราเอล โดยพบสีขนบริเวณอกของเพศผู้มีสีส้มเข้มกว่าเพศเมีย ส่วนงานวิจัยของ Hasegawa และคณะ (2010) สังเกตสีขนบริเวณคอ และจุดแต้มขาวบนขนหางของนกนางแอ่นบ้าน (*H. r. gutturalis*) จากประเทศญี่ปุ่น โดยเพศผู้จะมีสีขนบริเวณคอที่เข้ม และมีขนาดของจุดแต้มขาวที่ใหญ่ และรายงาน Wilkins และคณะ (2016) พบนกนางแอ่นบ้าน (*H. r. rustica*) จากทวีปยุโรป และนกนางแอ่นบ้าน (*H. r. transitiva*) จากทวีปเอเชียตะวันออกเฉียงกลาง เพศเมียจะเลือกคู่ผสมพันธุ์ โดยพิจารณาจากความยาวของขนหางคู่นอกกับสีขนบริเวณอกของเพศผู้ ดังนั้นสีขนอาจมีความสัมพันธ์ในการจำแนกเพศนกนางแอ่นบ้าน แต่อาจเกิดการผิดพลาดในการสังเกตได้ เนื่องจากการมีการผลัดขนในฤดูอพยพ (Sarah, 2007)

2.5 การศึกษาความหลากหลายด้วยเครื่องหมายโมเลกุล

ปัจจุบันมีการศึกษาความหลากหลายจากเครื่องหมายดีเอ็นเอหลายเทคนิค เช่น Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) เป็นเทคนิคที่ไพรเมอร์สามารถเข้าจับกับดีเอ็นเอต้นแบบได้หลายตำแหน่ง แต่มีข้อด้อยคือ เมื่อทำซ้ำจะให้ผลในแต่ละครั้งไม่แน่นอน เพราะใช้ไพรเมอร์ขนาดประมาณ 10-12 นิวคลีโอไทด์ในการสุ่มจับกับดีเอ็นเอเป้าหมายทั้งจีโนม ดังนั้นหากวิเคราะห์ความหลากหลายด้วยเทคนิค RAPD จึงควรวิเคราะห์เทคนิคอื่นๆ เพื่อยืนยันผล (Figueiredo และคณะ, 2013) งานวิจัยของ Yap และคณะ (2010) ที่ศึกษาความหลากหลายของไก่ในพื้นที่ Peninsular ประเทศมาเลเซีย พบว่าเมื่อศึกษาด้วยเทคนิค RAPD สามารถแบ่งได้ 6 กลุ่มตามแหล่งที่อยู่อาศัย โดยไม่สามารถแยกตามสายพันธุ์ของไก่ได้ ดังนั้นจึงศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่ง *Cty-b* เพื่อแยกสายพันธุ์ของไก่ โดยจากลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวน 351 คู่เบส พบว่าตำแหน่งเบสที่ 27 มีความแตกต่างกัน ซึ่งสามารถแบ่งแยกไก่ได้ 3 กลุ่ม คือ ไก่พื้นเมือง (Type-I village chickens) ไก่ป่าแดง (Red jungle fowl subspecies) และไก่ญี่ปุ่น (Japanese chunky broilers) และสามารถแยกไก่สายพันธุ์ผสมออกจากไก่พันธุ์พื้นเมืองได้ นอกจากนี้ยังมีการใช้เทคนิค RAPD ในนกกระทา (*Alectoris chukar*) เพื่อศึกษาความหลากหลายของประชากรนกกระทาที่ใกล้จะสูญพันธุ์ใน 4 พื้นที่ของประเทศอิหร่าน ได้แก่ Kalat-e-Nader, Mashhad, Torbat-e-Jaam และ Quchan รวมทั้งหมด

75 ตัวอย่าง พบว่าปรากฏแถบแบนทั้งหมด 67 แถบ โดยเป็น Polymorphic band 28 แถบ คิดเป็น 41.79 เปอร์เซ็นต์

สำหรับเทคนิคที่มีความจำเพาะสูงคือ Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) เป็นเทคนิคที่ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะเข้าจับบริเวณดีเอ็นเอเป้าหมายที่ต้องการ มีรายงานการใช้เทคนิคนี้ในไก่ โดย De Marchi และคณะ (2005) ศึกษาความหลากหลายของไก่จาก 4 สถานที่ใน Veneto ของอิตาลี และพันธุ์ไก่ทางการค้า โดยพบว่าไก่ในเมือง Pe'poi มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับพันธุ์ไก่ทางการค้ามากกว่าไก่ในเมือง Ermellinata, Padovana และ Robusta โดยมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมมาตรฐานของ Nei (Nei's standard genetic distances: (Ds)) เท่ากับ 0.223 ± 0.05 และงานวิจัยของ Poeaim และคณะ (2015) ที่ศึกษาเทคนิค AFLP ในนกหัวโตทรายเล็กและนกหัวโตทรายใหญ่ โดยพบว่าเทคนิคนี้สามารถให้ Polymorphic fragment จำนวน 193 แถบ (59.75%) จากทั้งหมด 323 แถบ และสามารถแยกนกหัวโตทรายเล็ก (*Charadrius mongolus*) ออกจากนกหัวโตทรายใหญ่ (*C. leschenaultia*) ซึ่งต่างสปีชีส์กัน แม้เทคนิคนี้จะมี ความแม่นยำ แต่ก็มีความซับซ้อนและใช้ค่าใช้จ่ายสูง (Wang และคณะ, 2015)

ต่อมาได้มีการพัฒนาเครื่องหมายทางโมเลกุล Sequence-Related Amplified Polymorphism (SRAP) โดย Li และ Quiros (2001) เพื่อลดความยุ่งยากของขั้นตอนต่างๆ ในเทคนิค AFLP และสามารถทำซ้ำให้ผลเหมือนเดิมได้ดีกว่าเทคนิค RAPD โดยเทคนิค SRAP ได้ใช้ ศึกษาความหลากหลายในสัตว์ เช่น สุนัขจิ้งจอกอาร์กติก (*Alopex lagopus*) ในประเทศจีน (Zhang และคณะ, 2013) เป็นผลสำเร็จ โดยวิเคราะห์ 7 กลุ่ม ได้แก่ Guo feeding, Liu feeding, Lv-feeding, Taishang feeding, Qingdao feeding, An feeding และ Li feeding พบว่าสุนัขจิ้งจอก มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงและมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในแต่ละกลุ่มประชากร โดยมี ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน (Similarity coefficient) ระหว่าง 0.1694 - 0.0417 และกลุ่ม Taishang feeding มีความหลากหลายจากกลุ่มประชากรอื่นๆ มากที่สุด

นอกจากนี้ยังมีเครื่องหมายทางโมเลกุล inter Primer Binding Site (iPBS) ซึ่งเป็นเทคนิคที่ พัฒนาขึ้นโดย Kalendar และคณะ (2010) วิธีนี้อาศัยการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR จากการใช้ไพรเมอร์ขนาด 12-18 นิวคลีโอไทด์ เกาะที่ตำแหน่ง Primer Binding Site (PBS) เข้าไป สุ่มจับกับดีเอ็นเอเป้าหมาย Long Terminal Repeat (LTR) บริเวณ retrotransposon ซึ่งเป็น บริเวณที่ลำดับเบสของดีเอ็นเอมักเกิดการแปรผันทางพันธุกรรมได้ง่าย พบในสิ่งมีชีวิตกลุ่มยูคาริโอต แสดงดังรูปที่ 2.4 โดยข้อดีของเทคนิคนี้ คือ ไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลเกี่ยวกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ดีเอ็นเอเป้าหมายก่อน ทำได้ง่ายไม่ซับซ้อน ให้ข้อมูลมาก ค่าใช้จ่ายไม่สูง และให้รูปแบบดีเอ็นเอที่มีความคงตัวสูง (Kalendar และคณะ, 2011)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase subunit (ND2) จำนวน 61 สปีชีส์ โดยสามารถแบ่งในวงศ์ *Hirundininae* ของนกนางแอ่น ออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ทำรังจากโคลน ได้แก่ สกุล *Hirundo* มีลำตัวสีน้ำตาลเงินเหลือบดำ หน้าผากและคอหอยสีน้ำตาล และสกุล *Ptyonoprogne* มีลำตัวน้ำตาลแกมดำ คอและอกสีอ่อนกว่าเล็กน้อย กลุ่มที่ 2 Core Martins ได้แก่ สกุล *Riporia* เป็นชนิดที่จะอยู่รวมกลุ่มกับนกนางแอ่นบ้าน ซึ่งลักษณะที่แตกต่างคือ มีแถบคาดอกสีจาง และมีขีดตรงกลางแถบ และสกุล *Phedina* ลำตัวสีเทา ออกเป็นลายดำขาวลักษณะคล้ายลายเสือ กลุ่มที่ 3 Basal Relicts ได้แก่ สกุล *Cheramoeca* ลำตัวสีชาดำ มีกระหม่อมและแถบคาดตาสีเทา สกุล *Pseudhirundo* ลำตัวสีน้ำตาลเงิน ท้องและคอหอยสีขาว และกระหม่อมสีน้ำตาล และสกุล *Psallidoprocne* ลำตัวหัวและท้องสีเทาถึงดำสนิททั้งตัว

Zink และคณะ (2006) ศึกษาความหลากหลายในตำแหน่ง *ND2* ของนกนางแอ่นกลุ่มที่ 1 ซึ่งเป็นนกนางแอ่นบ้าน (*Hirundo rustica*) พบการกระจายตัวของกลุ่มประชากรอย่างกว้างขวาง ได้แก่ ทวีปยุโรป ทวีปเอเชีย ทวีปอเมริกา และทะเลสาบไบคาล ประเทศรัสเซีย โดยมีพันธุกรรมที่คงที่ในแต่ละพื้นที่ แต่เมื่อสภาพแวดล้อมเปลี่ยนไปมีการตั้งถิ่นฐานของมนุษย์จึงเกิดการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมในการดำรงชีวิต ทำให้เกิดความแปรผันทางพันธุกรรมเพื่อการปรับตัวให้เหมาะสมกับสภาพแวดล้อม จึงมีการศึกษาความหลากหลายของนกนางแอ่นบ้านในแต่ละพื้นที่ ได้แก่ นกนางแอ่นบ้านจำนวน 74 ตัวอย่าง โดยศึกษาในฤดูผสมพันธ์ของทวีปยุโรป 13 พื้นที่ และทวีปอเมริกาเหนือ 6 พื้นที่ และในฤดูอพยพของประเทศแอฟริกาใต้และประเทศสิงคโปร์ พบว่าสามารถใช้ตำแหน่ง *ND2* แบ่งนกนางแอ่นบ้านในพื้นที่ต่างๆได้ 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ทวีปยุโรป กลุ่มที่ 2 ทวีปเอเชีย และกลุ่มที่ 3 ทวีปอเมริกาเหนือ และทะเลสาบไบคาลของประเทศรัสเซีย

Dor และคณะ (2010) ศึกษาหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ในยีน *ND2* และ *Cyt-b* ในตัวอย่างนกนางแอ่นบ้าน (*H. rustica*) จำนวน 29 ตัวอย่าง ครอบคลุมทั้ง 6 สปีชีส์ย่อยดังที่กล่าวมาแล้ว พบว่ามีความซับซ้อนสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ตามแหล่งที่อยู่อาศัย คือ European-Middle Eastern clade และ Asian-American clade โดยกลุ่ม European-Middle Eastern นี้มีลักษณะแถบเข้มคาดบริเวณอกที่กว้างและชัดเจน ประกอบด้วย 3 สปีชีส์ย่อย คือ *H. r. rustica* ที่พบกระจายอยู่ทั่วไปในยุโรปและเอเชียกลาง สำหรับอีก 2 สปีชีส์ย่อยพบกระจายในตะวันออกกลาง โดย *H. r. savignii* จากอียิปต์ และ *H. r. transitiva* จากด้านตะวันออกของทะเลเมดิเตอร์เรเนียน และกลุ่ม Asian-American ซึ่งมีลักษณะแถบเข้มคาดบริเวณอกแคบและไม่ชัดเจน กลุ่มนี้สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อยอย่างชัดเจน โดยกลุ่มย่อยที่ 1 คือ *H. r. gutturalis* จากเอเชียตะวันออก และกลุ่มย่อยที่ 2 ประกอบด้วย 2 สปีชีส์ย่อย คือ *H. r. erythrogaster* ที่พบในทวีปอเมริกา และ *H. r. tytleri* จากเอเชียตะวันตกเฉียงเหนือ โดย 2 สปีชีส์ย่อยนี้ใกล้ชิดกันเนื่องจากมีการอพยพระหว่างทวีปอเมริกาเหนือมายังเอเชีย และยังพบว่าสปีชีส์ย่อยของอาร์เจนตินาเป็นชนิดเดียวกับที่พบในทวีปอเมริกา คือ *H. r. erythrogaster* แต่อย่างไรก็ตามในการศึกษาครั้งนี้ไม่

มีการเก็บตัวอย่างจากประเทศไทย ต่อมาทีมงานวิจัยของ Dor และคณะ (2011) ได้ศึกษาความ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาค้นคว้าเท่านั้น เมื่อนำไปเผยแพร่โดยไม่ขออนุญาตถือว่าผิดกฎหมาย

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หลากหลายระหว่าง *H. r. rustica* เป็นกลุ่มประจำถิ่นในประเทศอิสราเอล กับ *H. r. transitiva* ที่เป็นกลุ่มอพยพมายังประเทศอิสราเอล เมื่อศึกษาด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่ง *ND2* และ *Cyt-b* พบความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่าง *H. r. rustica* และ *H. r. transitiva*

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสีขนกับสปีชีส์ย่อย มีรายงานจาก นิตยา (2539) อ้างถึง Dillon (1983) ศึกษาในนกตีตใหญ่ (*Parus major*) มีแหล่งที่อยู่อาศัยกระจายทั่วเขตยูเรเชีย พบว่าจำนวน 29 สปีชีส์ย่อย สามารถแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ ได้แก่ เมเจอร์ (หลังเขียว หางและท้องเหลือง) ไมเนอร์ (หลังและหางสีเขียวแต่มีท้องขาว) และซิเนอเรียส (หลังและหางสีเทา) โดยพบประชากรทั้ง 2 กลุ่ม ผสมพันธุกันในเขตที่มีพื้นที่ติดต่อกัน เช่น กลุ่มเมเจอร์ที่ครอบครองเขตในยุโรป จนถึงสภาพไซเบเรียตแถบทะเลโอคอตสค์ มีการผสมข้ามสปีชีส์ย่อยในกลุ่มซิเนอเรียส ครอบครองที่อยู่อาศัยในเอเชีย และเกาะซุนดา ทำให้ได้ลูกผสมที่มีลักษณะของสีขนบริเวณหลัง และอกที่เปลี่ยนแปลง คือ มีสีขนบนหลังผสมกันระหว่างสีเขียวและเทา ส่วนสีขนบริเวณอกมีสีขาวและเหลือง

สำหรับนกนางแอ่นบ้านพบการผสมข้ามสปีชีส์ย่อยจากรายงาน Scordato และคณะ (2017) กล่าวว่านกนางแอ่นบ้าน 3 สปีชีส์ย่อย ได้แก่ *H. r. rustica*, *H. r. tytleri* และ *H. r. gutturalis* ผสมพันธุข้ามสปีชีส์ย่อยในเขตที่มีพื้นที่ติดต่อกัน ทำให้ลูกผสมมีลักษณะของสีขนบริเวณอกและความยาวปีกที่เปลี่ยนแปลง ทั้งนี้มีการศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างเพศโดยใช้ตำแหน่ง *ND2* ดังงานวิจัยของ Guerrini และคณะ (2014) ศึกษาในนกนางแอ่นบ้าน (*H. r. rustica*) ทั้งหมด 186 ตัว ใน 6 ประเทศ ได้แก่ ประเทศสเปน ประเทศอิตาลี ประเทศเยอรมนี ประเทศไซปรัส ประเทศรัสเซีย และเกาะไอร์แลนด์ พบว่า ตำแหน่ง *ND2* ไม่สามารถแยกความแตกต่างของเพศผู้และเพศเมีย เนื่องจากพบค่าความต่างทางพันธุกรรม (F_{st}) ในกลุ่มเพศเมียเท่ากับ -18.449 และในกลุ่มเพศผู้มีค่า F_{st} เท่ากับ -13.178 นอกจากนี้ยังมีการแสดงค่าความต่างทางพันธุกรรมในลักษณะอื่นๆ ซึ่งใกล้เคียงกันในระหว่างเพศผู้กับเพศเมีย แต่พบว่าสามารถใช้ตำแหน่ง *ND2* ในการแยกนกนางแอ่นบ้านจากประเทศรัสเซียออกจากรุ่นนกนางแอ่นบ้านในประเทศอื่นๆได้ ทั้งนี้ยังสามารถใช้เทคนิค Microsatellites ในการวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างเพศผู้และเพศเมียได้ โดยพบว่าค่าเฉลี่ยของกลุ่มเพศเมียจะมีค่า F_{st} เท่ากับ 0.022 ซึ่งมากกว่ากลุ่มเพศผู้ที่มีค่าเฉลี่ย F_{st} เท่ากับ 0.017 สำหรับความต่างทางพันธุกรรมระหว่างนกนางแอ่นบ้านเพศผู้และเพศเมียอธิบายได้จากพฤติกรรมของเพศเมียที่จะอาศัยในแหล่งที่อยู่เดิมที่เคยอยู่ ส่วนเพศผู้เมื่อเป็นนกเต็มวัยจะมีการอพยพย้ายถิ่นฐาน ทำให้การดำรงชีวิตของเพศผู้และเพศเมียต่างกันเนื่องจากอาศัยอยู่ในแหล่งที่อยู่ที่มีสภาพแวดล้อมต่างกัน ดังนั้นจึงทำให้พันธุกรรมของเพศผู้และเพศเมียแตกต่างกัน

โดยสถานภาพของนกนางแอ่นบ้านในประเทศไทยเป็นนกที่พบได้บ่อยและปริมาณมาก สถานะเป็นนกอพยพ โดยอพยพมายังประเทศไทยช่วงนอกฤดูผสมพันธุ์หรือในฤดูหนาว ประเทศไทยมีรายงาน 3 สปีชีส์ย่อย คือ *H. r. tytleri* พบในภาคตะวันออกเฉียงใต้ และภาคกลาง *H. r. mandshurica* พบในภาคเหนือ และ *H. r. gutturalis* พบทั่วทุกภาค (โอภาส, 2544) แม้ว่านกนางแอ่นบ้านเป็นนกที่พบได้โดยทั่วไป และมีลักษณะภายนอกที่แตกต่างกัน แต่มีข้อที่จะสังเกตได้คือสี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาค้นคว้าเท่านั้น ไม่นิยามให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บริเวณท้อง และความสั้นยาวของขนหางคู่นอกสุด โดย *H. r. rustica* จะมีสีบริเวณอกและท้องซีดจางกว่าและขนหางคู่นอกสุดยาวกว่า แต่สำหรับ *H. r. erythrogaster* มีสีบริเวณอกและท้องเข้มกว่าและขนหางคู่นอกสุดสั้น โดยที่สปีชีส์ย่อยที่พบในตะวันออกเฉียงกลาง คือ *H. r. savignii* ที่พบตลอดแม่น้ำไนล์ และ *H. r. transitive* ที่พบในประเทศอิสราเอล เลบานอน จอร์แดน และซีเรีย จะเป็นการผสมลักษณะของ *H. r. rustica* และ *H. r. erythrogaster* คือ มีขนที่เข้มและขนหางคู่นอกสุดยาวเท่ากับ *H. r. rustica* สำหรับนกนางแอ่นบ้านที่พบในแถบเอเชียเหนือ หรือสปีชีส์ย่อย *H. r. tyleri* จะมีความยาวของขนหางคู่นอกสุดปานกลาง ขณะที่ *H. r. gutturalis* ที่อาศัยทั่วไปในเอเชีย ที่จะมีทั้งลักษณะท้องและอกที่ซีดมากและมีความยาวของขนหางคู่นอกสุดสั้นที่สุด (Safran, 2010) แต่อย่างไรก็ตาม ลักษณะสีขนและความยาวของหางขึ้นกับอายุและเพศ (Lifjeld และคณะ, 2011) แม้ว่าจะมีรายงานการศึกษาทั้งความหลากหลายทางพันธุกรรมและพฤติกรรมของนกนางแอ่นบ้าน แต่นิยมศึกษาในช่วงฤดูการผสมพันธุ์ในแถบซีกโลกเหนือ มีเพียงการรายงานถึงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่าง *H. r. erythrogaster* และ *H. r. transitive* เปรียบเทียบระหว่างฤดูการผสมพันธุ์และอพยพในประเทศอังกฤษและประเทศในตะวันออกเฉียงกลาง (Dor และคณะ, 2012) จึงควรมีการศึกษาความหลากหลายของนกนางแอ่นบ้านในประเทศไทยเพื่อทราบทั้งสปีชีส์ย่อย การกระจายตัวของประชากร และเส้นทางการอพยพต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์

- 3.1.1 Autoclave
- 3.1.2 Balance ชนิดละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง
- 3.1.3 Beaker ขนาด 100, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร
- 3.1.4 Capillary tube
- 3.1.5 Centrifuge: Hettich รุ่น Mikro 22R
- 3.1.6 Cooling box
- 3.1.7 Computer พร้อมโปรแกรมต่างๆ เช่น Notepad, BioEdit
- 3.1.8 Dot grid (mm²)
- 3.1.9 Erlenmeyer flask ขนาด 125 และ 250 มิลลิลิตร
- 3.1.10 Fast Technology Analysis Card (FTA card)
- 3.1.11 Forceps
- 3.1.12 Gel electrophoresis: Mupid รุ่น mupid-exu
- 3.1.13 Gel documentation: SYNGENE InGenius Bio imaging พร้อมโปรแกรม Genesnap
- 3.1.14 Glove
- 3.1.15 Heat box
- 3.1.16 Hot air oven
- 3.1.17 Microcentrifuge tube ขนาด 0.2, 0.5 และ 1.5 มิลลิลิตร
- 3.1.18 Micropipette set และ Micropipette tips ขนาดต่างๆ
- 3.1.19 Microwave
- 3.1.20 Needle size 26
- 3.1.21 Parafilm
- 3.1.22 Paper รุ่น UPP-110HG: Sony
- 3.1.23 PCR thermal cycler
- 3.1.24 Plate (90x15 mm)
- 3.1.25 pH meter
- 3.1.26 Puncture ขนาด 2 มิลลิเมตร
- 3.1.27 Rack ขนาด 0.2 และ 1.5 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏวชิรเวศน์บุรีรัมย์ ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.1.28 Refrigerator 4 และ -20 องศาเซลเซียส
- 3.1.29 Ruler (mm)
- 3.1.30 Scalpel
- 3.1.31 Spectrophotometer (Eppendorf bio photometer)
- 3.1.32 Spin down
- 3.1.33 Thermal cycler: Eppendorf Mastercycler® ep Gradient S
- 3.1.34 Vortex mixer
- 3.1.35 Water bath
- 3.1.36 วัสดุและอุปกรณ์ที่ส่งต่ายสำหรับดักนก

3.2 สารเคมี

- 3.2.1 10X Standard *Taq* reaction buffer
- 3.2.2 2X *Taq* master mix; Vivantis
- 3.2.3 50 bp DNA ladder, 100 bp DNA ladder and 1 bp DNA ladder (vivantis, Malaysia)
- 3.2.4 6X loading dye; Biolabs
- 3.2.5 Absolute ethanol และ ethanol 70%
- 3.2.6 Agarose; Vivantis
- 3.2.7 Boric acid; Vivantis
- 3.2.8 Deoxynucleotide Triphosphate (dNTPs); Vivantis
- 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 GF-1 Tissue kit (Vivantis, Malaysia)
- 3.2.15 Nuclease free water
- 3.2.16 Primer
 - 3.2.16.1 Primer ดังแสดงตารางที่ 3.1
 - 3.2.16.2 iPBS Primer ดังแสดงตารางที่ 3.2
- 3.2.17 Proteinase K
- 3.2.18 RNase A

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.19 Magnesium chloride; Vivantis

3.2.20 Taq DNA polymerase; Biolabs

3.2.21 Tris base; Vivantis

ตารางที่ 3.1 ชนิดและลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษา

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'→3')	ที่มา
P2	TCTGCATCGCTAAATCCTTT	Griffiths และคณะ, 1998
P8	CTCCAAGGATGAGRAAYTG	
2550F	GTTACTGATTCGTCTACGAGA	Fridolfsson และ Ellegren, 1999
2718R	ATTGAAATGATCCAGTGCTTG	
1272H	TCCAGAATATCTTCTGCTCC	Kahn และคณะ, 1998
1237L	GAGAACTGTGCAAAACAG	
ProgND5F	CACTCTGGCCTAATCAAGTCCTAC	Dor และคณะ, 2010
ProgCBR	GGCAGTCTTCAATCTTTGGC	
METB	CGAAAATGATGGTTTAACCCCTTCC	Dor และคณะ, 2010
TRPC	CGGACTTTAGCAGAACTAAGAG	

ตารางที่ 3.2 ชนิด ลำดับนิวคลีโอไทด์ ค่า T_m ค่า T_a และการแบ่งกลุ่มของไพรเมอร์
ในเทคนิค iPBS (Kalendar และคณะ, 2010)

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	ค่า T _m (°C)	ค่า T _a (°C)	การแบ่งกลุ่ม ไพรเมอร์
2074	5'-GCTCTGATACCA-3'	40.5	49.6	กลุ่มที่ 1 เฉลี่ย 51 °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'-GAACCTTGCTCCGATGCCA-3'	57.9	51.0	
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'-ACTTGATGTCGATACCA-3'	52.5	51.4	
2252	5'-GAACAGGCGATGATACCA-3'	52.7	51.6	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์หรือการขงนเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้ผู้อื่นไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.2 (ต่อ)

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	ค่า T _m (°C)	ค่า T _a (°C)	การแบ่งกลุ่ม ไพรเมอร์
2277	5'-GGCGATGATACCA-3'	46.2	52.0	กลุ่มที่ 2 เฉลี่ย 53 °C
2231	5'-ACTTGGATGCTGATACCA-3'	52.9	52.0	
2392	5'-TAGATGGTGCCA-3'	43.1	52.2	
2229	5'-CGACCTGTTCTGATACCA-3'	53.5	52.5	
2375	5'-TCGCATCAACCA-3'	45.1	52.5	
2230	5'-TCTAGGCGTCTGATACCA-3'	54.0	52.9	
2401	5'-CCCCTCCTTCTAGCGCCA-3'	61.6	51.0	
2378	5'-GGTCCTCATCCA-3'	44.2	53.0	
2219	5'-GAACTTATGCCGATACCA-3'	51.5	53.0	กลุ่มที่ 3 เฉลี่ย 54 °C
2377	5'-ACGAAGGGACCA-3'	47.2	53.0	
2222	5'-ACTTGGATGCCGATACCA-3'	55.7	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	
2224	5'-ATCCTGGCAATGGAACCA-3'	56.6	55.4	
2232	5'-AGAGAGGCTCGGATACCA-3'	56.6	55.4	
2077	5'-CTCACGATGCCA-3'	46.1	58.3	กลุ่มที่ 4 เฉลี่ย 57 °C
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	
2220	5'-ACCTGGCTCATGATGCCA-3'	59.0	57.0	กลุ่มที่ 5 เฉลี่ย 62 °C
2295	5'-AGAACGGCTCTGATACCA-3'	55.0	60.0	
2415	5'-CATCGTAGGTGGGCGCCA-3'	62.5	61.0	
2078	5'-GCGGAGTCGCCA-3'	54.2	62.8	
2079	5'-AGGTGGGCGCCA-3'	56.6	65.2	

*หมายเหตุ : T_m = melting temperature, T_a = optimal annealing temperature

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 การเก็บตัวอย่าง

ดักจับนกนางแอ่นบ้านในฤดูอพยพ คือระหว่างเดือนตุลาคมถึงเดือนกุมภาพันธ์ ด้วยวิธีดักจับโดยตาข่ายดักนก (Mist Net) โดยการเก็บตัวอย่างอยู่ภายใต้การทำงานของผู้เชี่ยวชาญและเจ้าหน้าที่จากสถานีวิจัยสัตว์ป่าบึงบอระเพ็ด กลุ่มงานวิจัยสัตว์ป่า สำนักอนุรักษ์สัตว์ป่า กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพันธุ์พืช ที่มีประสบการณ์ และความเชี่ยวชาญสูงในการเก็บตัวอย่าง เก็บข้อมูลชีวสัณฐาน ตัดเลขห่วงขา และธงสี ตามรูปแบบการปฏิบัติของกรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช โดยการตัดเลขห่วงขา และธงสีซึ่งมีน้ำหนักเบา และเป็นวิธีการติดตามนกที่เป็นสากล ที่ไม่เป็นอันตรายต่อนก และไม่ทำให้วิถีการดำรงชีวิตของนกเปลี่ยนแปลงไป ในช่วงเวลาดังกล่าวจะมีการผลัดขนใหม่ จะเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อในปลอกขน จำนวน 1-2 ปลอก ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เพื่อนำมาสกัดดีเอ็นเอและศึกษาทั้งการบ่งชี้สปีชีส์ย่อย ความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค iPBS และการบ่งชี้เพศนก ในกรณีที่ไม่สามารถเก็บปลอกขนได้ จะทำการศึกษาเฉพาะการบ่งชี้เพศเท่านั้น เนื่องจากมีปริมาณดีเอ็นเอจำกัด โดยจะเจาะเลือดบริเวณหน้าแข้งด้วยเข็มเบอร์ 26 และป้ายหรือหยดตัวอย่างเลือดประมาณ 1-2 หยด หรือขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางไม่เกิน 2 มิลลิเมตร ลงบนกระดาษสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป (FTA[®] card) ขนาดกว้างXยาว เท่ากับ 0.5X3 เซนติเมตร (การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอวิธีนี้ไม่จำเป็นต้องสกัดดีเอ็นเอ เนื่องจากกระดาษเป็นกระดาษที่ใช้สำหรับเก็บตัวอย่างในงานนิติวิทยาศาสตร์ซึ่งให้การยอมรับว่าใช้เซลล์จำนวนเล็กน้อย และใช้ตัวอย่างเลือดบนกระดาษที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเพียง 2 มิลลิเมตรเท่านั้น) ห้ามเลือดบริเวณที่เจาะเลือด และปล่อยนกคืนสู่ธรรมชาติ

3.3.2 การสกัดดีเอ็นเอ

เนื่องจากตัวอย่างที่เก็บได้มีทั้งเนื้อเยื่อและเลือด จึงแบ่งการสกัดดีเอ็นเอดังนี้

3.3.2.1 การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเนื้อเยื่อ

กรณีตัวอย่างเป็นขนผลัด จะสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเนื้อเยื่อที่ติดมากับปลอกขน โดยตัดบริเวณปลอกขนให้มีความยาวขนประมาณ 0.2 - 0.5 เซนติเมตร มาเพื่อสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ GF-1 tissue DNA extraction kit (Vivantis, Malaysia) โดยทำตามวิธีการและคู่มือจากบริษัท ดังนี้ นำเนื้อเยื่อบริเวณปลอกขนมาสับให้เป็นชิ้นเล็กๆ โดยใช้ DI water ปริมาตร 100 ไมโครลิตร หยดก่อนสับ เพื่อป้องกันการฟุ้งกระจายของตัวอย่าง หลังจากสับละเอียดแล้วนำไปใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 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 เป็นระยะเวลา 5 ชั่วโมง ทั้งนี้กลับหลอดไปมาทุกๆ 30 นาที เพื่อย่อยสลายเนื้อเยื่อ เมื่อครบเวลา เติม RNase A ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 10 นาที เพื่อย่อยสลายอาร์เอ็นเอ และเติม buffer TB ปริมาตร 620 ไมโครลิตร และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตเห็นไปใช้ประโยชน์ในการศึกษาไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นำไปป้อนที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 10 นาที จากนั้นเติม absolute ethanol ปริมาตร 200 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาทันที ย้ายสารละลายทั้งหมดใส่ลงใน collection tube ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 7,000 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 1 นาที ทิ้งส่วนใส จากนั้นเติม wash buffer ปริมาตร 650 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 7,000 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 1 นาที ทิ้งส่วนใส ทำซ้ำขั้นตอน wash buffer อีกครั้ง ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 9,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้ column แห้ง จากนั้นย้าย column ไปที่หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม elution buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตร โดยปริมาตรนี้สามารถปรับได้ตามความเหมาะสมกับปริมาณเนื้อเยื่อที่นำมาสกัด ปล่อยให้ไว้นาน 2 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 7,000 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 1 นาที นำ column ออก เมื่อได้ดีเอ็นเอตรวจสอบคุณภาพและปริมาณ เก็บดีเอ็นเอที่ได้ไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในขั้นตอนการตรวจเพศและศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิคทางโมเลกุลต่อไป

3.3.2.2 การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือด

นำเลือดปริมาตร 10 - 20 ไมโครลิตร ที่ได้จากการเจาะเลือด และเก็บด้วย Haematocrit tube ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร มาสกัดดีเอ็นเอด้วยชุด GF-1 Blood kit (Vivantis, Malaysia) โดยทำตามวิธีการและคู่มือจากบริษัท โดยการเติม BB buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และ Proteinase K ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมกันโดยกลับหลอดเบาๆ แล้วนำไปป้อนที่ Water bath ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 5 ชั่วโมง โดยกลับหลอดทุก 30 นาที เมื่อครบเวลาเติม Rnase A ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร แล้วนำไปป้อนใน Incubator ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 นาที เมื่อครบเวลา เติม absolute ethanol ที่เย็นจัด ปริมาตร 200 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาทันที จากนั้นนำสารละลายทั้งหมดใส่ลงใน collection tube ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 7,000 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 1 นาที ทิ้งส่วนใสใน collection tube จากนั้นเติม wash buffer 1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 7,000 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 1 นาที ทิ้งส่วนใส และเติม wash buffer 2 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 7,000 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 1 นาที ทิ้งส่วนใส และทำซ้ำอีกครั้ง ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 3 นาที เพื่อให้ column แห้ง จากนั้นย้าย column ไปที่หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม elution buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตร โดยปริมาตรนี้สามารถปรับได้ตามความเหมาะสมกับปริมาณเลือดที่นำมาสกัด ปล่อยให้ไว้นาน 2 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 7,000 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 1 นาที นำ column ออก เมื่อได้ดีเอ็นเอตรวจสอบคุณภาพและปริมาณ เก็บดีเอ็นเอที่ได้ไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในขั้นตอนการตรวจเพศ และศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิคทางโมเลกุลต่อไป

นำดีเอ็นเอที่สกัดในข้อที่ 3.3.2.1 และ 3.3.2.2 มาตรวจสอบคุณภาพด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยเตรียมเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ TBE buffer ความเข้มข้น 1X ละลายให้เข้ากันด้วยการให้ความร้อนจากไมโครเวฟ ทิ้งไว้ให้อุ่นก่อนเทลงบนถาดที่มีหัวเสียบ รอให้เจลแข็ง ย้ายเจลลงใน chamber ของเครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิส เติม TBE buffer ความเข้มข้น 1X ให้ท่วมเจล เตรียม 6X loading dye ให้มีความเข้มข้นเป็น 3X โดยการผสม deionized water จากนั้นผสมดีเอ็นเอตัวอย่างปริมาณ 3 ไมโครลิตร กับ loading dye ความเข้มข้น 3X ปริมาตร 3 ไมโครลิตร ให้เข้ากันบนแผ่น parafilm หรือหลอดทดลอง และหยอดลงในหลุมเจลที่เตรียมไว้ เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1 กิโลเบส ปริมาตร 2 ไมโครลิตร แยกขนาดขึ้นดีเอ็นเอด้วยความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที นำเจลไปย้อมด้วย ethidium bromine ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นระยะเวลา 5 นาที จากนั้นย้ายไปแช่ในน้ำกลั่นเป็นระยะเวลา 10 นาที นำเจลไปตรวจสอบภายใต้แสงยูวีด้วยเครื่อง gel documentation และถ่ายภาพด้วยโปรแกรม GeneSnap

ในการตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสง ให้เตรียมตัวอย่างดีเอ็นเอ ปริมาตร 3 ไมโครลิตร ผสมกับน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 297 ไมโครลิตร (dilution factor = 100) ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นดูดสารละลายทั้งหมดใส่ลงบนคิวเวท นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer โดยใช้ น้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วเป็นค่ามาตรฐาน (blank) คำนวณความเข้มข้นของดีเอ็นเอจากสูตร

$$\text{ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ } (\mu\text{g/ml}) = A_{260} \times 50 \mu\text{g/ml} \times \text{dilution factor}$$

3.3.3 การทำให้กระดาษ FTA card บริสุทธิ์

ในกรณีเก็บตัวอย่างเลือดลงบนกระดาษ FTA จะต้องนำกระดาษ FTA มาทำให้บริสุทธิ์ ก่อนที่จะนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยไม่ต้องผ่านขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ ซึ่งเหมาะแก่การนำมาใช้ ในการระบุเพศ เนื่องจากใช้ปริมาณเลือดเพียงเล็กน้อยสัมผัสกับกระดาษ FTA และเป็นวิธีที่รวดเร็ว เนื่องจากมีเพียงขั้นตอนการทำให้กระดาษ FTA บริสุทธิ์ โดยตัดแปลงวิธีการทำให้ดีเอ็นเอในกระดาษ บริสุทธิ์จากสุพัตรา และคณะ (2012) เริ่มจากการทำความสะอาดหัวเจาะกระดาษหรือ poucher ขนาด 2 มิลลิเมตร ด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ รอให้แห้ง หรือทำความสะอาด poucher โดย นำไปเจาะบนกระดาษ FTA ในตำแหน่งที่ไม่มีตัวอย่างเลือด เพื่อเป็นการกำจัดเศษฝุ่นหรือสิ่งสกปรกที่ ยังตกค้าง หลังจากนั้นใช้ poucher เจาะกระดาษ FTA บริเวณที่มีตัวอย่างเลือดใส่ลงในหลอดทดลอง ขนาด 0.2 มิลลิลิตร เติมสาร FTA purification reagent (Whatman, UK) ปริมาตร 125 ไมโครลิตร นำไป Vortex ซึ่งสาร FTA purification reagent จะมีคุณสมบัติในการชะล้างสิ่งสกปรก และเศษของเซลล์ที่ติดค้างบนกระดาษ FTA ให้หลุดออก แล้วนำไปป้อนด้วยเครื่อง Heatbox ที่ อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลานำไป vortex และดูดสารละลาย ออก และใส่สาร FTA purification reagent ปริมาตร 125 ไมโครลิตร แล้วนำไปป้อนที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 10 นาทีอีกครั้ง จากนั้นหยุดการทำงานของสาร FTA purification

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่เชิงพาณิชย์
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

reagent ด้วย TE buffer ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 125 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ดูดสารละลายออก และใส่ TE buffer ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 125 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 10 นาที ที่อุณหภูมิห้องอีกครั้ง จากนั้นดูด TE buffer ออกให้หมด ก่อนจะนำหลอดทดลองที่มีตัวอย่างซึ่งผ่านการทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์แล้วไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง Heat box ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5-10 นาที หรือจนกว่าจะแห้งสนิท ซึ่งสังเกตได้จากเมื่อทำการดีดหลอดทดลองแล้วกระดาษไม่ติดที่หลอดทดลอง จากนั้นนำกระดาษ FTA ไปใช้ในการระบุเพศด้วยเทคนิคทางโมเลกุลต่อไป

3.3.4 การระบุเพศด้วยเทคนิคทางโมเลกุล

ในงานวิจัยนี้ได้คัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมกับการระบุเพศ ประกอบด้วย 3 คู่ คือ P2/P8 (Griffiths และคณะ, 1998) 1237L/1272H (Kahn และคณะ, 1998) และ 2550F/2718R (Fridolfsson และ Ellegren, 1999) ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในตำแหน่งยีน *CHD* นำมาทดสอบกับตัวอย่างนกนางแอ่นบ้าน 2 ตัวอย่าง เปรียบเทียบกับตัวควบคุมที่ทราบเพศแล้ว (ไก่เพศผู้และเพศเมีย) จากนั้นนำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเลือดหรือขนความเข้มข้น 300 นาโนกรัม กับสารละลายที่เป็นส่วนประกอบในการทำ PCR ดังนี้ *2X Taq master mix* ปริมาตร 12.5 ไมโครลิตร คู่ไพรเมอร์ความเข้มข้น 20 พิโคโมล/ไมโครลิตร อย่างละ 4 ไมโครลิตร ใช้ *Nuclease free water* 1.5 ไมโครลิตร เพื่อเป็นตัวปรับปริมาตรให้แต่ละหลอดมีปริมาตรครบ 25 ไมโครลิตร เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยกำหนดสภาวะ ซึ่งดัดแปลงจาก Wang *et al.* (2007) จากนั้นแปลผลด้วยวิธีอิเล็กทรอนิกส์ด้วยอะกาโรสเจลความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ เพื่อแยกความแตกต่างระหว่างเพศ หลังจากที่ได้คู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสมแล้วจะนำมาระบุเพศกับตัวอย่างนกนางแอ่นบ้านทุกตัวอย่างที่สุ่มเก็บได้สำหรับในกรณีระบุเพศจากดีเอ็นเอบนกระดาษ FTA ให้นำหลอดตัวอย่างกระดาษ FTA ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วมาเติมสารเคมีในแต่ละหลอดให้มีปริมาตร 25 ไมโครลิตร ได้แก่ *2X Taq master mix* 12.5 ไมโครลิตร คู่ไพรเมอร์ความเข้มข้น 20 พิโคโมล/ไมโครลิตร อย่างละ 4 ไมโครลิตร และใช้ *Nuclease free water* 4.5 ไมโครลิตร ซึ่งเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมดังตารางที่ 3.3 และแปลผลโดยใช้อะกาโรสความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ถ้าปรากฏ 2 แถบ แปลผลว่าเป็นเพศเมีย แต่ถ้าปรากฏ 1 แถบ แปลผลว่าเป็นเพศผู้

ตารางที่ 3.3 ขั้นตอน อุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตำแหน่งยีน
CHD

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (วินาที)	จำนวน (รอบ)
Initial denaturation	95	300	1
Denaturation	95	60	
Annealing	50	60	35
Extension	72	60	
Final extension	72	600	1
Cool down	4	-	-

3.3.5 การวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางสัณฐานวิทยากับเพศ

เมื่อได้ผลการระบุเพศทางโมเลกุลแล้วจึงนำข้อมูลการระบุเพศของตัวอย่างจำนวน 147 ตัวอย่าง มาหาความสัมพันธ์กับข้อมูลทางสัณฐานวิทยาของนกนางแอ่นบ้านจำนวน 10 ลักษณะ ได้แก่ ความยาวปาก ความยาวหัวถึงปาก ความยาวปีก ความยาวหน้าแข้ง ความเว้าลึกของขนหาง ความยาวของขนหางคู่ใน ความยาวของขนหางคู่นอก ความยาวจุดแต้มขาวบนขนหางคู่นอก น้ำหนัก และพื้นที่ของจุดแต้มขาวบนขนหางคู่นอก โดยความยาวมีหน่วยเป็นมิลลิเมตร น้ำหนักมีหน่วยเป็นกรัม และพื้นที่ของจุดแต้มขาวบนขนหางคู่นอก มีหน่วยเป็นตารางมิลลิเมตร นำมาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ด้วยโปรแกรม R x 64 3.4.0 และโปรแกรม Rapid Miner Studio (Rai และคณะ, 2014) ที่เปรียบเทียบกับการระบุเพศด้วยเทคนิคทางโมเลกุล เพื่อหาลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่สัมพันธ์กับเพศ และเหมาะสมในการใช้ระบุเพศนกนางแอ่นบ้านในภาคสนาม นอกจากนี้ยังสังเกตสีขนบริเวณอกของนกนางแอ่นบ้าน โดยมี 5 รูปแบบ ได้แก่ สีส้มเข้ม สีส้มปานกลาง ออกสีส้มอ่อนปลายส่วนล่างสีส้มเข้ม สีส้มอ่อน และสีขาว จากนั้นวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างสีขนบริเวณอกกับเพศที่ระบุด้วยเทคนิคทางโมเลกุล

3.3.6 การศึกษาความหลากหลายด้วยเทคนิค iPBS

ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายโมเลกุลชนิด inter-Primer Binding Site (iPBS) โดยการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับบริเวณที่อนุรักษ์สูง (highly conservative sequences) ที่เรียกว่า inter-Primer Binding Site ระหว่างการจำลองดีเอ็นเอของ retroviruses โดยใช้ไพรเมอร์ และอุณหภูมิ annealing ตามการศึกษาของ Kalendar และคณะ (2010) ในเบื้องต้นทำการคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมจากไพรเมอร์ทั้งหมดจำนวน 83 ไพรเมอร์ (Kalendar และคณะ, 2010) คัดเลือกมาจำนวน 40 ไพรเมอร์ โดยพิจารณาตามค่าเฉลี่ยประสิทธิภาพการทำ PCR ในข้าวบาเลย์ และวิว ที่ตีทั้งในพืชและสัตว์ โดยจัดกลุ่มของไพรเมอร์ตามค่าอุณหภูมิ Annealing อยู่ในช่วง 51 - 62 องศาเซลเซียส เพื่อให้ง่าย และรวดเร็วในการทดลอง ดังเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แสดงในตารางที่ 3.2 นำมาทดสอบกับนกนางแอ่นบ้านจำนวน 4 ตัวอย่าง โดยเลือกจากสี่ชนบริเวณหน้าอกที่แตกต่างกัน จาก 2 จังหวัดที่ใช้เก็บตัวอย่าง คือ อำเภอบัว จังหวัดน่านจำนวน 2 ตัวอย่าง และเขตบางรัก จังหวัดกรุงเทพมหานครจำนวน 2 ตัวอย่าง โดยมีสารละลายที่เป็นส่วนประกอบในการทำ PCR ซึ่งมีปริมาตรสุดท้าย 20 ไมโครลิตร ประกอบไปด้วยตัวอย่างดีเอ็นเอความเข้มข้น 100 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ไพรเมอร์ความเข้มข้น 20 พิโคโมลต่อไมโครลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร 10X Standard Taq reaction buffer ปริมาตร 2 ไมโครลิตร 1.25 mM dNTPs ปริมาตร 4 ไมโครลิตร 5000 U/ml Taq DNA polymerase ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร 50 mM MgCl₂ ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร DI water ปริมาตร 11.6 ไมโครลิตร แล้วเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเครื่อง Thermal cycler ตามสภาวะดังแสดงในตารางที่ 3.4 (ดัดแปลงจากวิภารัตน์, 2558)

ตารางที่ 3.4 ขั้นตอน อุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในเทคนิค iPBS

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (วินาที)	รอบ
Initiation denaturation	95	180	1
Denaturation	95	15	
Annealing	51-62	60	30
Extension	68	60	
Final extension	72	300	1

จากนั้นวิเคราะห์ผลด้วยวิธีอิเล็กทรอนิกส์ โดยใช้อะกาโรสเจลความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ และวิเคราะห์หาไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการศึกษาความหลากหลาย ซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่ให้แถบแบนที่หลากหลาย และชัดเจน สามารถแยกความแตกต่างของนกทั้ง 4 ตัวอย่างได้ โดยแปลผลเป็นค่าคะแนนแบบ Binary เมื่อปรากฏแถบแบนจะให้ค่าคะแนนเป็น 1 ถ้าไม่ปรากฏแถบแบนจะให้ค่าคะแนนเป็น 0 หลังจากนั้นวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ของ Polymorphic fragment ซึ่งจะเลือกไพรเมอร์ที่ค่าเข้าใกล้ 100 เปอร์เซ็นต์มากที่สุด เมื่อคัดเลือกคู่ไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและนับแถบได้แล้ว จากนั้นนำคู่ไพรเมอร์ที่ได้ไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในทุกๆตัวอย่าง โดยทดสอบกับตัวอย่างของนกนางแอ่นบ้านจากจังหวัดน่านจำนวน 15 ตัวอย่าง และกรุงเทพมหานครจำนวน 15 ตัวอย่าง รวมจำนวน 30 ตัวอย่าง

วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยแปลผลขนาดชิ้นดีเอ็นเอ หรือแถบดีเอ็นเอของแต่ละไพรเมอร์โดยการให้คะแนนแบบ binary data matrix โดยให้คะแนนเป็น 1 เมื่อมีการปรากฏของแถบดีเอ็นเอ และให้คะแนนเป็น 0 เมื่อไม่มีการปรากฏของแถบดีเอ็นเอ ณ ตำแหน่งเดียวกันของแต่ละตัวอย่าง นำคะแนนที่ได้มาคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนด้วยวิธี simple matching และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี Unweighted pair-group method เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่บนสื่อออนไลน์ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

using arithmetic average (UPGMA) แสดงผลในรูปแบบ dendrogram โดยใช้โปรแกรม NTSYSpc version 2.10m

3.3.7 การระบุยีนด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์

หลังการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ทำการสุ่มตัวอย่างจากจังหวัดน่าน จำนวน 14 ตัวอย่าง และตัวอย่างจากกรุงเทพมหานครจำนวน 10 ตัวอย่าง โดยคัดเลือกจากลักษณะ สีขนบริเวณอกที่แตกต่างกัน มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของ mitochondrial protein-coding คือยีน *nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase subunit 2 (ND2)* หรือ *cytochrome b (Cyt-b)* เพื่อระบุยีนและศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยลำดับ นิวคลีโอไทด์ (Dor และคณะ, 2010) โดยในตำแหน่งยีน *ND2* ใช้ไพรเมอร์ METb (CGAAAATGATGGTTTAACCCCTTCC) และ TRPc (CGGACTTTAGCAGAACTAAGAG) (Hunt และคณะ, 2001) และสำหรับยีน *Cyt-b* ใช้ไพรเมอร์ ProgND5F (CACTCTGGCCTAATCAAGTCCTAC) และ ProgCBR (GGCAGTCTTCAATCTTTGGC) (Dor และ คณะ, 2010) โดยมีดีเอ็นเอที่ความเข้มข้น 100 นาโนกรัม ปริมาตร 1 ไมโครลิตร 10X Standard *Taq* reaction buffer ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร 50 mM MgCl₂ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ไพรเมอร์แต่ละความเข้มข้น 20 พิโคโมล/ไมโครลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร 5000 ยูนิต/มิลลิลิตร *Taq* polymerase ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร 1.25 mM dNTPs ปริมาตร 4 ไมโครลิตร แล้วปรับปริมาตร ด้วยน้ำ DI water ให้มีปริมาตรสุดท้ายในแต่ละหลอดเป็น 25 ไมโครลิตร หลังจากนั้นนำเข้าเครื่อง Thermal cycler มีสภาวะดัดแปลงตามงานวิจัยของ Lovette and Rubenstein (2007) โดยมีการ ใช้ค่า Annealing temperature (T_a) อยู่ในอุณหภูมิ 54 - 62 องศาเซลเซียส แล้วเพิ่มปริมาณสาร พันธุกรรม โดยมีสภาวะดังนี้ Initial Denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ Denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที Annealing ที่ อุณหภูมิ 54-62 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที จำนวน 30-35 รอบ และ Final Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ดังตารางที่ 3.5 นำผลผลิตพีซีอาร์มาแยกขนาดด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้เจลอะ กาโรสเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลาย 1XTBE buffer เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.5 ขั้นตอน อุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน *ND2* และ *Cyt-b*

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (วินาที)	รอบ
Initial denaturation	95	300	1
Denaturation	95	60	
Annealing	54-62	60	30-35
Extension	72	180	
Final extension	72	300	1
Cool down	4	-	-

จากนั้นจะวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้อะกาโรสเจล ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยบริษัท Bioneer ประเทศเกาหลีใต้ เมื่อได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ นำลำดับนิวคลีโอไทด์ไปเปรียบเทียบกับสิ่งมีชีวิตใกล้เคียงในตำแหน่งยีนเดียวกันจากฐานข้อมูล GenBank ของ NCBI โดยเฉพาะนกนางแอ่นบ้าน 6 สปีชีส์ย่อย จาก Dor *et al.* (2010) จากพื้นที่ต่างๆ ทั่วโลก จากนั้นวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม Bio Edit เวอร์ชัน 7.2.5 และแสดง Phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA 6 เพื่อระบุสปีชีส์ย่อยของนกนางแอ่นบ้านในประเทศไทย

3.3.8 การทำให้ผลผลิตพีซีอาร์บริสุทธิ์

การทำให้ผลผลิตพีซีอาร์บริสุทธิ์ด้วยชุด GF-1 AmbiClean Kit (PCR & Gel): Vivantis นำผลผลิตพีซีอาร์มาปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้มีปริมาตรเป็น 100 ไมโครลิตร เติมน้ำ buffer DB ปริมาตร 1: 1 โดยปริมาตร และผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมา เมื่อสารละลายเป็นเนื้อเดียวกันแล้ว ดูดสารละลายที่ได้ใส่ลงในคอลัมน์ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 7,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสที่อยู่ในที่รองรับด้านล่างทิ้ง ใส่ wash buffer ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 7,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสที่อยู่ในที่รองรับด้านล่างทิ้ง นำคอลัมน์ไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็วรอบ 7,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เพื่อกำจัดเอทานอลที่เป็นส่วนผสมของ wash buffer ออก เปลี่ยนคอลัมน์ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ แล้วเติม elution buffer หรือ TE buffer ปริมาตร 50 - 60 ไมโครลิตร โดยให้ท่วมแผ่นเมมเบรน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 2 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที จะได้สารละลายดีเอ็นเออยู่ในหลอดทดลองด้านล่าง ตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์หลังจากการทำให้บริสุทธิ์ ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ก่อนจะส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.9 การศึกษาหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากลำดับนิวคลีโอไทด์

ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) เพื่อการศึกษาเส้นทางการอพยพ และการระบุสปีชีส์ย่อย และโดยการสุ่มตัวอย่างนกนางแอ่นบ้านที่เก็บได้ทั้งในกรุงเทพมหานคร และจังหวัดน่าน และตัวอย่างนกที่ใช้เป็นตัวอย่างนอกสกุล (outgroup) จะนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากยีน *ND2* และ *Cyt-b* ส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยบริษัท Bioneer ประเทศเกาหลีใต้ เมื่อได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ นำนิวคลีโอไทด์ที่ได้มา Blast เปรียบเทียบกับข้อมูลที่อยู่ในฐานข้อมูล GenBank ของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) โดยเฉพาะลำดับนิวคลีโอไทด์ของนกนางแอ่นบ้านทั้ง 6 สปีชีส์ย่อยจากทั่วโลก (ไม่มีตัวอย่างที่เก็บจากทวีปเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และประเทศไทย) จากการศึกษาของ Dor และคณะ (2010) เพื่อระบุสปีชีส์ย่อยของตัวอย่าง จากนั้นวิเคราะห์และจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม Bioedit และ ClustalX วิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยใช้ชุดโปรแกรม MEGA 6 ซึ่งจะได้ Phylogenetic tree เพื่อใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม ระบุสปีชีส์ย่อยของนกนางแอ่นบ้าน รวมทั้งอาจให้ผลถึงเส้นทางการอพยพของนกนางแอ่นบ้านที่อพยพมาในประเทศไทย



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

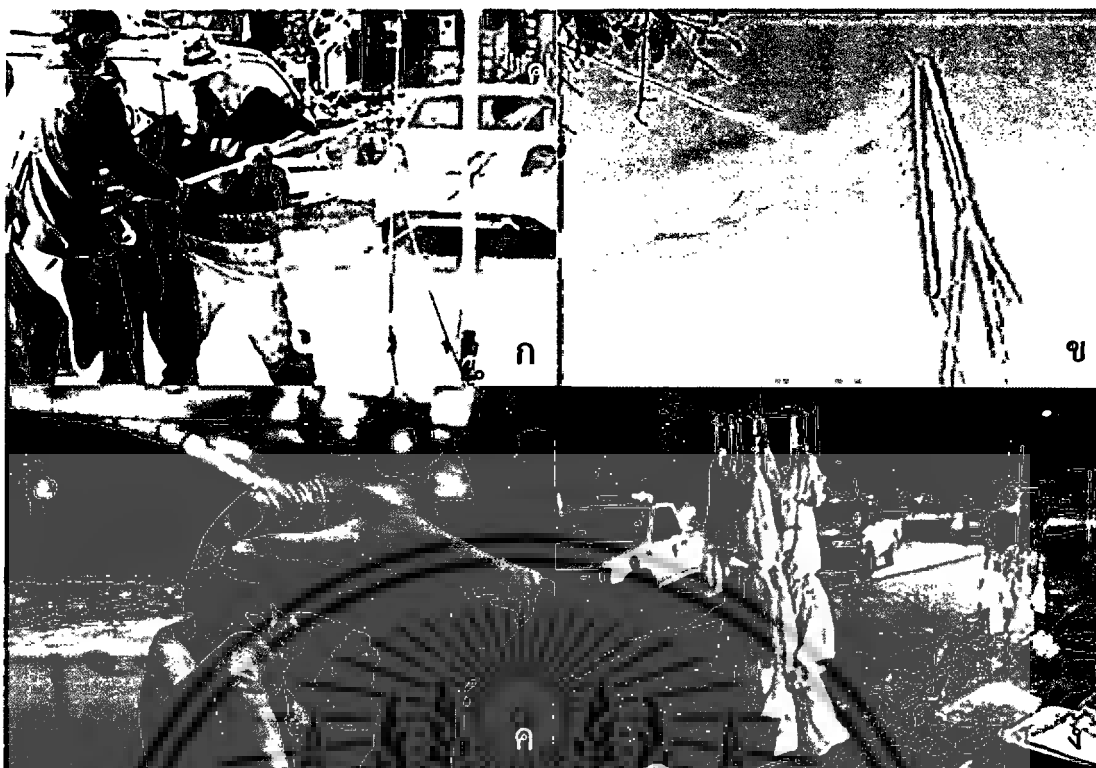
4.1 ผลการเก็บตัวอย่างนกนางแอ่นบ้าน

จากการลงพื้นที่เก็บตัวอย่างนกนางแอ่นบ้านบริเวณอำเภอปัว จังหวัดน่าน (รหัสในการทดลอง: NBS) และถนนสีลมกรุงเทพมหานคร (รหัสในการทดลอง: BS) ภายใต้การดูแลของกรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช และสถานีวิจัยสัตว์ป่าบึงบอระเพ็ด สามารถดักจับนกนางแอ่นบ้านได้ ตัวอย่างทั้งสิ้น 2,283 ตัว สุ่มมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้จำนวน 150 ตัว คิดเป็น 6.57 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในตารางที่ 4.1 และ 4.2 ส่วนการติดตั้งตาข่ายดักนกนางแอ่นบ้าน ทำโดยชิงตาข่ายติดกับแท่งสแตนเลส แล้วใช้เชือกไนลอนผูกแท่งสแตนเลสกับเสาหรือต้นไม้ ดังรูปที่ 4.1 ก เพื่อขวางบริเวณที่นกบินผ่านเป็นประจำ ดังรูปที่ 4.1 ข เมื่อนกติดตาข่ายต้องรีบนำนกออกจากตาข่าย ดังรูปที่ 4.1 ค หลังจากนั้นนำนกพักในถุงผ้า ดังรูปที่ 4.1 ง ทั้งนี้ในงานวิจัยนี้จะเก็บตัวอย่างเลือด และขนของนกนางแอ่นบ้านที่ติดห้วงขา โดยการติดห้วงขาจะเป็นประโยชน์ในการศึกษาข้อมูลด้านประชากร และนิเวศวิทยาต่อไป

ลักษณะทั่วไปของนกนางแอ่นบ้าน เป็นนกลำตัวเพรียวเล็ก ขนาดประมาณ 14 - 15 เซนติเมตร ปากมีสีดำ นกตัวเต็มวัยมีลำตัวด้านบนและแถบคาดอกสีน้ำตาลเงินเหลือดำ (รูปที่ 4.2 ก) หน้าผาก (รูปที่ 4.2 ข) และคอสีน้ำตาลแดง ลำตัวด้านล่างสีขาว ส้มอ่อนถึงส้มเข้ม (รูปที่ 4.2 ค) ขาและหางมีสีดำ หางเป็นแฉกเว้าลึก เมื่อแผ่หางออกจะมีจุดแต้มขาวบนขนหางแต่ละเส้นและลักษณะของจุดแต้มขาวมีลักษณะรี โดยขนหางคู่บนยาวที่สุด (รูปที่ 4.2 ง)

จากตารางพบว่าสามารถดักจับนกตัวที่เคยใส่ห้วงขา หรือเรียกว่า Retrapping มีจำนวนทั้งหมด 40 ตัว ซึ่งในจำนวน 150 ตัว พบ Retrapping จำนวน 2 ตัว ได้แก่ รหัสทดลอง NBS19 ใส่ห้วงขาวันที่ 9 ธันวาคม 2557 ที่จังหวัดน่าน และจับได้ซ้ำวันที่ 22 ธันวาคม 2558 ที่จังหวัดน่าน ส่วนรหัสทดลอง BS87 ใส่ห้วงขาวันที่ 10 มีนาคม 2557 ที่กรุงเทพมหานคร และจับได้ซ้ำวันที่ 11 มกราคม 2559 ที่กรุงเทพมหานคร โดยจากข้อมูล Retrapping ไม่พบการปะปนกันระหว่างนกจากจังหวัดน่านและกรุงเทพมหานคร แสดงให้เห็นถึงพฤติกรรมการอพยพของนกนางแอ่นบ้านที่มีการบินกลับมายังแหล่งที่อยู่อาศัยเดิม โดยข้อมูลการศึกษาในครั้งนี้สนใจศึกษาเพศ และความหลากหลายของนกนางแอ่นบ้านใน 2 จังหวัดนี้เท่านั้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.1 อุปกรณ์ วิธี Mist net ที่ใช้ในการดักจับนกนางแอ่นบ้าน: (ก) การซึงตาข่ายกับแห่งสแตนเลส (ข) การตั้งตาข่าย (ค) การนำนกออกจากตาข่าย (ง) ถุงพักนก
(ที่มา: รูปถ่ายโดย วรณิภา วิศว์วิสุทธิ์, 2559)

ตารางที่ 4.1 จำนวนตัวอย่างนกนางแอ่นบ้านที่ดักจับได้

สถานที่	วันที่เก็บตัวอย่าง	จำนวน (ตัว)	จำนวนที่จับได้ซ้ำ (Retrapping)	จำนวนนกที่ใช้ศึกษา (ตัว)
จังหวัดน่าน	22-23 ธ.ค. 2558	1881	19	120
กรุงเทพมหานคร	11 ม.ค. 2559	402	21	30
รวม	-	2,283	40	150

ตารางที่ 4.2 จำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

สถานที่	วันที่เก็บตัวอย่าง	ตัวอย่างในการศึกษา	ตัวอย่างที่มีการสังเกตลักษณะสัณฐานวิทยา	ตัวอย่างที่มีการสังเกตสีขนบริเวณอก
จังหวัดน่าน	22-23 ธ.ค. 2558	120	117	117
กรุงเทพมหานคร	11 ม.ค. 2559	30	30	29
รวม	-	150	147	146

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของนกนางแอ่นบ้านตัวเต็มวัย: (ก) สีของลำตัว (ข) หน้าผาก (ค) คอ และท้อง (ง) สีขนหางและจุดแต้มขาวบนขนหาง
(ที่มา: รูปถ่ายโดย อรณิชา ตีสิทธิ์เวช, 2558)

ในงานวิจัยนี้มีการเก็บตัวอย่างทั้งหมด 3 รูปแบบ ได้แก่ รูปแบบที่ 1 เนื้อเยื่อบริเวณปลอกขน ซึ่งเก็บจากขนผลัดบริเวณปีก รูปแบบที่ 2 เจาะเลือดบริเวณเส้นเลือดจากขานก ซึ่งเป็นบริเวณที่ปลอดภัยในนกขนาดเล็ก (Owen, 2011) และเก็บตัวอย่างเลือดด้วย Capillary tube รูปแบบที่ 3 เจาะเลือดบริเวณเส้นเลือดจากขานก และเก็บตัวอย่างเลือดด้วยกระดาษ FTA โดยในการเก็บตัวอย่างกรณีที่ 1 จะเลือกใช้รูปแบบที่ 1 เป็นอันดับแรก เพราะการเก็บขนผลัดบริเวณปีกทำให้นักได้รับความบาดเจ็บน้อยที่สุด โดยได้ตีเอ็นเอที่มากเพียงพอในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมเพื่อการศึกษาเพศนกนางแอ่นบ้าน แต่มีข้อจำกัดจากการใช้ตีเอ็นเอในรูปแบบที่ 1 คือ ไม่สามารถใช้ในการศึกษาความหลากหลายและระบุสปีชีส์ย่อยของนกนางแอ่นบ้าน เพราะการใช้ตีเอ็นเอจากขนผลัดนี้อาจเกิดการเอกสารนี้เป็นเอกสารที่ส่งวนไว้มากเกินไปสำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปนเปื้อนจากเชื้อโรคต่างๆที่ติดมากับขนนก ในกรณีที่ 2 หากไม่พบขนผลัดบริเวณปีกของนกนางแอ่นบ้าน จะเลือกใช้รูปแบบที่ 2 คือเจาะเลือดบริเวณเส้นเลือดจากขานก โดยจะใช้ Capillary tube เก็บหยดเลือดปริมาณ 20 - 30 ไมโครลิตร แม้ว่าการเก็บตัวอย่างจากรูปแบบที่ 2 นกจะได้รับความบาดเจ็บเล็กน้อย และไม่สามารถเก็บเลือดไว้ได้นาน ซึ่งต้องมีการรักษาอายุของเลือดโดยเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส แต่ปริมาณดีเอ็นเอที่ได้จากเลือดนี้มีปริมาณเพียงพอที่สามารถนำไปใช้ในการศึกษาเพศและศึกษาความหลากหลายพร้อมทั้งระบุสปีชีส์ย่อยในนกนางแอ่นบ้านได้ ส่วนในกรณีที่ 3 หากเจาะเลือดนกบริเวณเส้นเลือดที่ขาแล้วได้ปริมาณเลือดเพียงเล็กน้อย (ไม่ถึง 20 ไมโครลิตร) จะเก็บตัวอย่างในรูปแบบที่ 3 ด้วยกระดาษ FTA โดยตัวอย่างนั้นจะไม่นำมาศึกษาความหลากหลายและระบุสปีชีส์ย่อย เนื่องจากปริมาณดีเอ็นเอที่ได้ไม่เพียงพอในการวิเคราะห์ แต่การเก็บตัวอย่างเลือดด้วยกระดาษ FTA สามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องได้นาน และใช้ในการศึกษาเพศนกได้ แต่หากได้ปริมาณเลือดน้อยจนเกินไปก็ไม่สามารถระบุเพศได้เนื่องจากมีปริมาณดีเอ็นเอไม่เพียงพอในการวิเคราะห์ ดังนั้นในการเก็บตัวอย่างของนกควรต้องประเมินสถานการณ์ในการเก็บตัวอย่างในนกแต่ละตัว อีกทั้งต้องคำนึงถึงการใช้ประโยชน์หรือผลเสียของแต่ละรูปแบบในการประยุกต์ใช้ในงานทางโมเลกุล

จากการเก็บตัวอย่างทั้ง 3 รูปแบบ สังเกตพบว่านกนางแอ่นบ้านมีลักษณะสีขนที่หลากหลาย ซึ่งจากงานวิจัยของ Tuner (2004) สามารถแบ่งลักษณะสีขนบริเวณอกของนกนางแอ่นบ้านในฤดูผสมพันธุ์เป็น 6 ลักษณะที่มีความสัมพันธ์กับสปีชีส์ย่อย ได้แก่ *Hirundo rustica rustica* ออกสีขา *H. r. gutturalis* ออกสีส้มปนขาว *H. r. tytleri* ออกสีส้มเข้ม *H. r. transitiva* ออกสีส้มปานกลาง *H. r. savignii* ออกสีน้ำตาล และ *H. r. erythrogaster* ออกสีส้มอ่อน โดยนกนางแอ่นบ้าน จากจังหวัดน่าน และกรุงเทพมหานคร พบลักษณะสีขนบริเวณอกแบ่งได้เป็น 5 ลักษณะได้แก่ ออกสีส้มเข้ม (รูปที่ 4.3 ก) ออกสีส้มปานกลาง (รูปที่ 4.3 ข) ออกสีส้มอ่อนปลายส่วนล่างสีส้มเข้ม (รูปที่ 4.3 ค) ออกสีส้มอ่อน (รูปที่ 4.3 ง) และออกสีขา (รูปที่ 4.3 จ) โดยในการสังเกตสีขนบริเวณอกไม่สามารถจำแนกสปีชีส์ย่อยได้เนื่องจากนกนางแอ่นบ้านบ้านที่พบในประเทศไทยเป็นนกในฤดูอพยพ จึงมีการผลัดขนเพื่อสร้างขนชุดใหม่ ทำให้ลักษณะของสีขนบริเวณอกมีการเปลี่ยนแปลง (Sarah, 2007)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.3 ลักษณะสีขนบริเวณอกนกนางแอ่นบ้าน ซึ่งแบ่งออกเป็น 5 ลักษณะ คือ (ก) ส้มเข้ม (ข) ส้มปานกลาง (ค) ออกสีส้มอ่อน ปลายส่วนล่างสีส้มเข้ม (ง) ส้มอ่อน (จ) ขาว

4.2 ผลการระบุเพศนกนางแอ่นบ้านด้วยเทคนิคทางโมเลกุล

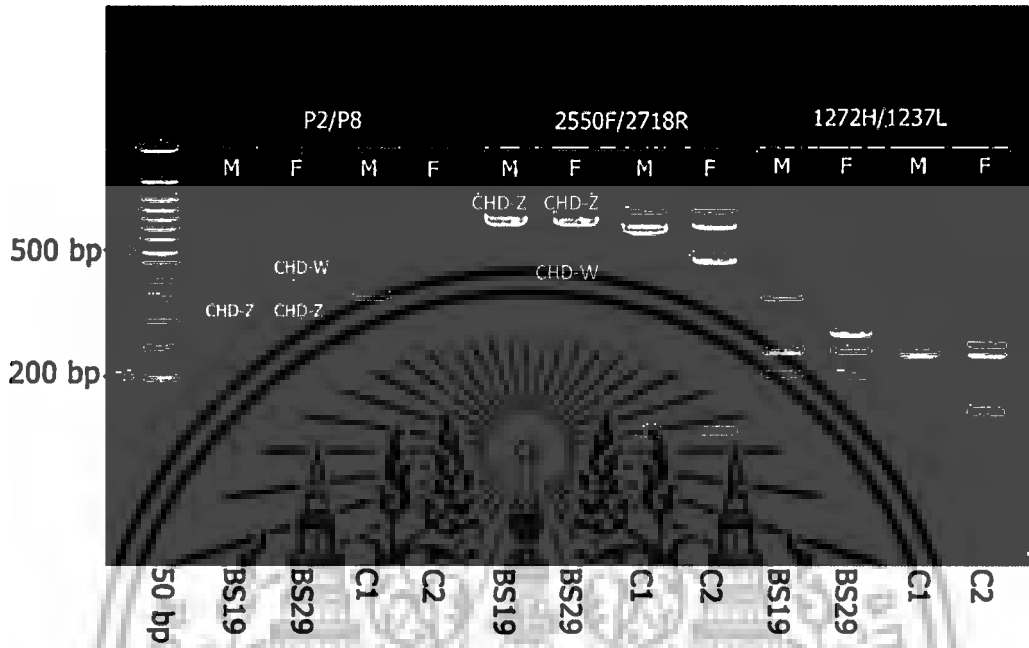
4.2.1 สภาวะและไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการระบุเพศนกนางแอ่นบ้าน

จากการศึกษาก่อนหน้านี้ได้สุ่มเลือกนกนางแอ่นบ้านที่เก็บตัวอย่างในช่วงเดือนมกราคม 2558 ที่ถนนสีลม กรุงเทพมหานคร จำนวน 2 ตัวอย่าง คือ รหัส BS19 และ BS29 มาเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในตำแหน่งยีน *CHD* ด้วยไพรเมอร์จำนวน 3 คู่ คือ P2/P8, 2550F/2718R และ 1237L/1272H เปรียบเทียบกับตัวอย่างไก่ (*Gallus gallus*) ที่ทราบเพศแล้ว โดยรหัส C1 คือเพศผู้ และรหัส C2 คือ เพศเมีย ซึ่งใช้อุณหภูมิ Annealing 50 องศาเซลเซียส เมื่อตรวจสอบผลด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสโดยใช้อะกาโรสเจล 3 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ไพรเมอร์ P2/P8 สามารถระบุเพศนกนางแอ่นบ้านและไก่ได้อย่างชัดเจน โดยสามารถแยกความแตกต่างระหว่างเพศผู้และเพศเมีย คือเพศผู้ปรากฏ 1 แถบ ของอัลลิล *CHD-Z* และเพศเมียปรากฏ 2 แถบ ของอัลลิล *CHD-Z* และอัลลิล *CHD-W* ดังนั้น รหัส BS19 ระบุเป็นเพศผู้ ส่วนรหัส BS29 ระบุเป็นเพศเมีย ทั้งนี้ยังพบขึ้นดีเอ็นเอของอัลลิล *CHD-Z* ขนาด 350 คู่เบส ซึ่งมีขนาดเล็กกว่าขึ้นดีเอ็นเอของอัลลิล *CHD-W* ที่มีขนาด 400 คู่เบส โดยมีขนาดต่างกัน 50 คู่เบส และผลการตรวจสอบเพศไก่ (C1 และ C2) ที่เป็นตัวเปรียบเทียบพบขึ้นดีเอ็นเอของ *CHD-Z* มีขนาด 350 คู่เบส และขึ้นดีเอ็นเอของ *CHD-W* มีขนาด 360 คู่เบส มีขนาดขึ้นดีเอ็นเอต่างกัน 10 คู่เบส

สำหรับไพรเมอร์ 2550F/2718R เมื่อนำมาใช้ในการตรวจสอบเพศในไก่เพศผู้ พบขึ้นดีเอ็นเอ 3 แถบ ได้แก่ ขนาด 700, 600 และ 125 คู่เบส เพศเมียพบขึ้นดีเอ็นเอ 4 แถบ ได้แก่ ขนาด 700, 600, 475 และ 125 คู่เบส ส่วนนกนางแอ่นบ้านให้ขึ้นดีเอ็นเอของอัลลิล *CHD-Z* ขนาด 650 คู่เบส และอัลลิล *CHD-W* ขนาด 475 คู่เบส ซึ่งมีขนาดขึ้นดีเอ็นเอต่างกัน 175 คู่เบส แม้ว่าการใช้ไพรเมอร์นี้จะพบความแตกต่างระหว่างเพศผู้และเพศเมีย แต่งานวิจัยนี้ไม่เลือกใช้ไพรเมอร์

2550F/2718R ในระบุเพศนกนางแอ่นบ้านเพราะอัลลิล *CHD-W* ปรากฏแถบดีเอ็นเอจาง อาจทำให้เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไมอนุญาตให้นำไปเผยแพร่บนสื่อออนไลน์ ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เกิดการระบุเพศผิดพลาดได้ ส่วนการระบุเพศนกนางแอ่นบ้านและไก่ด้วยไพรเมอร์ 1272H/1237L ปรากฏแถบดีเอ็นเอจำนวนมาก ทำให้ยุ่งยากในการวิเคราะห์ผลเพศ ดังนั้นจึงไม่สามารถใช้ไพรเมอร์นี้ ในการระบุเพศนกนางแอ่นบ้านได้ ดังแสดงรูปที่ 4.4



รูปที่ 4.4 การเปรียบเทียบผลิตภัณฑ์ PCR ของนกนางแอ่นบ้าน (*Hirundo rustica*: BS19 และ BS29) และไก่ (*Gallus gallus*: C1 และ C2) ที่เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยไพรเมอร์ P2/P8, 1237L/1272H และ 2550F/2718R

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้ไพรเมอร์ P2/P8 ในการระบุเพศนกนางแอ่นบ้านซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Saino และคณะ (2002) และ Malaitad และคณะ (2015) ศึกษาเพศของนกนางแอ่นบ้านจากไพรเมอร์ P2/P8 เช่นกัน โดยพบขนาดชิ้นดีเอ็นเอของอัลลีล *CHD-Z* และอัลลีล *CHD-W* มีความแตกต่างกัน 50 คู่เบส มีงานวิจัยของ Jensen และคณะ (2003) ระบุเพศนกทั้งหมด 47 สปีชีส์ โดยใช้ไพรเมอร์ 2 คู่ คือ ไพรเมอร์ P2/P8 และไพรเมอร์ 1237L/1272H พบว่า จากการระบุเพศนกทั้งหมด ไพรเมอร์ P2/P8 สามารถระบุเพศได้ดีกว่า ไพรเมอร์ 1237L/1272H เนื่องจากมีความจำเพาะกับยีน *CHD* โดยมีขนาดชิ้นดีเอ็นเอแตกต่างกันระหว่างอัลลีล *CHD-Z* และอัลลีล *CHD-W* อยู่ในช่วง 15-50 คู่เบส รวมทั้งงานวิจัยของ De Marchi และคณะ (2012) ที่ศึกษาการระบุเพศนกหัวโตกินปู (*Dromas ardeola*) ใช้ไพรเมอร์ P2/P8 ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม และให้ชิ้นดีเอ็นเอของอัลลีล *CHD-Z* ขนาด 379 คู่เบส และชิ้นดีเอ็นเอของอัลลีล *CHD-W* ขนาด 396 คู่เบส โดยมีชิ้นดีเอ็นเอแตกต่างกันระหว่างอัลลีล *CHD-Z* และอัลลีล *CHD-W* 17 คู่เบส และนกกินหอยปากแดง (*Eurasian oystercatcher*) พบชิ้นดีเอ็นเอของอัลลีล *CHD-Z* ขนาด 380 คู่เบส และอัลลีล *CHD-W*

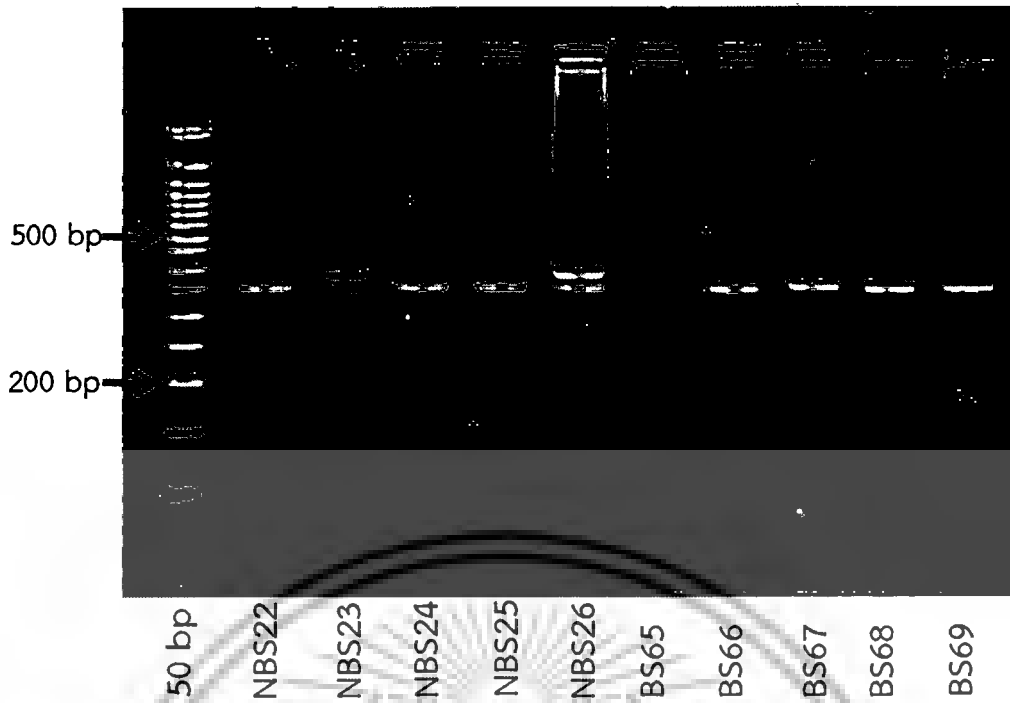
ขนาด 400 คู่เบส มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอต่างกัน 20 คู่เบส (Watson และคณะ, 2004) สำหรับการใส่ไพรเมอร์เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่โดยไม่ผ่านการยินยอมจากเจ้าของลิขสิทธิ์ หากต้องการนำเอกสารนี้ไปใช้

เมอร์ 1272H/1237L ในการระบุเพศนกนางแอ่นบ้าน ดังงานวิจัยของ Guerrini และคณะ (2014) ที่พบชนิดเอ็นเอของอัลลีล *CHD-Z* ขนาด 200 คู่เบส และอัลลีล *CHD-W* ขนาด 240 คู่เบส มีขนาดชนิดเอ็นเอต่างกัน 40 คู่เบส อย่างไรก็ตามความแตกต่างในชนิดเอ็นเอของอัลลีล *CHD-Z* และอัลลีล *CHD-W* พบน้อยกว่าการใช้ไพรเมอร์ P2/P8 ที่มีขนาดชนิดเอ็นเอต่างกันระหว่างอัลลีล *CHD-Z* และอัลลีล *CHD-W* จำนวน 50 คู่เบส

แม้ว่าไพรเมอร์ P2/P8 สามารถระบุเพศนกได้หลายชนิด แต่การระบุเพศนกบางชนิดด้วยไพรเมอร์ P2/P8 พบชนิดเอ็นเอของอัลลีล *CHD-Z* มีขนาดใกล้เคียงกับอัลลีล *CHD-W* โดยพบขนาดชนิดเอ็นเอของอัลลีล *CHD-Z* และอัลลีล *CHD-W* มีขนาดต่างกันเพียงเล็กน้อย โดยงานวิจัยนี้พบลักษณะดังกล่าวในการตรวจเพศไก่ที่ใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ (C1 และ C2) จึงจำเป็นต้องใช้เทคนิคอื่นในการระบุเพศให้ชัดเจนมากยิ่งขึ้น ดังเช่นงานวิจัยของ Sacchi และคณะ (2004) ระบุเพศเหยี่ยวนิ้วสั้น (*Circaetus gallicus*) พบชนิดเอ็นเอของอัลลีล *CHD-Z* ขนาด 378 คู่เบส และอัลลีล *CHD-W* 387 คู่เบส มีขนาดชนิดเอ็นเอต่างกัน 9 คู่เบส โดยแก้ปัญหาขนาดใกล้เคียงกันของอัลลีล *CHD-Z* และอัลลีล *CHD-W* ด้วยเทคนิค RFLP และงานวิจัย Ghorpade *et al.* (2012) ระบุเพศของแร้งเทาหลังขาว (*Gyp bengalensis*) พบชนิดเอ็นเอของอัลลีล *CHD-Z* มีขนาด 383 คู่เบส และอัลลีล *CHD-W* มีขนาด 389 คู่เบส มีชนิดเอ็นเอต่างกันเพียง 6 คู่เบส และแก้ไขขนาดที่ใกล้เคียงกันของอัลลีล *CHD-Z* และอัลลีล *CHD-W* ด้วยเทคนิค W-specific PCR

4.2.2 การระบุเพศนกนางแอ่นบ้าน

การระบุเพศนกนางแอ่นบ้านจำนวน 150 ตัวอย่าง จากการใช้ไพรเมอร์ P2/P8 และอุณหภูมิ Annealing 50 องศาเซลเซียส ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมบริเวณยีน *Chromohelicase-DNA-binding (CHD)* และแปลผลด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้อะกาโรสความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบขนาดชนิดเอ็นเอที่ปรากฏกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 50 คู่เบส สามารถทราบขนาดของดีเอ็นเอตัวอย่างได้ดังรูปที่ 4.5 โดยเพศผู้ปรากฏ 1 แถบ ของอัลลีล *CHD-Z* มีขนาด 350 คู่เบส ได้แก่ตัวอย่าง รหัส NBS22, NBS24, NBS25, BS66, BS67, BS68 และ BS69 ส่วนเพศเมียปรากฏ 2 แถบของอัลลีล *CHD-Z* มีขนาด 350 คู่เบส และอัลลีล *CHD-W* มีขนาด 400 คู่เบส ได้แก่ ตัวอย่างรหัส NBS23, NBS26 และ BS65



รูปที่ 4.5 การระบุเพศนกนางแอ่นบ้านด้วยไพรเมอร์ P2/P8 โดยใช้ฮอโมโลจิสความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ โดย M คือ เพศผู้ และ F คือ เพศเมีย (รหัส NBS = ตัวอย่างจากจังหวัดน่าน, รหัส BS = ตัวอย่างจากกรุงเทพมหานคร)

ทั้งนี้การใช้ไพรเมอร์ P2/P8 ในการระบุเพศนกนางแอ่นบ้านให้ผลสอดคล้องกับงานวิจัยของ Saino และคณะ (2002) ที่ศึกษาเพศของลูกนกนางแอ่นบ้าน และพบขนาดชิ้นดีเอ็นเอของอัลลีล *CHD-Z* ขนาด 350 คู่เบส ซึ่งมีขนาดเล็กกว่าชิ้นดีเอ็นเอของอัลลีล *CHD-W* ขนาด 400 คู่เบส โดยมีขนาดชิ้นดีเอ็นเอต่างกัน 50 คู่เบส นอกจากนี้ยังพบงานวิจัยของ Jensen และคณะ (2003) ที่ได้ศึกษาการระบุเพศนกทั้งหมด 47 สปีชีส์ โดยพบว่าสามารถใช้ไพรเมอร์ P2/P8 ในการระบุเพศระบุเพศนกดีกว่าไพรเมอร์ 1237L/1272H เนื่องจากไพรเมอร์ P2/P8 มีความจำเพาะกับยีน *CHD* มากกว่า โดยพบขนาดชิ้นดีเอ็นเอของอัลลีล *CHD-Z* และอัลลีล *CHD-W* ต่างกันอยู่ระหว่าง 15-50 คู่เบส มีรายงานของ Guerrini และคณะ (2014) ที่ใช้ไพรเมอร์ 1237L/1272H ในการระบุเพศนกนางแอ่นบ้านและพบชิ้นดีเอ็นเอของอัลลีล *CHD-Z* ขนาด 200 คู่เบส และ อัลลีล *CHD-W* ขนาด 240 คู่เบส ซึ่งมีความต่างของชิ้นดีเอ็นเอ 40 คู่เบส โดยน้อยกว่าการใช้ไพรเมอร์ P2/P8 ที่พบชิ้นดีเอ็นเอระหว่างอัลลีล *CHD-Z* กับ *CHD-W* มีขนาดต่างกัน 50 คู่เบส

โดยการใช้ไพรเมอร์ P2/P8 สามารถระบุเพศนกนางแอ่นบ้านได้จำนวน 147 ตัวอย่าง คิดเป็น 98 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นเพศเมีย 74 ตัว และเพศผู้ 73 ตัว ไม่สามารถระบุเพศได้ 3 ตัว เนื่องจากเป็นตัวอย่างเลือดบนกระดาษ FTA ที่มีปริมาณเลือดน้อยจึงมีดีเอ็นเอไม่เพียงพอในการวิเคราะห์ผล เมื่อวิเคราะห์อัตราส่วนเพศผู้ต่อเพศเมีย พบว่ามีอัตราส่วนเป็น 1: 1.01 ซึ่งใกล้เคียง 1: 1 แต่เมื่อพิจารณาอัตราส่วนเพศผู้ต่อเพศเมียแยกในแต่ละจังหวัด พบว่าจังหวัดน่านมีอัตราส่วนเพศผู้ต่อเพศเมีย คือ 1: เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.30 ซึ่งใกล้เคียง 1: 1 ส่วนกรุงเทพมหานครพบอัตราส่วนเพศผู้มากกว่าเพศเมีย คือ 2.80: 1 โดย คาดการณ์ได้ว่า นกนางแอ่นบ้านจากจังหวัดน่านมีกลุ่มประชากรนกอพยพและนกประจำถิ่น เนื่องจากมีรายงานของดวงรัตน์และสุมาลี (2541) พบการทำรังวางไข่ของนกนางแอ่นบ้านที่จังหวัดน่าน และพบว่าอัตราส่วนของเพศผู้ต่อเพศเมียเป็น 1: 1 อีกทั้งมีรายงานของ Ding และคณะ (2017) ศึกษาอัตราส่วนเพศผู้ต่อเพศเมียของนกในอันดับ Passeriformes คือ นกกระจิบหญ้าท้องเหลืองใน ฤดูผสมพันธุ์ และเก็บตัวอย่างจากกหรือรัง พบอัตราส่วนเพศผู้ต่อเมียใกล้เคียง 1: 1 เช่นกัน ดังนั้น อัตราส่วนเพศผู้ต่อเพศเมียจะเป็น 1: 1 ในนกนางแอ่นบ้านที่เป็นนกประจำถิ่น แต่ควรมีการศึกษา อัตราส่วนเพศของนกนางแอ่นบ้านในประเทศไทยโดยเก็บตัวอย่างจากรังเพื่อยืนยันผลการทดลองนี้ ส่วนนกนางแอ่นบ้านจากกรุงเทพมหานครเป็นกลุ่มประชากรนกอพยพจึงพบอัตราส่วนเพศผู้ มากกว่าเพศเมีย เนื่องจากมีงานวิจัยของ Guerrini และคณะ (2014) กล่าวถึงพฤติกรรมของเพศผู้ที่มี การกระจายตัวไปถิ่นที่อยู่ใหม่เมื่อโตเต็มวัย และงานวิจัยของ Boncoraglio และคณะ (2008) ที่ กล่าวว่าลูกนกเพศผู้จะได้รับการดูแลจากพ่อแม่มากกว่าลูกนกเพศเมียทำให้เพศผู้มีอัตราการอดใน การบินอพยพมากกว่าเพศเมีย ดังนั้นจึงพบอัตราส่วนเพศผู้มากกว่าเพศเมียในกลุ่มนกอพยพ

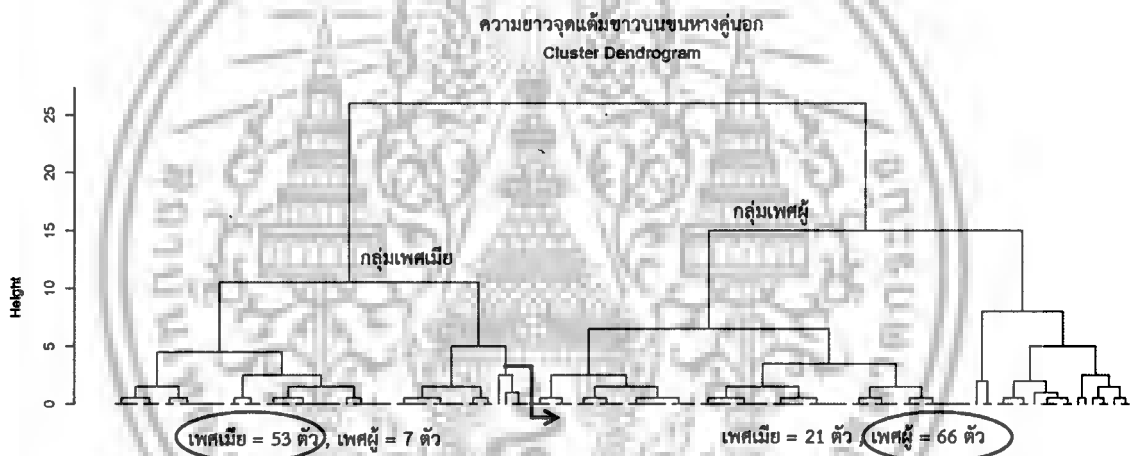
เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างเพศกับสีขนบริเวณอก พบว่าสีขนบริเวณอกลักษณะสีส้มเข้ม และสีส้มปานกลางมีอัตราส่วนเพศผู้มากกว่าเพศเมีย คือ 1.50: 1.0 และ 2.14: 1.0 ตามลำดับ ดังนั้น จึงกล่าวได้ว่าเพศผู้มีแนวโน้มสีขนบริเวณอกเป็นสีส้มเข้มและสีส้มปานกลาง ส่วนลักษณะอกสีส้มอ่อน ปลายส่วนล่างสีส้มเข้ม และอกสีขาว มีอัตราส่วนเพศผู้ต่อเพศเมีย คือ 1.0: 1.80 และ 1.0: 1.82 ตามลำดับ ซึ่งกล่าวได้ว่าเพศเมียมีแนวโน้มที่สีขนบริเวณอกเป็นสีส้มอ่อนปลายส่วนล่างสีส้มเข้ม และสี ขาว ส่วนลักษณะอกสีส้มอ่อน พบอัตราส่วนของเพศผู้และเพศเมีย คือ 1.26: 1.0 ซึ่งใกล้เคียง 1: 1 ดังนั้นจึงไม่สามารถจำแนกเพศจากการดูสีขนบริเวณอกได้ เนื่องจากนกนางแอ่นบ้านที่พบในประเทศไทย เป็นนกในช่วงฤดูอพยพที่มีการเปลี่ยนแปลงสีขน

4.3 ผลการหาความสัมพันธ์ระหว่างเพศและลักษณะทางสัณฐานวิทยา

จากตัวอย่างนกนางแอ่นบ้านจำนวน 147 ตัวอย่างที่สามารถระบุเพศด้วยเทคนิคทางโมเลกุลได้ เมื่อนำมาศึกษาความสัมพันธ์กับลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั้ง 10 ลักษณะ ได้แก่ น้ำหนัก ความยาวปาก ความหัวถึงปาก ความยาวปีก ความยาวหน้าแข้ง ความยาวขนหางคู่นอก ความยาวขนหางคู่ใน ความเว้าลึกของขนหาง ความยาวและพื้นที่ของจุดแต้มขาวบนขนหางคู่นอก โดยวิเคราะห์ข้อมูลเพศ และลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วย โปรแกรม R x 64 3.4.0 .ซึ่งเป็นโปรแกรมที่สามารถแบ่งข้อมูล ออกเป็นกลุ่มโดยแยกเพศผู้และเพศเมียได้ เพื่อคัดเลือกหาลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ระบุเพศนก นางแอ่นบ้านได้ถูกต้องมากที่สุด โดยพบว่าจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่สามารถจัดกลุ่มข้อมูลโดย แยกเพศผู้และเพศเมียออกจากกันได้ดี ได้แก่ ความยาวจุดแต้มขาวบนขนหางคู่นอก ความเว้าลึกของ ขนหาง ความยาวของหางคู่นอก และพื้นที่จุดแต้มขาวบนขนหางคู่นอก โดยความยาวจุดแต้มขาวบน ขนหางคู่นอก เป็นลักษณะที่สามารถแยกกลุ่มข้อมูลระหว่างเพศผู้และเพศเมียของนกนางนางแอ่น

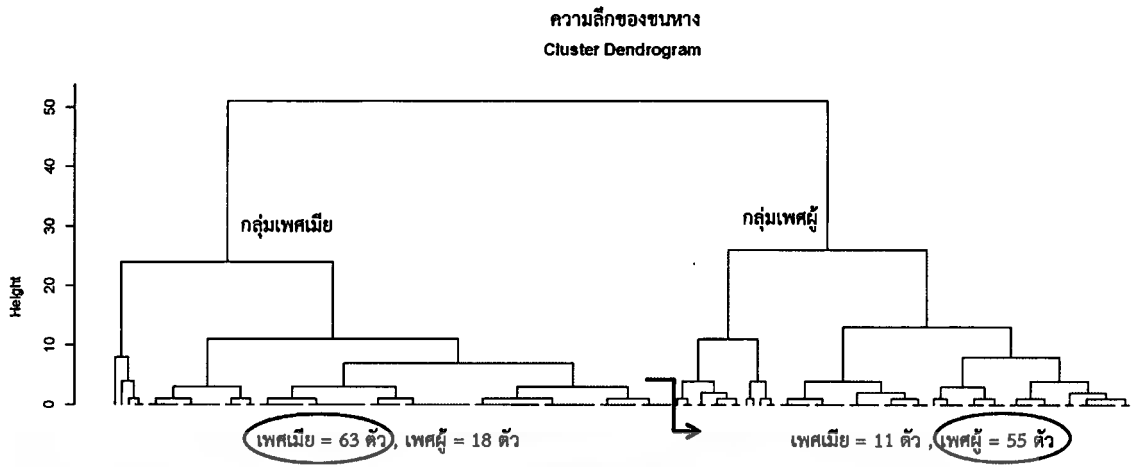
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้เผยแพร่ขึ้นต้นการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บ้านได้ดีที่สุด โดยกลุ่มเพศเมียมีตัวอย่างเพศเมียที่จำแนกถูกต้อง 53 ตัว ตัวอย่างเพศผู้ที่จำแนกผิด 7 ตัว และกลุ่มเพศผู้ที่มีตัวอย่างเพศผู้ที่จำแนกถูกต้อง 66 ตัว ตัวอย่างเพศเมียที่จำแนกผิด 21 ตัว โดยจำแนกถูกต้องคิดเป็น 80.95 เปอร์เซ็นต์ดังรูปที่ 4.6 รองลงมาคือ ความเร็วลิกของขนหาง โดยกลุ่มเพศเมียมีตัวอย่างเพศเมียที่จำแนกถูกต้อง 63 ตัว ตัวอย่างเพศผู้ที่จำแนกผิด 18 ตัว และกลุ่มเพศผู้มีตัวอย่างเพศผู้ที่จำแนกถูกต้อง 55 ตัว ตัวอย่างเพศเมียที่จำแนกผิด 11 ตัว โดยจำแนกถูกต้องคิดเป็น 80.27 เปอร์เซ็นต์ ดังรูปที่ 4.7 ส่วนลักษณะอื่นๆ 6 ลักษณะ (ความยาวหัวถึงปาก น้ำหนัก ความยาวขนหางคู่ใน ความยาวปาก ความยาวปีก และความยาวหน้าแข้ง) ไม่สามารถแยกกลุ่มข้อมูลระหว่างเพศผู้และเพศเมียได้อย่างชัดเจน แสดงตัวอย่าง Cluster Dendrogram ของความยาวหน้าแข้ง ที่พบว่ากลุ่มที่ 1 มีตัวอย่างเพศเมีย 1 ตัวอย่าง กลุ่มที่ 2 มีตัวอย่างเพศเมีย 16 ตัว เพศผู้ 20 ตัว และกลุ่มที่ 4 มีเพศเมีย 57 ตัว และเพศผู้ 53 ตัว ซึ่งไม่สามารถจำแนกกลุ่มเพศผู้และเพศเมียได้ เนื่องจากทั้ง 3 กลุ่มที่จำนวนตัวอย่างระหว่างเพศผู้และเพศเมียที่ใกล้เคียงกัน ดังรูปที่ 4.8

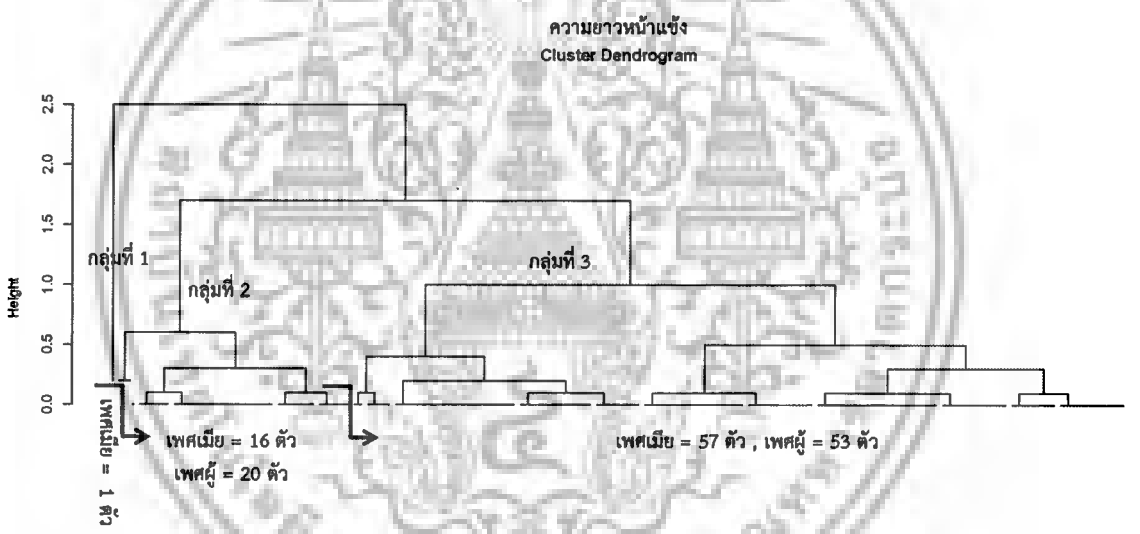


รูปที่ 4.6 การวิเคราะห์ Cluster Dendrogram ที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม R x 64 3.4.0 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเพศกับความยาวจุดแต้มขาวบนขนหางคู่นอก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.7 การวิเคราะห์ Cluster Dendrogram ที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม R x 64 3.4.0 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเพศกับความเว้าลึกของขนหาง



รูปที่ 4.8 การวิเคราะห์ Cluster Dendrogram ที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม R x 64 3.4.0 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเพศกับความยาวหน้าแข้ง

เมื่อนำข้อมูลจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่กล่าวมาข้างต้นนำมาคัดเลือกหาลักษณะที่สามารถระบุเพศได้โดยวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Rapid Miner Studio พบว่า ความยาวจุดแต้มขาวบนขนหาง คู่นอกและความเว้าลึกของของหางสามารถระบุเพศได้ถูกต้อง 83.68 และ 82.32 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.3 จากตารางพบว่าทั้งสองลักษณะสามารถระบุเพศได้ถูกต้องมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม R x 64 3.4.0 ดังนั้นจึงเลือกใช้ ความยาวจุดแต้มขาวบนขนหางคู่นอกและความเว้าลึกของของหาง ในการสร้างแบบจำลอง เพื่อหาช่วงที่ใช้ในการจำแนกเพศนกนางแอ่นบ้านในภาคสนาม ซึ่งพบว่าความยาวจุดแต้มขาวบนขนหางคู่ นอกมากกว่า 20.50 มิลลิเมตร จะระบุว่าเป็นเพศผู้ มีจำนวน 62 ตัว แต่หากความยาวจุดแต้มขาวบน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อใช้ในการศึกษาเท่านั้น เมื่อนำไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขนหางค่อนน้อยกว่าหรือเท่ากับ 20.50 มิลลิเมตร จะระบุว่าเป็นเพศเมีย มีจำนวน 61 ตัว ส่วนความเว้าลึกของขนหางที่มีความยาวมากกว่า 38.50 มิลลิเมตร ระบุว่าเป็นเพศผู้ มีจำนวน 59 ตัว และหากความเว้าลึกของขนหางน้อยกว่าหรือเท่ากับ 38.5 มิลลิเมตร ระบุเป็นเพศเมีย มีจำนวน 62 ตัว ทั้งนี้เพื่อการระบุเพศที่ถูกต้องมากยิ่งขึ้น จึงได้วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างเพศกับความยาวจุดแต้มขาวบนขนหางค่อนและความเว้าลึกของขนหาง โดยนำมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Rapid Miner Studio ร่วมกัน พบว่าสามารถใช้ทั้งสองลักษณะในการระบุเพศนกนางแอ่นบ้านได้ และมีความถูกต้อง 86.39 เปอร์เซ็นต์ แต่มีการเปลี่ยนแปลงตัวเลขจำแนกเพศ โดยลักษณะความยาวจุดแต้มขาวบนขนหางค่อนมีการเปลี่ยนแปลงค่าจาก 20.50 มิลลิเมตร เป็น 21.25 มิลลิเมตร และลักษณะความเว้าลึกของขนหางมีการเปลี่ยนแปลงค่าจาก 38.50 มิลลิเมตร เป็น 47.0 มิลลิเมตร ซึ่งจะต้องพิจารณาความยาวจุดแต้มขาวบนขนหางค่อนก่อน โดยหากมากกว่า 21.25 มิลลิเมตร ระบุเป็นเพศผู้ แต่หากน้อยกว่าหรือเท่ากับ 21.25 ยังไม่สามารถระบุเพศได้ จึงต้องพิจารณาความเว้าลึกของขนหางต่อ โดยหากมากกว่า 47 มิลลิเมตร ระบุเป็นเพศผู้ และน้อยกว่าหรือเท่ากับ 47 มิลลิเมตร ระบุเป็นเพศเมีย พบจำนวนเพศผู้ที่ระบุเพศจากทั้งสองลักษณะนี้ถูกต้องจำนวน 63 ตัว และเพศเมียจำนวน 64 ตัว โดยพบไม่สามารถระบุเพศได้เพียง 20 ตัว คิดเป็น 13.60 เปอร์เซ็นต์ สามารถสรุปนำมาใช้เป็นคู่มือในการระบุเพศนกนางแอ่นบ้านที่อพยพมายังประเทศไทยได้ ตามรูปที่ 4.9

ตารางที่ 4.3 รูปแบบการระบุเพศจากความยาวจุดแต้มขาวบนขนหางค่อน และความเว้าลึกของขนหางของนกนางแอ่นบ้านด้วยโปรแกรม Rapid Miner Studio

รูปแบบ	การวิเคราะห์ผลจากโปรแกรม Rapid Miner		จำนวนที่ไม่สามารถระบุเพศได้ (ตัว)	เปอร์เซ็นต์ความถูกต้อง (%)
	เพศผู้ (ตัว)	เพศเมีย (ตัว)		
ความยาวจุดแต้มขาว (เพศเมีย ≤ 20.5 > เพศผู้)	62	61	24	83.68
ความเว้าลึกของขนหาง (เพศเมีย ≤ 38.50 > เพศผู้)	59	62	26	82.32
ความยาวจุดแต้มขาว (21.25 > เพศผู้) และ ความเว้าลึกของขนหาง (เพศเมีย ≤ 47.00 > เพศผู้)	63	64	20	86.39

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คู่มือการระบุเพศนกนางแอ่นบ้านในประเทศไทย



ความยาวจุดแต้มขาว



ความยาวขนหางคู่ใน



ความยาวขนหางคู่นอก

4. ความเฝ้าลึกของขนหาง (2 - 3)

1. ความยาวจุดแต้มขาวบนขนหางคู่นอก

3. ความยาวของขนหางคู่ใน

2. ความยาวของขนหางคู่นอก

การระบุเพศโดยพิจารณาเพียงลักษณะเดียว		การระบุเพศโดยพิจารณาสองลักษณะ	
ความยาวจุดแต้มขาวบนขนหางคู่นอก		ความยาวจุดแต้มขาวบนขนหางคู่นอก	
มากกว่า 20.50 มิลลิเมตร	เพศผู้	มากกว่า 21.25 มิลลิเมตร	เพศผู้
น้อยกว่า หรือเท่ากับ 20.50 มิลลิเมตร	เพศเมีย	น้อยกว่า หรือเท่ากับ 21.25 มิลลิเมตร	-
หรือ		และ	
ความเฝ้าลึกของขนหาง		ความเฝ้าลึกของขนหาง	
มากกว่า 38.50 มิลลิเมตร	เพศผู้	มากกว่า 47.00 มิลลิเมตร	เพศผู้
น้อยกว่า หรือเท่ากับ 38.50 มิลลิเมตร	เพศเมีย	น้อยกว่า หรือเท่ากับ 47.00 มิลลิเมตร	เพศเมีย

รูปที่ 4.9 คู่มือในการระบุเพศนกนางแอ่นบ้านที่อพยพมายังประเทศไทย

4.4 ผลการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค iPBS

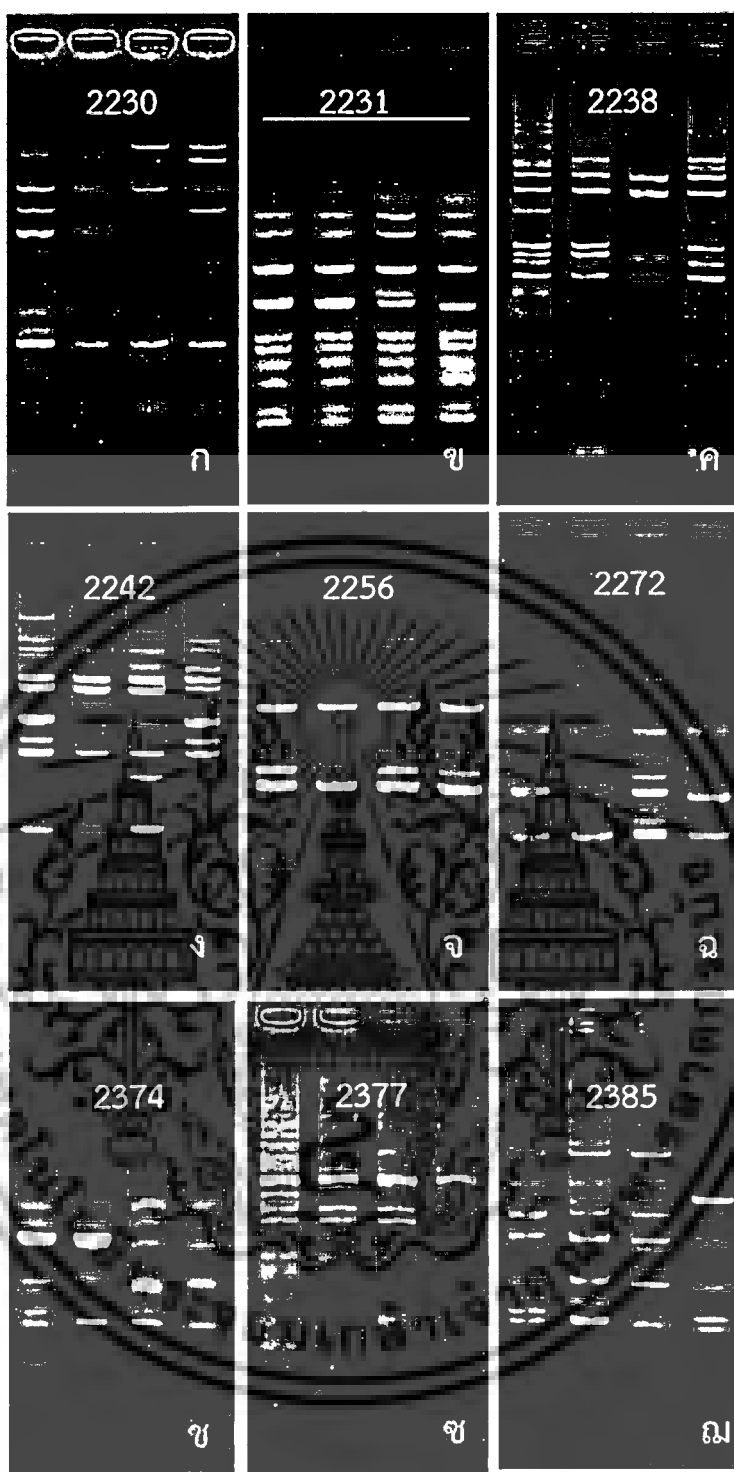
4.4.1 ผลการหาสถานะและไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม

ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของการศึกษานี้ได้คัดเลือกไพรเมอร์จำนวน 40 ไพรเมอร์ จากงานวิจัยของ Kalendar และคณะ (2010) โดยคัดเลือกจากค่า PCR efficiency (โอกาสในการเกิดแถบดีเอ็นเอ) ที่มีประสิทธิภาพทั้งในพืช และสัตว์ และจัดกลุ่มของไพรเมอร์ตามค่า Optimal annealing temperature (T_a) ที่ใกล้เคียงกัน โดยสามารถแบ่งออกเป็น 5 กลุ่ม จากการเพิ่มปริมาณเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารพันธุกรรมตามค่าเฉลี่ยอุณหภูมิ T_a ในแต่ละกลุ่ม เพื่อหาไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการแยกความแตกต่างของตัวอย่างนกนางแอ่นบ้าน โดยงานวิจัยนี้ได้คัดเลือกตัวอย่างดีเอ็นเอของนกนางแอ่นบ้านที่ได้จากการสกัดเลือดจำนวน 4 ตัวอย่าง โดยใช้ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ คือ 100 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ได้แก่ ตัวอย่างจากจังหวัดน่าน 2 ตัวอย่าง (แถวที่ 1: NBS45 = ขนบริเวณอกสีส้มเข้ม และ แถวที่ 2: NBS114 = ขนบริเวณอกสีส้มปานกลาง) ตัวอย่างจากกรุงเทพมหานคร 2 ตัวอย่าง (แถวที่ 3: BS73 = ขนบริเวณอกสีส้มปานกลาง และ แถวที่ 4: BS84 = ขนบริเวณอกสีขาว) นำมาเป็นตัวคัดเลือกไพรเมอร์ และแปลผลด้วยอะกาโรสเจลความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ พบว่าไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอแตกต่างกัน และมีความหลากหลายของแถบดีเอ็นเอ ได้แก่ กลุ่มที่ 1 (T_a เฉลี่ย = 51 องศาเซลเซียส) ไพรเมอร์ 2256 และ 2385 กลุ่มที่ 2 (T_a เฉลี่ย = 53 องศาเซลเซียส) ไพรเมอร์ 2230 และ 2231 กลุ่มที่ 3 (T_a เฉลี่ย = 54 องศาเซลเซียส) ไพรเมอร์ 2272, 2374 และ 2377 และกลุ่มที่ 4 (T_a เฉลี่ย = 57 องศาเซลเซียส) ไพรเมอร์ 2238 และ 2242 ดังนั้นไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอชัดเจน และมีความหลากหลาย เหมาะสำหรับนำมาศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกนางแอ่นบ้าน ได้แก่ 2230, 2231, 2238, 2242, 2256, 2272, 2374, 2377, และ 2385 ดังแสดงในรูปที่ 4.10 ก - ฉ



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



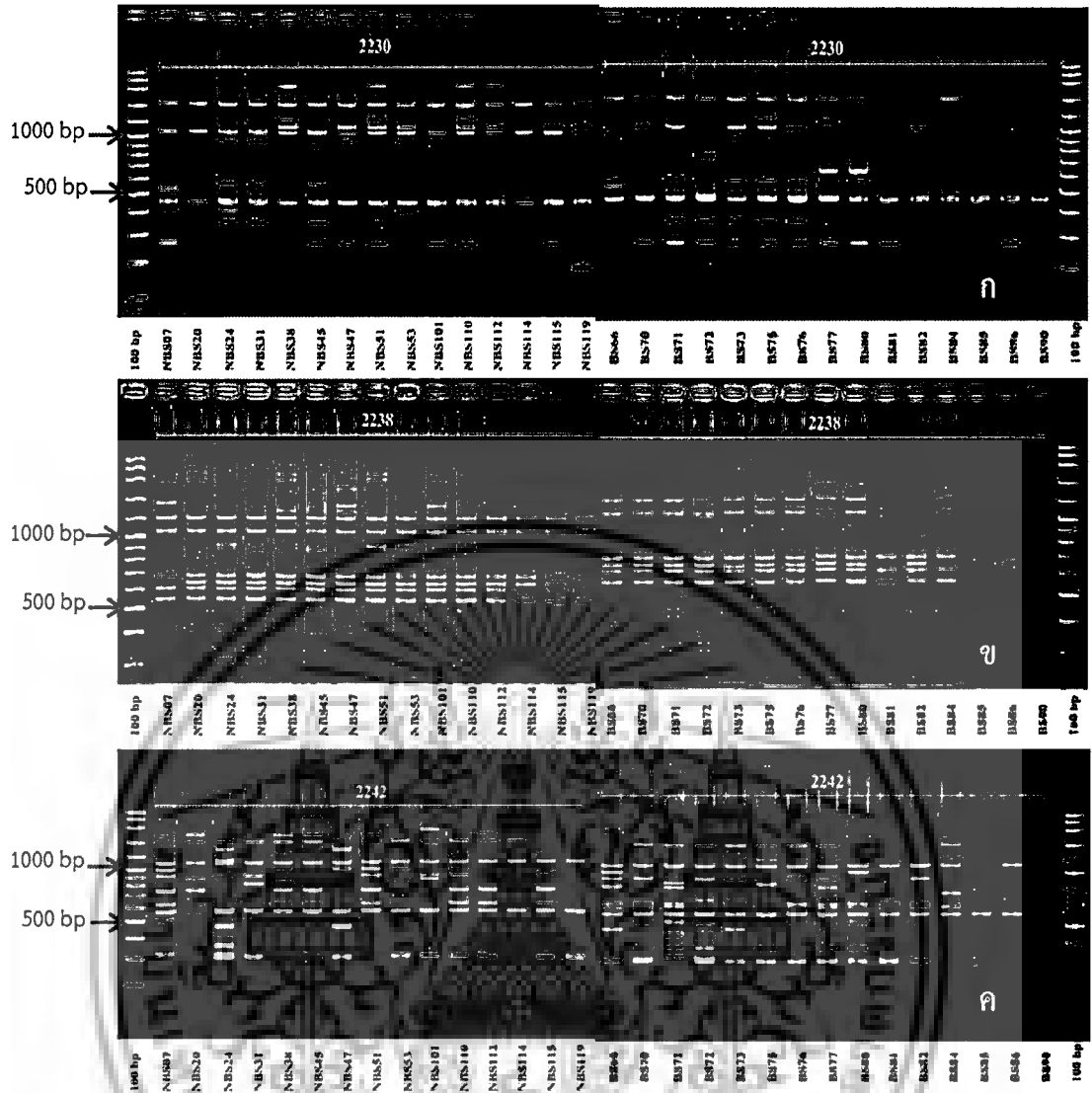
รูปที่ 4.10 ลักษณะแถบดีเอ็นเอของไฟรเมอร์ที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการศึกษาความหลากหลายด้วยเทคนิค iPBS ของนกนางแอ่นบ้าน (ก) ไฟรเมอร์ 2230 (ข) ไฟรเมอร์ 2231 (ค) ไฟรเมอร์ 2238 (ง) ไฟรเมอร์ 2242 (จ) ไฟรเมอร์ 2256 (จ) ไฟรเมอร์ 2272 (ช) ไฟรเมอร์ 2374 (ซ) ไฟรเมอร์ 2377 (ซ) ไฟรเมอร์ 2385 (ณ)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4.2 ผลการการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกกางแอนบ้าน

เมื่อได้ไพรเมอร์จำนวน 9 ไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม จึงนำมาทดสอบกับตัวอย่างนกกางแอนบ้านจังหวัดน่าน 15 ตัวอย่าง และกรุงเทพมหานคร 15 ตัวอย่าง โดยคัดเลือกจากสิชนบริเวณอกที่แตกต่างกัน คือ จังหวัดน่าน มีลักษณะสิชนบริเวณอกสีส้มเข้ม ได้แก่รหัส NBS07, NBS24, NBS45, และ NBS53 ออกสีส้มปานกลาง ได้แก่ รหัส NBS47, NBS51, NBS114 และ NBS119 ออกสีส้มอ่อนปลายส่วนล่างสีส้มเข้ม ได้แก่ รหัส NBS31 และ NBS38 ออกสีขาว ได้แก่ รหัส NBS20, NBS101, NBS110, NBS112 และ NBS115 ส่วนกรุงเทพมหานคร มีลักษณะสิชนบริเวณอกสีส้มปานกลาง ได้แก่ รหัส BS70, BS73, BS82, BS86 และ BS90 ออกสีส้มอ่อน ได้แก่ รหัส BS71, BS72, BS75, BS77, BS80, BS81 และ BS85 ออกสีขาว ได้แก่ รหัส BS66, BS76 และ BS84 พบว่าไพรเมอร์ทั้ง 9 ไพรเมอร์ ให้แถบดีเอ็นเอของตัวอย่างที่แตกต่างกันและหลากหลาย โดยแสดงตัวอย่างแถบดีเอ็นเอจาก ไพรเมอร์ 2230, 2238 และ 2242 ดังรูปที่ 4.11 ก - ค

จากรูปที่ 4.11 พบว่าในแต่ละตัวอย่างให้แถบดีเอ็นเอแตกต่างกันในบางตำแหน่ง ซึ่งแสดงถึงความหลากหลาย และแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างนกกางแอนบ้านจังหวัดน่าน มีความแตกต่างกับแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างนกกางแอนบ้านจากกรุงเทพมหานคร โดยเมื่อวิเคราะห์ความหลากหลายด้วยการให้ค่าคะแนนแบบ Binary คือ หากปรากฏแถบดีเอ็นเอจะให้ค่าคะแนนเป็น 1 และหากไม่พบแถบดีเอ็นเอจะให้ค่าคะแนนเป็น 0 จากไพรเมอร์จำนวน 9 ไพรเมอร์ และวิเคราะห์จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏทั้งหมดโดยแบ่งออกเป็นจำนวน Polymorphic fragments และจำนวน Monomorphic fragments แสดงดังตารางที่ 4.4 โดยไพรเมอร์ 2230, 2231, 2238, 2242, 2256, 2272, 2374, 2377 และ 2385 ให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 22, 14, 15, 17, 12, 18, 23, 10 และ 17 ตามลำดับ ดังนั้นทั้ง 9 ไพรเมอร์มีจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นทั้งหมด 148 แถบ เฉลี่ย 16 แถบดีเอ็นเอต่อไพรเมอร์ มีขนาดอยู่ระหว่าง 180 - 3000 คู่เบส เป็นชนิด Monomorphic fragments จำนวน 38 แถบ และเป็นชนิด Polymorphic fragments จำนวน 110 แถบ คิดเป็นค่า Polymorphism 74.32 เปอร์เซ็นต์ และมีค่า Polymorphic fragments เฉลี่ย 72.44 เปอร์เซ็นต์ โดยไพรเมอร์ 2231 มีเปอร์เซ็นต์ polymorphism น้อยที่สุด คือ 35.71 % และ ไพรเมอร์ 2377 มีเปอร์เซ็นต์ polymorphism มากที่สุด คือ 100 %



รูปที่ 4.11 ตัวอย่างลักษณะแถบดีเอ็นเอของไพรเมอร์ที่นำมาใช้จำนวน 3 ไพรเมอร์ คือ (ก) ไพรเมอร์ 2230 (ข) ไพรเมอร์ 2238 (ค) ไพรเมอร์ 2242 โดยเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส (NBS=ตัวอย่างจากจังหวัดน่าน และ BS = ตัวอย่างจากกรุงเทพมหานคร)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 จำนวนแถบ อุณหภูมิ annealing และเปอร์เซ็นต์ความหลากหลายของไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษา

ไพรเมอร์	อุณหภูมิ Annealing T_a (°C)	จำนวนแถบ ดีเอ็นเอ	Monomorphic fragments	Polymorphic fragments	Polymorphism (%)
2230	52.9	22	3	19	86.36
2231	52	14	9	5	35.71
2238	56	15	3	12	80.00
2242	57	17	2	15	88.24
2256	51	12	5	7	58.33
2272	55	18	5	13	72.22
2374	53.5	23	9	14	60.87
2377	53	10	0	10	100.00
2385	51.2	17	2	15	88.24
รวม	-	148	38	110	74.32
ค่าเฉลี่ย	-	16.4	4.2	12.2	72.44

4.4.3 การวิเคราะห์ผลความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรม NTSYSpc2.1X

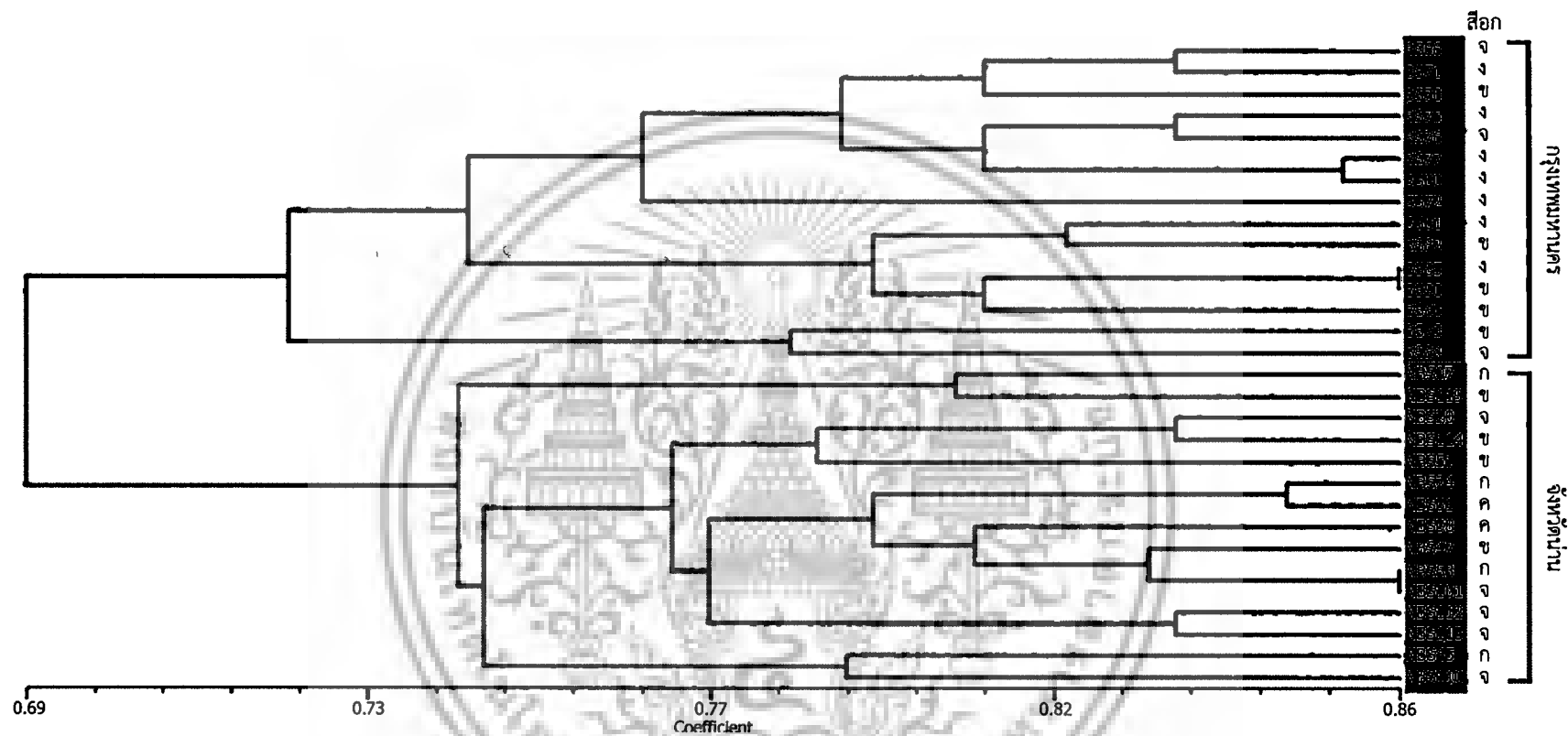
จากการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรม NTSYSpc เวอร์ชัน 2.1X แสดงเป็นแผนภูมิความสัมพันธ์ (Dendrogram) โดยวิธี Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Average (UPGMA) พบว่า ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรม (Genetic similarity) มีค่าอยู่ระหว่าง 0.59 – 0.90 โดยเมื่อเปรียบเทียบในกลุ่มนกนางแอ่นบ้านจังหวัดน่าน จำนวน 15 ตัวอย่าง ได้แก่ รหัส NBS07, NBS20, NBS24, NBS31, NBS38, NBS45, NBS47, NBS51, NBS53, NBS101, NBS110, NBS112, NBS114, NBS115 และ NBS119 มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมอยู่ระหว่าง 0.68 – 0.88 โดยมีตัวอย่าง NBS53 และ NBS101 มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมมากที่สุด คือ 0.88 และเมื่อเปรียบเทียบกลุ่มนกนางแอ่นบ้านจากกรุงเทพมหานครจำนวน 15 ตัวอย่าง ได้แก่ รหัส BS66, BS70, BS71, BS72, BS73, BS75, BS76, BS77, BS80, BS81, BS82, BS84, BS85, BS86 และ BS90 พบค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมอยู่ระหว่าง 0.61 – 0.90 โดยมีตัวอย่าง BS85 และ BS90 มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมมากที่สุด คือ 0.90 ซึ่งแสดงว่านกนางแอ่นบ้านมีความหลากหลายภายในกลุ่มประชากร แต่เมื่อเปรียบเทียบกลุ่มตัวอย่างนกนางแอ่นบ้านจากจังหวัดน่านและกรุงเทพมหานคร

ได้แก่ รหัส NBS51 และ รหัส BS82 มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.59 ซึ่งต่ำกว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สามารถอธิบายได้ว่านกกนางแอ่นบ้าน 2 จังหวัดนี้ มีความห่างทางพันธุกรรม นอกจากนี้ยังพบว่าที่ค่าสัมประสิทธิ์เท่ากับ 0.69 สามารถแบ่งตัวอย่างนกกนางแอ่นบ้านทั้ง 30 ตัวอย่างออกเป็น 2 กลุ่ม ดังแสดงในรูปที่ 4.12 โดยไม่แสดงความสัมพันธ์ของการแบ่งกลุ่มตัวอย่างตามลักษณะสีขนบริเวณอก โดยลักษณะสีขนบริเวณอกมี 5 ลักษณะ คือ (ก) ออกสีส้มเข้ม (ข) ออกสีส้มปานกลาง (ค) ออกสีส้มอ่อน ปลายส่วนล่างสีส้มเข้ม (ง) ออกสีส้มอ่อน (จ) ออกสีขาว กระจายอยู่ทั้ง 2 กลุ่ม สอดคล้องกับงานวิจัยของ sarah (2007) ที่กล่าวว่านกในฤดูอพยพจะมีการผลัดขนโดยการสร้างขนชุดใหม่ทำให้สีขนเปลี่ยนแปลงไป แต่อย่างไรก็ตามสามารถแยกตัวอย่างของนกกนางแอ่นบ้านจากจังหวัดน่านออกจากตัวอย่างนกกนางแอ่นบ้านกรุงเทพมหานครได้ ซึ่งคาดว่ากลุ่มนกกนางแอ่นบ้านจากจังหวัดน่านเป็นกลุ่มประชากรที่มีถิ่นกอพยพและประจำถิ่น เนื่องจากมีรายงานจากตวงรัตน์และสุมาลี (2541) ที่พบรังของนกกนางแอ่นบ้านที่จังหวัดน่าน ดังนั้นจึงทำให้กลุ่มนกกนางแอ่นบ้านที่ทำรังวางไข่ที่จังหวัดน่านมีความต่างทางพันธุกรรมกับกลุ่มนกกนางแอ่นบ้านจากกรุงเทพมหานครที่เป็นเฉพาะกลุ่มนกอพยพ



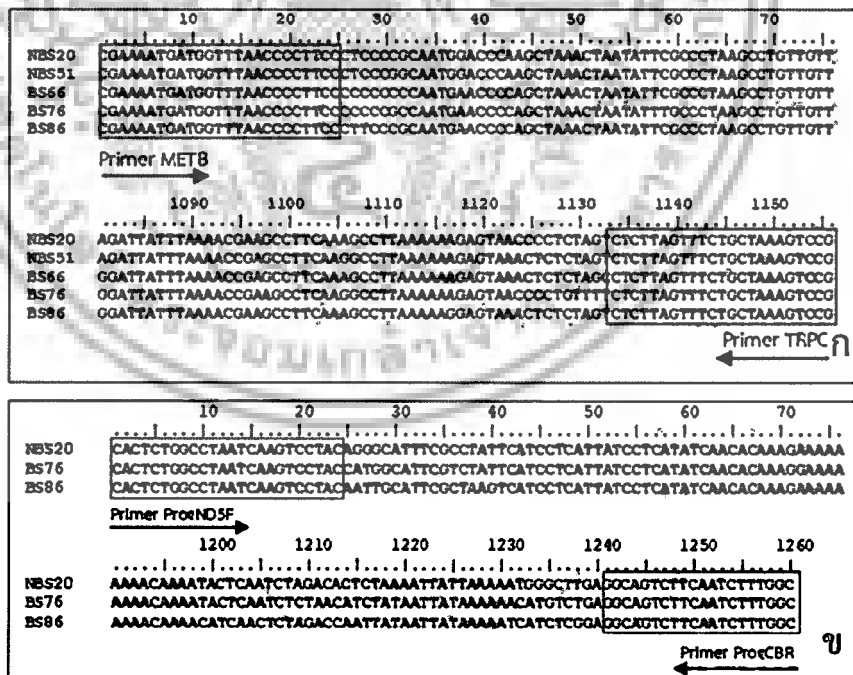
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.12 แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ (Dendrogram) ของนกกางแอนบ้านจำนวน 30 ตัวอย่าง จากข้อมูลแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค iPBS และแบ่งกลุ่มโดยวิธี UPGMA

4.5 ผลการระบุลำดับนิวคลีโอไทด์

จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในตำแหน่ง *ND2* และ *Cyt-b* โดยใช้อุณหภูมิ Annealing 62 องศาเซลเซียส ได้ทดสอบกับตัวอย่างนกนางแอ่นบ้านจากจังหวัดน่านจำนวน 14 ตัวอย่าง ได้แก่ รหัส NBS07, NBS20, NBS24, NBS51, NBS101, NBS110, NBS115, และ NBS119 ซึ่งเป็นตัวอย่างที่สุ่มมาจากการศึกษาความหลากหลายด้วยเทคนิค iPBS และยังศึกษาเพิ่มเติมในรหัส NBS05, NBS52, NBS80, NBS88, NBS92 และ NBS99 ส่วนตัวอย่างนกนางแอ่นบ้านจากกรุงเทพมหานครจำนวน 10 ตัวอย่าง ได้แก่ รหัส BS66, BS76, BS81, BS82, BS85 และ BS86 ซึ่งเป็นตัวอย่างที่สุ่มมาจากการศึกษาความหลากหลายด้วยเทคนิค iPBS และยังศึกษาเพิ่มเติมในรหัส BS64, BS63, BS65 และ BS78 รวมตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบจำนวน 24 ตัวอย่าง เมื่อแปลผลด้วยวิธีอิเล็กทรอนิกส์ ด้วยอวกาศความเข้มข้น 1 เฟอร์เซ็นต์ พบขนาดชิ้นดีเอ็นเอในตำแหน่ง *ND2* ประมาณ 1,200 คู่เบส และตำแหน่ง *Cyt-b* ประมาณ 1,300 คู่เบส เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งยีน *ND2* สามารถทราบขนาดที่แน่นอนของชิ้นดีเอ็นเอ 1,151 คู่เบส โดยแสดงตัวอย่างจากรหัส NBS20, NBS51, BS66, BS76 และ BS86 ที่หาตำแหน่งเกาะของไพรเมอร์ METB/TRPC ดังรูปที่ 4.13 ก ส่วนการวิเคราะห์ลำดับในตำแหน่งยีน *Cyt-b* สามารถทราบขนาดที่แน่นอนของชิ้นดีเอ็นเอ 1,260 คู่เบส โดยแสดงตัวอย่างจากรหัส NBS20, BS76 และ BS66 ที่หาตำแหน่งเกาะของไพรเมอร์ ProgND5F/ProgCBB ดังรูปที่ 4.13 ข



รูปที่ 4.13 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์และตำแหน่งเกาะของไพรเมอร์ (ก) ตำแหน่งยีน *ND2*

(ข) ตำแหน่งยีน *Cyt-b*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากนั้นจึงนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของนกนางแอ่นบ้านจากประเทศไทยจำนวน 24 ตัวอย่าง ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank จำนวน 17 ตัวอย่างโดยมีตัวอย่างครบทั้ง 6 สปีชีส์ย่อย ได้แก่ ตัวอย่าง จาก Zink และคณะ (2006) จำนวน 4 ตัวอย่าง แบ่งเป็นสปีชีส์ย่อย *H. r. gutturalis* (gu2 และ gu3) และ *H. r. tytleri* (ty1 และ ty2) Dor และคณะ (2010) จำนวน 8 ตัวอย่าง แบ่งเป็นสปีชีส์ย่อย *H. r. gutturalis* (gu1) *H. r. erythrogaster* (er1, er2 และ er3) *H. r. savignii* (sa1 และ sa2) และ *H. r. rustica* (ru1 และ ru2) และ Dor et al. (2011) จำนวน 5 ตัวอย่าง มีสปีชีส์ย่อย *H. r. transitiva* (tr1, tr2, tr3 และ tr4) และ *H. r. rustica* (ru3)

เมื่อนำมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์โดยใช้ตำแหน่ง *ND2* ที่มีขึ้นดีเอ็นเอขนาด 1,014 คู่เบส วิเคราะห์ร่วมกันตำแหน่ง *Cyt-b* ที่มีขึ้นดีเอ็นเอขนาด 1,012 คู่เบส โดยมีขึ้นดีเอ็นเอรวมขนาด 2,026 คู่เบส และใช้โปรแกรม MEGA 6 และวิธีวิเคราะห์แบบ Maximum-likelihood เพื่อสร้าง Phylogenetic tree โดยพบว่าสามารถแบ่งกลุ่มของนกนางแอ่นบ้านเป็น 4 กลุ่มได้แก่ กลุ่มที่ 1 มีสปีชีส์ย่อย *H. r. rustica*, *H. r. savignii* และ *H. r. transitiva* ประกอบด้วยรหัส ru1, ru2, ru3, sa1, sa2, tr1, tr2, tr3 และ tr4 ซึ่งไม่มีตัวอย่างนกนางแอ่นบ้านจากประเทศไทย กลุ่มที่ 2 มีสปีชีส์ย่อย *H. r. erythrogaster* และ *H. r. tytleri* ประกอบด้วยรหัส er1, er2, er3, ty1 และ ty2 อีกทั้งยังมี รหัส BS76 และ NBS05 ที่เป็นตัวอย่างนกนางแอ่นบ้านประเทศไทยมีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับสปีชีส์ย่อย *H. r. tytleri* กลุ่มที่ 3 มีเพียงสปีชีส์ย่อย *H. r. gutturalis* ประกอบไปด้วย รหัส gu1, gu2 และ gu3 โดยมีตัวอย่างส่วนมากมีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับสปีชีส์ย่อย *H. r. gutturalis* ได้แก่ นกนางแอ่นประเทศไทย รหัส BS66, BS81, BS85, BS86, BS95, BS96, BS104, NBS07, NBS20, NBS110, NBS115 และ NBS125 ส่วนกลุ่มที่ 4 มีตัวอย่างรหัส NBS80 และ BS65 ซึ่งไม่มีตัวอย่างจากฐานข้อมูลป็นอยู่ในกลุ่มนี้ จึงไม่สามารถระบุสปีชีส์ย่อยได้ อีกทั้งผลการจัดกลุ่มนกนางแอ่นบ้านในงานวิจัยนี้ยังสอดคล้องกับงานวิจัยของ Dor และคณะ (2010) ที่ได้แบ่งนกนางแอ่นบ้านทั้ง 6 สปีชีส์ย่อยออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่ม European-Middle Eastern ประกอบด้วย *Hirundo rustica rustica*, *H. r. transitiva* และ *H. r. savignii* และกลุ่ม Asia- American ประกอบด้วย *H. r. gutturalis* *H. r. tytleri*. และ *H. r. erythrogaster* ดังแสดงในรูปที่ 4.14

เมื่อพิจารณาสีขนบริเวณอกพบว่าไม่มีความสัมพันธ์กับสปีชีส์ย่อย โดยจะพบสีขนในกลุ่มที่ 3 เกือบทุกลักษณะได้แก่ สีส้มเข้ม สีเข้มปานกลาง สีส้มอ่อน และสีขาว ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Sarah (2007) ที่ว่านกในฤดูอพยพจะมีการเปลี่ยนแปลงสีขน ทำให้ไม่สามารถจำแนกสปีชีส์ย่อยจากการสังเกตสีขนบริเวณอกของนกนางแอ่นบ้านได้

โดยตัวอย่างกลุ่มที่ 3 พบสปีดแบบ Transition 1 รูปแบบ คือ A – T จำนวน 0.49 เปอร์เซ็นต์ และสปีดแบบ Transversion 4 รูปแบบ คือ A – C, A – G, C – T และ G – T จำนวน 0.2, 0.59, 0.59 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยเกิดสปีดรวม 2.07 เปอร์เซ็นต์ ส่วนตัวอย่างกลุ่มที่ 2 พบสปีดแบบ Transition 1 รูปแบบ คือ C – G จำนวน 0.02 เปอร์เซ็นต์ และสปีดแบบ Transversion 3 รูปแบบ คือ A – C, C – T และ G – T จำนวน 0.02, 0.49 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยเกิดสปีดรวม 0.73 เปอร์เซ็นต์ สำหรับในตำแหน่ง *Cyt-b* ในตัวอย่างกลุ่มที่ 3 เกิดสปีดแบบ Transition จำนวน 2 รูปแบบ คือ A – T และ C – G จำนวน 0.49 และ 0.02 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และพบสปีดแบบ Transversion 4 รูปแบบ คือ A – C, A – G, C – T และ G – T จำนวน 0.89, 0.69, 0.99 และ 0.02 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยเกิดสปีดรวม 3.10 เปอร์เซ็นต์ ส่วนตัวอย่างกลุ่มที่ 2 ไม่พบสปีดแบบ Transition แต่พบสปีดแบบ Transversion 3 รูปแบบ คือ A – C, A – G และ C – T จำนวน 0.02, 0.2 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยเกิดสปีดรวม 0.42 เปอร์เซ็นต์

เมื่อวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ของการเกิดสปีดของตำแหน่ง *ND2* และ *Cyt-b* ร่วมกัน จะพบว่ากลุ่มที่ 3 มีการเปอร์เซ็นต์การเกิดสปีด 5.17 เปอร์เซ็นต์ และกลุ่มที่ 2 มีเปอร์เซ็นต์การเกิดสปีด 1.15 เปอร์เซ็นต์ จะเห็นได้ว่าตัวอย่างในกลุ่มที่ 2 มีเปอร์เซ็นต์การเกิดสปีดน้อยกว่าตัวอย่างกลุ่มที่ 3 (*H. r. gutturalis*) แต่ไม่สามารถกล่าวได้ว่าตัวอย่างในกลุ่มที่ 2 (*H. r. tytlteri*) มีเปอร์เซ็นต์ความหลากหลายน้อยกว่ากลุ่มที่ 3 เนื่องจากว่าตัวอย่างในกลุ่มที่ 2 มีเพียง 2 ตัวอย่างในการวิเคราะห์ ดังตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 เปอร์เซ็นต์การเกิดสปีด และรูปแบบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แปรผันในตำแหน่งยีน

ND2 และ *Cyt-b* ของนกนางแอ่นบ้านสปีดชื่อย่อ *H. r. gutturalis* และ *H. r. tytlteri*

SNP	รูปแบบการแทนที่เบส	การเปลี่ยนแปลงเบส ในยีน <i>ND2</i> (%)		การเปลี่ยนแปลงเบส ในยีน <i>Cyt-b</i> (%)	
		<i>H. r. gutturalis</i>	<i>H. r. tytlteri</i>	<i>H. r. gutturalis</i>	<i>H. r. tytlteri</i>
		(gu)	(ty)	(gu)	(ty)
Transition	A-T	0.49	0	0.49	0
	C-G	0	0.02	0.02	0
Transversion	A-C	0.2	0.02	0.89	0.02
	A-G	0.59	0	0.69	0.2
	C-T	0.59	0.49	0.99	0.2
	G-T	0.2	0.2	0.02	0
รวม	-	2.07	0.73	3.1	0.42

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

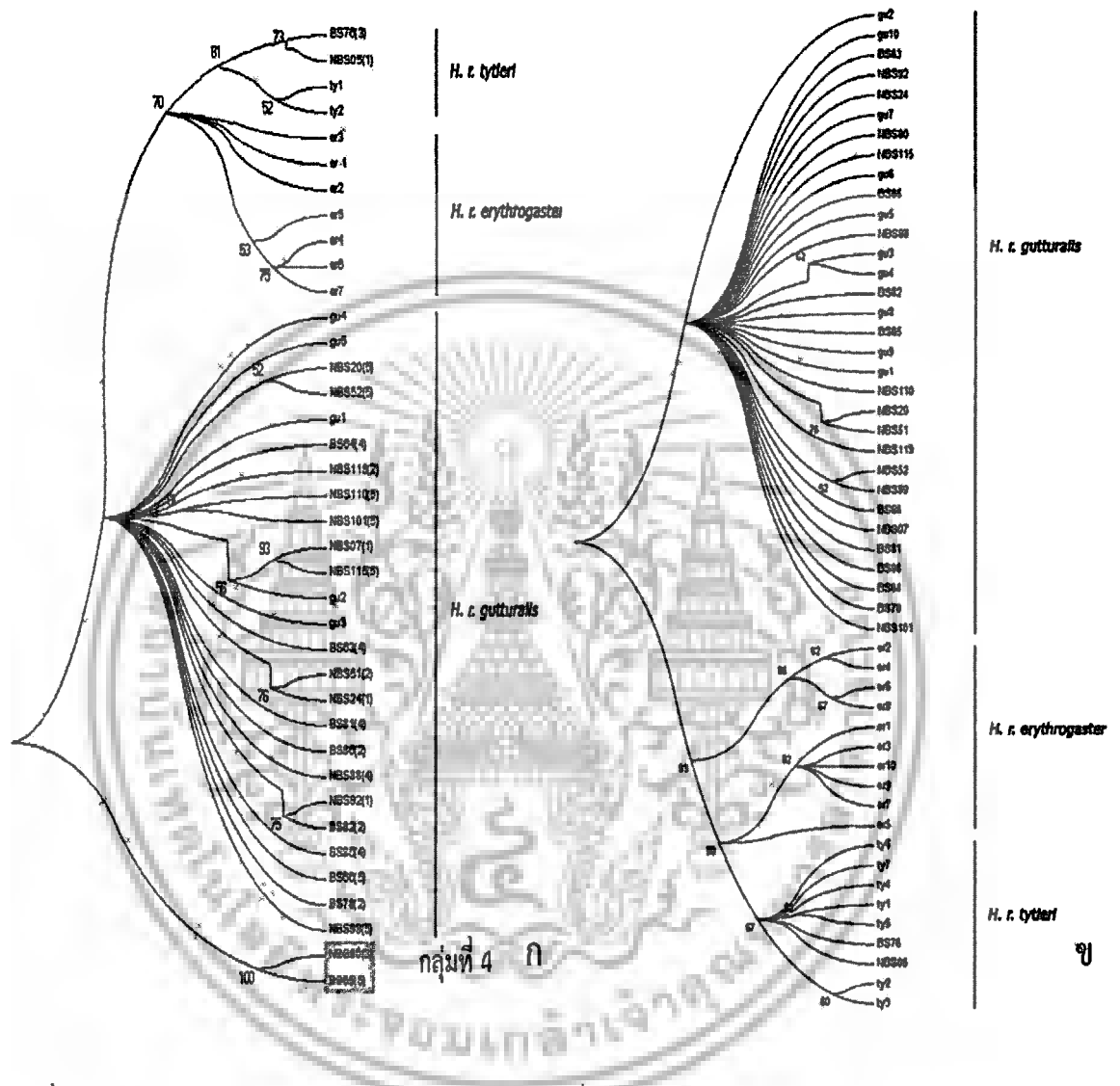
สำหรับตัวอย่างในกลุ่มที่ 4 ได้แก่ รหัส NBS80 และ BS65 เป็นตัวอย่างที่ไม่สามารถระบุสปีชีส์ย่อยได้ เนื่องจากอาจเป็นลูกผสมระหว่าง *H. r. gutturalis*, *H. r. tytleri* และ *H. r. erytrogaster* ที่ยังไม่มีข้อมูลในฐานข้อมูลเปรียบเทียบ เพราะจากรายงานของ Scordato และคณะ (2017) พบการผสมข้ามพันธุ์กันระหว่างสปีชีส์ย่อย *H. r. gutturalis*, *H. r. tytleri* โดยจะพบบริเวณรอยต่อระหว่างประเทศรัสเซียตะวันออกถึงรัสเซียตะวันตก ทำให้ได้ลูกผสมที่มีลักษณะสีขนบริเวณอกเปลี่ยนแปลงไป แต่เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาเปรียบเทียบกัน พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์บางตำแหน่งของกลุ่มที่ 4 เช่นตำแหน่งที่ 56 และ 59 แตกต่างกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างในฐานข้อมูลทั้ง 3 สปีชีส์ย่อย (*H. r. gutturalis*, *H. r. tytleri* และ *H. r. erytrogaster*) โดยตำแหน่งที่ 56 พบตัวอย่างในกลุ่มที่ 4 มีเบสเป็น G ซึ่งต่างจากฐานข้อมูลที่มีเบสเป็น T และตำแหน่งที่ 59 พบตัวอย่างในกลุ่มที่ 4 มีเบสเป็น C ซึ่งต่างจากฐานข้อมูลที่มีเบสเป็น T ดังนั้นจึงอธิบายได้ว่ากลุ่มที่ 4 ไม่ใช่ลูกผสมระหว่างทั้ง 3 สปีชีส์ย่อย ดังแสดงในรูปที่ 4.15

	50	60	70	80	90
กลุ่มที่ 4	NBS80	ACTCCTTAAATCGACCTGCCTACCCCATCAACATCTCAACCTGAT			
	BS65	ACTCCTTAAATCGACCTGCCTACCCCATCAACATCTCAACCTGAT			
	gu1	ACTCCTTAAATCGACCTGCCTACCCCATCAACATCTCAACCTGAT			
	gu2	ACTCCTTAAATCGACCTGCCTACCCCATCAACATCTCAACCTGAT			
	gu3	ACTCCTTAAATCGACCTGCCTACCCCATCAACATCTCAACCTGAT			
GenBank	ty1	ACTCCTTAAATCGACCTGCCTACCCCATCAACATCTCAACCTGAT			
	ty2	ACTCCTTAAATCGACCTGCCTACCCCATCAACATCTCAACCTGAT			
	er1	ACTCCTTAAATCGACCTGCCTACCCCATCAACATCTCAACCTGAT			
	er2	ACTCCTTAAATCGACCTGCCTACCCCATCAACATCTCAACCTGAT			
	er3	ACTCCTTAAATCGACCTGCCTACCCCATCAACATCTCAACCTGAT			

รูปที่ 4.15 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งยีน *Cyt-b* ของนกนางแอ่นบ้าน โดยลูกศรชี้ตำแหน่งที่แตกต่างกัน

จากนั้นจึงวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างตัวอย่างนกนางแอ่นบ้านประเทศไทย 24 ตัวอย่าง กับตัวอย่างจากฐานข้อมูลโดยเพิ่มจำนวนตัวอย่างกลุ่ม Asian-American ในการเปรียบเทียบ และวิเคราะห์แยกทีละตำแหน่ง พบว่าในตำแหน่ง *Cyt-b* ไม่สามารถระบุสปีชีส์ย่อยในกลุ่มที่ 4 ได้เช่นเดิม โดยยังคงจัดกลุ่มตัวอย่างนกนางแอ่นบ้านในประเทศไทยส่วนใหญ่มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับสปีชีส์ย่อย *H. r. gutturalis* และตัวอย่างกลุ่มที่ 2 คือ NBS05 และ BS76 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับสปีชีส์ย่อย *H. r. tytleri* เช่นเดิม ดังแสดงในรูปที่ 4.16 ก ส่วนในตำแหน่ง *ND2* พบว่าสามารถจัดตัวอย่างกลุ่มที่ 4 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับสปีชีส์ย่อย *H. r. gutturalis* และตัวอย่างกลุ่มที่ 2 และ 3 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับสปีชีส์ย่อย *H. r. tytleri* และ *H. r. gutturalis* ตามลำดับ เช่นเดิม ดังรูปที่ 4.16 ข ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า ตัวอย่างในกลุ่มที่ 4 รหัส NBS80 ที่เป็นตัวอย่างจากจังหวัดน่านอาจเป็นสปีชีส์ย่อยใหม่ เนื่องจากจังหวัดน่านพบการทำรังวางไข่ของนกนางแอ่นบ้าน ดังนั้นต้องมีการเก็บตัวอย่างในช่วงผสมพันธุ์เพื่อนำมาศึกษาเพิ่มเติม สำหรับตัวอย่างในกลุ่มที่ 4 รหัส BS65 ที่เป็น

ตัวอย่างจากกรุงเทพมหานครอาจเป็นสปีชีส์ย่อยใหม่เช่นกัน โดยมีการทำรังวางไข่ในพื้นที่อื่นๆที่แตกต่างจากทั้ง 6 สปีชีส์ย่อย แต่ทั้งนี้ยังไม่สามารถระบุได้อย่างชัดเจน เนื่องจากไม่มีข้อมูลในฐานข้อมูลในการเปรียบเทียบ



รูปที่ 4.16 Phylogenetic tree ของนกนางแอ่นบ้านที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MEGA 6 จากลำดับนิวคลีโอไทด์ (ก) ตำแหน่ง *Cyt-b* และ (ข) ตำแหน่ง *ND2* เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล GenBank

สำหรับประโยชน์ในการระบุสปีชีส์ย่อยคือสามารถคาดการณ์เส้นทางอพยพของนกนางแอ่นบ้านได้ โดยมีรายงานของ Dickinson และ Dekker, 2001 พบแหล่งที่อยู่อาศัยของนกนางแอ่นบ้านสปีชีส์ย่อย *H. r. gutturalis* ในช่วงฤดูผสมพันธุ์ ทางประเทศรัสเซียตะวันออก ประเทศจีน ประเทศเกาหลี และประเทศญี่ปุ่น และพบสปีชีส์ย่อย *H. r. tyleri* ทางประเทศมองโกเลีย งานวิจัยของ Hasegawa และคณะ (2010) สังเกตพฤติกรรมการผสมพันธุ์ของนกนางแอ่นบ้าน สปีชีส์ย่อย *H. r.* เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่โดยไม่หวังกำไรใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

gutturalis ในประเทศญี่ปุ่น งานวิจัยของ Dor และคณะ (2010) ที่ศึกษาความหลากหลายของนกนางแอ่นบ้าน 6 สปีชีส์ย่อย โดยเก็บตัวอย่างสปีชีส์ย่อย *H. r. gutturalis* จากประเทศรัสเซีย ประเทศมองโกเลีย และประเทศญี่ปุ่น ส่วนสปีชีส์ย่อย *H. r. tytleri* เป็นตัวอย่างจากทะเลสาบไบคาลของประเทศรัสเซีย และงานวิจัยของ Pagani-Nunez และคณะ (2016) ที่ศึกษานกนางแอ่นบ้านที่ทำรังวางไข่ทางตอนใต้ของประเทศจีน ดังนั้นจึงคาดการณ์เส้นทางอพยพของนกนางแอ่นบ้านได้ว่ายังคงบินอยู่ในเส้นทางเอเชียตะวันออกเฉียงใต้หรือ East Asian – Australasian Flyway



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการระบุเพศเพศนกนางแอ่นบ้านด้วยเทคนิคทางโมเลกุลโดยใช้ไพรเมอร์ P2/P8 และเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วย Annealing 50 องศาเซลเซียส พบว่า สามารถระบุเพศนกนางแอ่นบ้านจากจำนวน 150 ตัว ระบุเพศได้ 147 ตัว คิดเป็น 98 เปอร์เซ็นต์ ระบุเป็นเพศผู้ 73 ตัวและเพศเมีย 74 ตัว โดยไม่สามารถระบุเพศได้ 3 ตัว เนื่องจากเป็นตัวอย่างจากกระดาษ FTA ที่มีปริมาณเลือดน้อยจึงมีดีเอ็นเอไม่เพียงพอในการวิเคราะห์ เมื่อนำมาวิเคราะห์อัตราส่วนเพศ พบว่านกนางแอ่นบ้านจากจังหวัดน่านมีอัตราส่วนเพศผู้ต่อเพศเมียใกล้เคียง 1: 1 ส่วนนกนางแอ่นบ้านจากกรุงเทพมหานครมีอัตราส่วนเพศผู้มากกว่าเพศเมีย

เมื่อนำข้อมูลเพศจากการระบุเพศด้วยเทคนิคทางโมเลกุลมาหาความสัมพันธ์กับลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั้ง 10 ลักษณะ ด้วยโปรแกรม R x 64 3.4.0 และโปรแกรม Rapid Miner พบว่าความยาวจุดแต้มขาว และความเว้าลึกของขนหาง สามารถระบุเพศได้อย่างถูกต้องมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ โดยลักษณะความยาวจุดแต้มขาวที่มากกว่า 20.5 มิลลิเมตร ระบุเป็นเพศผู้ และน้อยกว่าหรือเท่ากับ 20.5 มิลลิเมตร ระบุเป็นเพศเมีย ส่วนลักษณะความเว้าลึกของขนหางที่มากกว่า 38.50 มิลลิเมตร ระบุเป็นเพศผู้ และน้อยกว่าหรือเท่ากับ 38.50 มิลลิเมตร ระบุเป็นเพศเมีย และเมื่อระบุเพศนกนางแอ่นบ้านด้วย 2 ลักษณะนี้ร่วมกัน จะสามารถระบุเพศได้ถูกต้อง 86.39 เปอร์เซ็นต์ โดยจะพิจารณาความยาวจุดแต้มขาวบนขนหางคู่แรกก่อน โดยหากมากกว่า 21.25 มิลลิเมตร ระบุเป็นเพศผู้ และน้อยกว่าหรือเท่ากับ 21.25 มิลลิเมตร ให้นำไปพิจารณาความเว้าลึกของขนหางต่อไป โดยถ้าความเว้าลึกมากกว่า 47.00 มิลลิเมตร ระบุเป็นเพศผู้ และน้อยกว่าหรือเท่ากับ 47.00 มิลลิเมตร ระบุว่าเป็นเพศเมีย ทั้งนี้ยังพบว่าความเข้มของสีขนบริเวณอกมีแนวโน้มสัมพันธ์กับเพศ

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค iPBS จำนวนทั้งหมด 30 ตัวอย่าง จากการคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมจำนวน 9 ไพรเมอร์ (2230, 2231, 2238, 2242, 2256, 2272, 2374, 2377 และ 2385) จาก 40 ไพรเมอร์ พบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรม (Similarity coefficient) อยู่ระหว่าง 0.59 – 0.90 โดยค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมที่ 0.69 สามารถแบ่งกลุ่มนกนางแอ่นบ้านเป็น 2 กลุ่ม ซึ่งสามารถแยกกลุ่มนกนางแอ่นบ้านจากจังหวัดน่านออกจากกรุงเทพมหานคร และการแบ่งกลุ่มไม่มีความสัมพันธ์กับสีขนบริเวณอกของนก

นอกจากนี้ยังศึกษาการระบุสปีชีส์ย่อยในตำแหน่งยีน *ND2* และตำแหน่ง *Cyt-b* ในตัวอย่างนกนางแอ่นบ้าน 24 ตัวอย่าง และตัวอย่างจากฐานข้อมูล 17 ตัวอย่าง เป็นนกนางแอ่นบ้านทั้ง 6 สปีชีส์ย่อย พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มนกนางแอ่นบ้านเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 มีสปีชีส์ย่อย *H. r. transitiva*, *H. r. rustica* และ *H. r. savignii* จัดอยู่ในกลุ่ม European-Middle Eastern กลุ่มที่ 2

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนลิขสิทธิ์หรือการเขียนเพื่อวัตถุประสงค์ทางวิชาการ มิใช่ผู้จัดทำเห็นชอบใช้ประโยชน์ใด ๆ
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มีสปีชีส์ย่อย *H. r. tytleri* และ *H. r. erythrogaster* โดยมีตัวอย่างจากประเทศไทยมีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับ *H. r. tytleri* กลุ่มที่ 3 สปีชีส์ย่อย *H. r. gutturalis* โดยมีตัวอย่างนกนางแอ่นบ้านจากประเทศไทยส่วนใหญ่จัดอยู่ในกลุ่มนี้ ซึ่งตัวอย่างจากกลุ่มที่ 2 และ 3 นั้นเป็นตัวอย่างที่จัดอยู่ในกลุ่ม Asian-American สำหรับตัวอย่างในกลุ่มที่ 4 ไม่สามารถระบุสปีชีส์ย่อยได้ โดยคาดว่าจะจะเป็นสปีชีส์ย่อยใหม่ แต่ยังไม่สามารถระบุได้ชัดเจน เนื่องจากไม่มีตัวอย่างจากฐานข้อมูลในการเปรียบเทียบ ดังนั้นจึงต้องมีการเก็บตัวอย่างเพิ่มเติมให้ครอบคลุมพันธ์เพื่อยืนยันผลการทดลองนี้ และจากข้อมูลของสปีชีส์ย่อยในประเทศไทย อาจกล่าวได้ว่านกนางแอ่นบ้านในประเทศไทยมีเส้นทางการบินอพยพในรูปแบบเอเชียตะวันออก-ออสเตรเลีย (East Asian-Australasian Flyway: EAAF)

5.2 ข้อเสนอแนะ

ควรมีการเก็บตัวอย่างโดยศึกษาในจังหวัดอื่นๆเพิ่มเติม และเก็บตัวอย่างจากหลายฤดูอพยพหรือเก็บตัวอย่างในฤดูผสมพันธ์ในจังหวัดที่มีการพบการทำรังวางไข่ของนกนางแอ่นบ้าน อีกทั้งควรมีการศึกษาด้วยเทคนิคทางโมเลกุลอื่นๆ เพิ่มเติม เพื่อยืนยันผลการทดลองนี้



เอกสารอ้างอิง

- นิชาภัทร ขอบอารมณ์ ไกรรัตน์ เอี่ยมอำไพ สมชาย นิ่มนวล จิฐิ สอนสา และสุพัตรา โพธิ์เอี่ยม. 2556. “การระบุเพศและความหลากหลายทางพันธุกรรมในนกสกุล *Charadrius* โดยใช้ ยีน *CHD*.” *Thai Journal of Genetics*. 6(2) : 141-149.
- ดวงรัตน์ โพธิ์เที่ยง. 2554. “การสำรวจและเฝ้าระวังการแพร่ระบาดของโรคไข้หวัดนกในนก ธรรมชาติ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2553.” หน้า 169-178. ใน *ผลงานวิจัย และ รายงานความก้าวหน้างานวิจัย ประจำปี 2553*. กลุ่มงานวิจัยสัตว์ป่า สำนักอนุรักษ์สัตว์ป่า กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช. กรุงเทพฯ.
- ดวงรัตน์ โพธิ์เที่ยง และสุมาลี ชัยพรธพานิช. 2541. “การแพร่กระจายและประชากรของนก นางแอ่นบ้านในประเทศไทย.” หน้า 4-19. ใน *ผลงานวิจัย และรายงานความก้าวหน้า งานวิจัย*. ส่วนวิจัยสัตว์ป่า สำนักวิชาการป่าไม้ กรมป่าไม้. กรุงเทพฯ.
- ธนากร ฤทธิไธสง. 2546. *นกเลี้ยงสวยงาม*. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์บริษัท ก.พล (1996) จำกัด.
- นิตยา เลาะห์จินดา. 2539. *วิวัฒนาการของสัตว์*. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : ไร่เขียว. หน้า 80-89.
- รุ่งโรจน์ จุกมงคล. 2542. *นก*. กรุงเทพฯ : สารคดี. หน้า 40-43.
- รุ่งโรจน์ จุกมงคล. 2553. *Thailand bird guide*. กรุงเทพฯ : สารคดี หน้า 326-327.
- วรกมล แน่นอุดร. 2553. “ความแปรผันของไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอตำแหน่ง 8271-8873 ในการ ถ่ายทอดพันธุกรรมฝ่ายแม่.” *วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชานิติ วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร*.
- สุธี ศุภรัฐวิกร. 2539. *ชีวิตนกจากบันทึกและความทรงจำ*. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์ Photo & life. หน้า 333-341.
- สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม นิชาภัทร ขอบอารมณ์ ตฤณเศรษฐ์ วีระพันธุ์ นาถสุดา พุทธารักษ์ และอนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม. 2555. “การระบุเพศในนกแก้วบางชนิด.” *Thai Journal of Genetics*. 5 : 94-202.
- สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม เกษรา คงกล้า ณัฐกุล ถิ่นหัวเตย ธัญลักษณ์ มาลัยทัศน์ และไกรรัตน์ เอี่ยมอำไพ. 2558. “ความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกปรอดหัวโขน และการระบุเพศ.” หน้า 184-189. ใน *การประชุมวิชาการพันธุศาสตร์แห่งชาติครั้งที่ 19*. ขอนแก่น : โรงพิมพ์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- สมชาย นิ่มนวล ดวงรัตน์ โพธิ์เที่ยง ไกรรัตน์ เอี่ยมอำไพ ศิริพร ทองอารีย์ จิฐิ สอนสา วัลยา ไชย ภักดี และฟิลลิป ดี ราวด์. 2554. “การศึกษาเส้นทางการอพยพของนกชายเลนด้วยวิธีการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ติดเครื่องหมายวงสีในประเทศไทย.” *Wildlife Yearbook*. 12 : 138-147.
- สมิทธิ สุตติบุตร. 2547. *นกสวน-นกเมือง*. กรุงเทพฯ : บ้านและสวน. หน้า 122-123.
- โอภาส ขอบเขตต์. 2542. *นกในเมืองไทย*. เล่มที่ 2. กรุงเทพฯ : สารคดี. หน้า 107-108.
- Bermúdez-Humarán, L.G., García-García, A., Leal-Garza, C.H., Riojas-Váldez, V., Jaramillo-Rangel, G. and Montes-de-Oca-Luna, R. 2002. “Molecular sexing of monomorphic endangered *Ara* birds”. *Journal of Experimental Zoology*. 292: 677-680.
- Boncoraglio, G. Martinelli, R. and Saino, N. 2008. “Sex-related asymmetry in competitive ability of sexually monomorphic Barn Swallow nestlings.” *Behavioral Ecology and Sociobiology*. 62 : 729-738.
- Bone, J.F. 1988. *Animal anatomy and physiology*. 3rd ed. New Jersey : Prentice-Hall Inc. No 572.
- Cerit, H. and Avanus, K. 2007. “Sex identification in avian species using DNA typing methods.” *World Poultry Science*. 63 : 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.E. 2006. “Sex identification of the black facedspoonbill (*Platalea minor*).” *Zoological studies*. 45(1) : 104-113.
- Costantini, V., Guaricci, A.C., Laricchiuta, P., Rausa, F. and Lacalandra, G.M. 2008. “DNA sexing in Humboldt Penguins (*Spheniscus humboldti*) from feather samples”. *Animal Reproduction Science*. 106: 162-167.
- Cotton, P.A. 2003. “Avian migration phenology and global climate change.” *School of Biological Sciences*. 100(21) : 12219-12222.
- Cramp, S. and Brooks, D.J. 1988. *Handbook of the birds of Europe, the middle east and north Africa: the birds of the western palaeartic: tyrant flycatchers to thrushes*. Oxford: Oxford University Press.
- Dalton, D.L., Kotzé, A. and Howitt, M. 2010. “Assessment of *CHD*-specific primers for gender determination in Red-billed Oxpeckers *Buphagus erythrorhynchus*”. *Ostrich*. 81: 251-257.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Dawson, D.A., Darby, S., Hunter, F.M. Krupa, A.P. Jones, I.L. and Burke, T. 2001. "A critique of avian CHD-based molecular sexing protocols illustrated by a Z-chromosome polymorphism detected in auklets". *Molecular Ecology Notes*. 1: 201-204.
- De Marchi, G. Fasola, M. Chiozzi, G. Bellati, A. and Galeotti, P. 2012. "Sex discrimination of crab plovers (*Dromas ardeola*) by morphometric traits." *Water birds*. 35(2) : 332-337.
- Dickinson, E.C. and Dekker, R.W.R.J. 2001. "Systematic notes on Asian birds 13 a preliminary review of the Hirundinidae." *Zoologische Verhandelingen Leiden*. 335 : 127-144.
- Dickinson, E.C. 2003. The howard and moore complete checklist of the birds of the world, third ed. Christopher Helm, London.
- Dillon, L.S. 1973. *Evolution : concept and consequence*. Saint Louis : The C.V. Mosby Company. No 319.
- Ding, Z. Ji, F. Huang, Q. Wang, L. Jiang, A. Zhang, C. Feng, Y. Tian, Y. Hu, H. and Liang, W. 2017. "Brood sex ratio in the Yellow-bellied Prinia (*Prinia flaviventris*)." *Avian Research*. 8 : 15.
- Dor, R. Safran, R.J. Sheldon, F.H. Winkler, D.W. and Lovette, I.J. 2010. "Phylogeny of the genus *Hirundo* and the Barn Swallow subspecies complex." *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 56 : 409-418.
- Dor, R. Safran, R. J. Vortman, Y. Lotem, A. McGowan, A. Evans, M.R. and Lovette I.J. 2012. "Population genetics and morphological comparisons of migratory European (*Hirundo rustica rustica*) and sedentary East-Mediterranean *Hirundo rustica transitiva*) Barn Swallows." *Journal of Heredity*. 103(1): 55-63.
- Duijns, S. Dijk, J.G. Kraus, R.H. Mateman, C. Brink, B. and Hooft, P. 2011. "An addition field method to sex adult Barn Swallows during the non-breeding season in Zambia: white spot length in the outer tail feather." *Ostrich*. 82 : 129-133.
- Ellegren, H. 1996. "First gene on the avian W chromosome (*CHD*) provides a tag for universal sexing of non-ratite birds." *Proceedings of the Royal Society of London Series B Biological Sciences*. 263 : 1635-1641.
- Ellegren, H. and Sheldon, B. 1997. "New tools for sex identification and the study of sex allocation in birds." *Trends in Ecology and Evolution* 12 : 255-259.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Ericson, G.P. and Johansson, S. 2003. "Phylogeny of Passerida (Aves: Passeriformes) based on nuclear and mitochondrial sequence data." *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 29 : 126-138.
- Faux, C.E. McInnes, J. and Jarman, S.N. 2014. "High-throughput real-time PCR and melt curve analysis for sexing Southern Ocean seabirds using fecal samples." *Theriogenology*. 81 : 870-874.
- Fridolfsson, A.K. and Ellegren, H. 1999. "A simple and universal method for molecular sexing of non-ratite birds." *Journal of Avian Biology*. 30 : 116-121.
- Ghorpade, P.B. Gupta, P.K. Prakash, V. Cuthbert, R.J. Kulkarni, M. Prakash, N. Das, A. Sharma, A.K. and Saini, M. 2012. "Molecular sexing of threatened *Gyps vultures*: an important strategy for conservation breeding and ecological studies." *Springer Open Journal*. 62 : 1-12.
- Griffiths, R. and Tiwari, B. 1995. "Sex of the last wild Spix's macaw." *Nature*. 375 : 454.
- Griffiths, R. Daan, S. and Dijkstra, C. 1996. "Sex identification in birds using two *CHD* genes Proc." *Royal Society Biological Sciences*. 263 : 1251-1256.
- Griffiths, R. and Korn, R.M. 1997. "A *CHD1* gene is Z chromosome linked in the chicken *Gallus domesticus*." *Gene*. 197 : 225-229.
- Griffiths, R. Double, M.C. Orr, K. and Dawson, R.J. 1998. "A DNA test to sex most birds." *Molecular Ecology*. 7 : 1071-1075.
- Griffiths, R. and Phil, D. 2000. "Sex Identification in birds Seminars in avian and exotic pet." *Medicine*. 9 : 14-26.
- Guerrini, M. Gennai, C. Panayides, P. Crabtree, A. Zuberogoitia, I. Copland, A.S. Babushkina, O. Politi, P.M. Giunchi, D. and Barbanera, F. 2014. "Large-scale patterns of genetic variation in a female-biased dispersing passerine: the importance of sex-based analyses." *Plos one*. 9(6) : 1-14.
- 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.
- Hasegawa, M. Arai, E. Watanabe, M. and Nakamura, M. 2010. "Mating advantage of multiple male ornaments in the Barn Swallow (*Hirundo rustica gutturalis*)." *Ornithological Science*. 9 : 141-148.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Hasegawa, M. and Arai, E. 2017. "Natural selection on wing and tail morphology in the Pacific Swallow." *Journal of Ornithology*. 10 : 1-8.
- Hatzofe, O. and Getreide, S. 1990. "Sex determination in vultures and other monomorphic raptors." *Torgos*. 8 : 27-29.
- Hebert, P.D.N. Stoeckle, M.Y. Zemplak, T.S. and Francis, C.M. 2004. "Identification of birds through DNA barcodes." *Plos Biology*. 2 : 312.
- Hedman, J., Albinsson, L., Ansell, C., Tapper, H., Hansson, O., Holgersson, S. and Ansell, R. 2008. "A fast analysis system for forensic DNA reference samples". *Forensic Science International: Genetics*. 2 : 184-189.
- Hermosell, I.G. Balbontin, J. Marzal, A. Reviriego, M. and De Lope, F. 2007. "Sex determination in Barn Swallows *Hirundo rustica* by means of discriminant analysis in two European populations." *Ardeola*. 54 : 93-100.
- Hirschenhauser, K. Mostl, E. and Kotrschal, K. 1999. "Seasonal patterns of sex steroids determined from feces in different social categories of Greylag Goose (*Anser anser*)." *General and Comparative Endocrinology*. 114 : 67-79.
- Humphrey, S.R. and Bain, J.R. 1990. **Endangered animals of Thailand**. Gainesville Florida : Sandhill Crane Press. 6.
- Hunt, J.S., Bermingham, E. and Ricklefs, R.E., 2001. "Molecular systematic and biogeography of Antillean thrashers, tremblers, and mockingbirds (Aves: Mimidae)". *Auk*. 118: 35-55.
- 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 : 561-567.
- Kahn, N.W. St John, J. and Quinn, T.W. 1998. "Chromosome-specific intron size differences in the avian *CHD* gene provide a simple and efficient method for sexing birds." *Auk*. 115 : 1074-1078.
- 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., Smýkal, P. and Schulman, A.H. 2010. "iPBS: A universal method for DNA fingerprinting and retrotransposon isolation". *Theoretical and Applied Genetics*. 121(8): 1419-1430.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Kalendar, R. 2011. "The use of retrotransposon-based molecular markers to analyze genetic diversity". *Field and Vegetable Crops Resarch*. 48(2): 261-274.
- Kalendar, R., Flavell, 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(4): 520-530.
- Kleven, O. Jacobsen, F. Izadnegahdar, R. Robertson, R.J. and Lifjeld, J.T. 2006. "Male tail streamer length predicts fertilization success in the North American Barn Swallow (*Hirundo rustica erythrogaster*).". *Behavioral Ecology and Sociobiology*. 59 : 412-418.
- Kose, M. Mand, R. and Møller, A.P. 1999. "Sexual selection for white tail spots in the Barn Swallow in relation to habitat choice by feather lice." *Animal Behavior*. 58 : 1201-1205.
- Kose, M. and Møller, A.P. 1999. Sexual selection, feather breakage and parasites: the importance of white spots in the tail of the Barn Swallow (*Hirundo rustica*).". *Behavioral Ecology and Sociobiology*. 45: 430-436.
- Kulaszewicz, I. Jakubas, D. and Wojczulanis-Jakubas, M. 2013. "Sex discrimination in Savi's Warbler (*Locustella luscinioides*) using morphometric traits." *Ornis Fennica*. 90 : 203-210.
- Lifjeld, J.T., Kleven, O., Jacobsen, F., McGraw, K.J., Safran, R.J. and Robertson, R.J. 2011. "Age before beauty? Relationships between fertilization success and age-dependent ornaments in barn swallows". *Behavioral Ecology Sociobiology*. 65: 1687-1697.
- Lovette, I.J. and Rubenstein, D.R. 2007. "A comprehensive molecular phylogeny of the starlings (Aves: Sturnidae) and mockingbirds (Aves: Mimidae): congruent mtDNA and nuclear trees for a cosmopolitan avian radiation." *Molecular Phylogenetic Evolution*. 44 : 1031-1056.
- Malago Jr, W. Heitor, M.F. Matheucci Jr, E. Medaglia, A. and Henrique-solva, F. 2002. "Large scale sex typing of ostriches using DNA extracted from feathers." *BMC Biotechnology*. 2 : 19.
- Malaitad, T. Poeaim, S. and Eiamampai, K. 2015. "Sex identification in Barn Swallow (*Hirundo rustica* Linnaeus) by molecular technique." *Journal of Agricultural Technology*. 11(8) : 2411-2418.

Malaitad, T. Laipasu, P., Eiamampai, K. and Poeaim, S. 2016. "Identification of the

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้สำหรับกรใช้งานเพื่อการศึกษาค้นคว้าเท่านั้น เมื่ออยู่แต่ใหม่แบบเซอริจะขอคืนด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- subspecies and gender of Barn Swallow (*Hirundo rustica*)." *Journal of Agricultural Technology* 12(7.1) : 1547-1554.
- Mehmood, A., Jaskani, M.J., Ahmad, S. and Ahmad, R. 2013. "Evaluation of genetic diversity in open pollinated guava by ipbs primers". *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*. 50(4) : 591-597.
- Møller, A.P. 1994. Sexual selection and the barn swallow. Oxford University Press, Oxford
- Møller, A.P., Magnhagen, C., Ulfstrand, A. and Ulfstrand, S. 1995. "Phenotypic quality and moult in the Barn Swallow, *Hirundo rustica*". *Behavioral Ecology*. 6: 242-249.
- 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.
- Owen, J.C. 2011. "Collecting processing and storing avian blood: a review." *Journal Field Ornithol*. 82(4) : 339-354.
- Pagani-Nunez, E. He, C. Li, B. Li, M. He, R. Jiang, A. and Goodale, E. 2016. "The breeding ecology of the Barn Swallow (*Hirundo rustica gutturalis*) in South China." *Journal of Tropical Ecology*. 32 : 260-263.
- Poeaim, S. Chobarporn, N. Eiamampai, K. Nimnuan, S. and Sornsra, T. 2014. "Gender identification in some Plover using *CHD* gene." *International Journal of Arts and Sciences*. 07(02) : 567-572.
- Rai, S. Saini, P. and Jain, A.K. 2014. "Model for prediction of dropout student using ID3 decision tree algorithm." *International Journal of Advanced Research in Computer Science and Technology*. 2(1) : 142-146.
- Ralph, C.J. G.R. Geupel, P. Pyle, T.E. Martin, and Desante, D.F. 1993. **Handbook of field methods for monitoring landbirds**. Gen. Tech. Rep. PSW-GTR-144. Albany, CA: Pacific Southwest Research Station, Forest Service, U.S. : Department of Agriculture. 1-41.
- Richner, H. 1989. "Avian laparoscopy as a field technique for sexing birds and an assessment of its effects on wild birds." *Journal Field Ornithol* 60(2) : 137-142.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Robson, D. and Barriocanal, C. 2008. "The influence of environmental conditions on the body mass of Barn Swallows (*Hirundo rustica*) during spring migration". *Journal of Ornithology*. 149: 473-478.
- Rubolini, D., and Schiavi, M. 2002. "Tail length correlates with fat stores in pre-migratory roosting Barn Swallows *Hirundo rustica*." *Ardea*. 90: 121-127.
- Sacchi, P. Soglia, D. Maione, S. Menequez, 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.
- Safran, R.J. and McGraw, K.J. 2004. "Plumage coloration, not length or symmetry of tail streamers, is a sexually selected trait in North American barn swallows".
Behavioral Ecology. 15: 455-461.
- Safran, R.J., Neuman, C.R., McGraw, K.J. and Lovette, I.J. 2005. "Dynamic paternity allocation as a function of male plumage color in barn swallows". *Science*. 309: 2210-2212.
- Safran, R. 2010. "Barn swallows: sexual and social behavior". *Encyclopedia of Animal Behavior*. 1: 139-144.
- Saino, N. Ellegren, H. and Møller, A.P. 1999. "No evidence for adjustment of sex allocation in relation to paternal ornamentation and paternity in Barn Swallows." *Molecular Ecology*. 8 : 399-406.
- Saino, N. Ambrosini, R. Martinelli, R. Calza, S. Møller, A.P. and Pilastro, A. 2002. "Offspring sexual dimorphism and sex-allocation in relation to parental age and paternal ornamentation in the Barn Swallow." *Molecular Ecology*. 11 : 1533-1544.
- Sarah, R.P. 2007. **Sexual selection of ultraviolet and structural colour signals.** United States : Science Publishers. No 1-40.
- Scordato, E.S.C. Wilkins, M.R. Semenov, G. Rubtsov, A.S. Kane, N.C. and Safran, R.J. 2017. "Genomic variation across two Barn Swallow hybrid zones reveals traits associated with divergence in sympatry and allopatry." *Molecular Ecology*. 126 : 153-162.
- Sheldon, F.H. and Winkler, D.W. 1993. "Intergeneric phylogenetic relationships of swallows estimated by DNA-DNA hybridization". *Auk*. 110: 798-824.
- Sheldon, F.H. Whittingham, L.A. Moyle, R.G. Slikas, B. and Winkler D.W. 2005.

"Phylogeny of Swallows (Aves: Hirundinidae) estimated from nuclear and"

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนำไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาตถือว่าผิดกฎหมาย
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- mitochondrial DNA sequences.” *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 35 : 254-270.
- Sheldon, F.H., Whittingham, L.A., Moyle, R.G., Slikas, B. and Winkler, D.W. 2005. “Phylogeny of swallows (Aves: Hirundinidae) estimated from nuclear and mitochondrial DNA sequences”. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 35: 254-270.
- Smith, H.G. and Montgomerie, R. 1991. “Sexual selection and the tail ornaments of North-American barn swallows. *Behavioral Ecology Sociobiology*. 28: 195-201.
- Smith, H. Cracken, J. M.C. Shepherd, D. and Velez, P. 1997. **The Mist Netter’s Bird Safety Handbook**. Canada : The Institute for bird populations. No 6-30.
- Spotswood, E.N. Goodman, K.R. Carlisle, J. Cormier, R.L. Humple, D.L. Rousseau, J. Guers, S.L. and Barton, G.G. 2011. “How safe is mist netting evaluating the risk of injury and mortality to birds.” *Ecology and Evaluation*. 3(1) : 29-38.
- Steiner, G. Preusse, G. Zimmerer, C. Elisabeth, M. Krautwald, J. Sablinskas, V. Fuhrmann, H. Koch, E and Bartels T. 2016. “Label free molecular sexing of monomorphic birds using infrared spectroscopic imaging.” *Talanta*. 150 : 155-161.
- Turner, A. 2004. “Family Hirundinidae (Swallows and martins).” *The Birds of the World*. 9 : 602-685.
- Wang, L.C. Severinghaus, L.L. Chen, C.T. Liu, L.Y. Pan, C.H. Huang, D. Lee, H.Y. Lir, J.T. Chin, S.C. Pu, C.E. and Wang, C.H. 2007. “Sexing a wider range of avian species based on two *CHD1* introns with a unified reaction condition.” *Zoo Biology*. 26 : 425-431.
- Watson, H.K. Mogg, R. J. Bond, J.M. and Durell, S.A. L. D. 2004. “Sexing Eurasian Oystercatchers *Haematopus ostralegus* from breast feathers collected when ringing.” *Wader study group bull.* 105 : 87-89.
- Weissmann, A. Reitemeier, S. Hahn, A. Gottschalk, J. and Einspanier, A. 2013. “Sexing domestic chicken before hatch: A new method for in ovo gender Identification.” *Theriogenology*. 80 : 199-205.
- Wilkins, M.R. Karaardic, H. Vortman, Y. Parchman, T.L. Albrecht, T. Petrzekova, A özkan, L. Pap, P. Hubbard, J.K. Hund, A. and Safran, R.J. 2016. “Phenotypic differentiation is associated with divergent sexual selection among closely

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

related Barn Swallow populations.” *Journal of Evolutionary Biology*. 29(12): 2410-2421.

Wojczulanis-Jakubas, K. and Jakubas, D. 2011. “Predicting the sex of the sedge warbler (*Acrocephalus schoenobaenus*) by discrimination analysis.” *Ornis Fennica*. 88 : 90-97.

Zink, R.M. Pavlova, A. Rohwer, S. and Drovetski, S.V. 2006. “Barn Swallows before barns: population histories and intercontinental colonization” *Proceedings Biological Sciences*. 273(1591) : 1245-5



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

ข้อมูลตัวอย่างนกนางแอ่นบ้าน

ตารางภาคผนวกที่ 1 ตัวอย่างนกนางแอ่นบ้านฤดูอพยพที่ 2 ดักจับวันที่ 22-23 ธันวาคม 2558

รหัสห้วงขา	รหัสทดลอง	ระบุเพศ ด้วยเทคนิค ทางโมเลกุล	น้ำหนัก (g)	ความยาว ปาก (mm)	ความยาว หัวถึงปาก (mm)	ความยาว ปีก (mm)	ความยาว หน้าแข้ง (mm)	ความยาวขน หางคู่นอก (mm)	ความยาว ขนหางคู่ใน (mm)	ความเว้าลึกของ ขนหาง (mm)	ความยาวจุด แต้มขาวบนขน หางคู่นอก (mm)	พื้นที่ของจุด แต้มขาวบน ขนหางคู่นอก (mm ²)	สีขน บริเวณ อก
2A80801	NBS01	เมีย	14	11	29.4	117	11	81	44	37	16.5	14.5	ค
2A80802	NBS02	เมีย	13.5	11.5	28.7	115	10	62	42	20	13.5	6	จ
2A80803	NBS03	ผู้	14.7	10.8	28.7	112	10	98	56	42	21.5	11.5	ก
2A80804	NBS04	ผู้	14.6	12	27.8	120	10	99	43	56	28	13	จ
2A80805	NBS05	เมีย	15.2	11.7	29.1	116	11	78	46	32	20	14	ก
2A80806	NBS06	เมีย	15.2	11	29	115	11	90	44	46	20.5	11	ข
2A80807	NBS07	เมีย	13.6	11.1	27.8	111	10	80	44	36	21	16.5	ก

หมายเหตุ: ก : อกสีส้มเข้ม

ข : อกสีส้มปานกลาง

ค : อกสีส้มอ่อนปลายหางสีส้มเข้ม

ง : อกสีส้มอ่อน

จ : อกสีขาว

: ไม่มีข้อมูล

NA : ไม่สามารถระบุเพศ

BS : ตัวอย่างจากถนนสีลม เขตบางรัก กรุงเทพมหานคร

NBS : ตัวอย่างจากอำเภอปัว จังหวัดน่าน

(ที่มา: ข้อมูลรหัสห้วงขาและลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้รับความอนุเคราะห์จากสถานีวิจัยสัตว์ป่าบึงบอระเพ็ด)

ตารางภาคผนวกที่ 1 (ต่อ)

รหัสห้วงขา	รหัสทดลอง	ระบุเพศ ด้วยเทคนิค ทางโมเลกุล	น้ำหนัก (g)	ความยาว ปาก (mm)	ความยาว หัวถึงปาก (mm)	ความยาว ปีก (mm)	ความยาว หน้าแข้ง (mm)	ความยาวขน หางคู่นอก (mm)	ความยาว ขนหางคู่ใน (mm)	ความยาว แข้งของ ขนหาง (mm)	ความยาวจุด แต้มขาวบนขน หางคู่นอก (mm)	พื้นที่ของจุด แต้มขาวบน ขนหางคู่นอก (mm ²)	สีขน บริเวณ อก
2A80808	NBS08	ผู้	13.8	10.6	28.1	115	10	83	44	39	25	14	ง
2A80809	NBS09	ผู้	14.5	11.8	29.1	112	11	82	41	41	22.5	15.5	จ
2A80810	NBS10	ผู้	13	12.6	27.7	107	9.7	88	42	46	22	12	จ
2A80811	NBS11	เมีย	13.4	11.3	27.8	111	10	74	42	32	19.5	11	ง
2A80812	NBS12	เมีย	13.5	10.4	27	111	10	78	44	34	16	9	ค
2A80813	NBS13	ผู้	13.1	11.8	27.6	113	10	84	41	43	26.5	16	ง
2A80814	NBS14	เมีย	13.2	11.6	27.4	114	11	78	43	35	10.5	4.5	ง
2A80815	NBS15	เมีย	13.6	11.4	27.8	116	10	80	43	37	20	14	ง
2A80816	NBS16	เมีย	13.3	12	28.4	113	11	81	43	38	22	16	ค
2A80817	NBS17	เมีย	13.4	10.9	28.4	113	10	74	42	32	16	8.5	ง
2A80818	NBS18	ผู้	13.7	12.8	29.6	111	11	88	42	46	25.5	13.5	ข
2A57824	NBS19	ผู้	13.3	10.7	28.6	114	11	79	42	37	26.5	15	ง
2A80819	NBS20	เมีย	13.4	10.7	27.8	114	10	79	46	33	17	8.5	จ
2A80820	NBS21	เมีย	13.2	11.5	28	118	9.9	81	43	38	14	7	จ
2A80821	NBS22	ผู้	14	11.4	28.9	113	9.9	97	42	55	31.5	13.5	จ
2A80822	NBS23	เมีย	15.2	11.2	29.2	113	11	72	43	29	19	10.5	จ

(ที่มา: ข้อมูลรหัสห้วงขาและลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้รับความอนุเคราะห์จากสถานีวิจัยสัตว์ป่าบึงบอระเพ็ด)

ตารางภาคผนวกที่ 1 (ต่อ)

รหัสห้วงขา	รหัสทดลอง	ระบุเพศ ด้วยเทคนิค ทางโมเลกุล	น้ำหนัก (g)	ความยาว ปาก (mm)	ความยาว หัวถึงปาก (mm)	ความยาว ปีก (mm)	ความยาว หน้าแข้ง (mm)	ความยาวขน หางคู่ใน (mm)	ความยาว ขนหางคู่ใน (mm)	ความเว้าลึกของ ขนหาง (mm)	ความยาวจุด แต้มขาวบนขน หางคู่ใน (mm)	พื้นที่ของจุด แต้มขาวบน ขนหางคู่ใน (mm ²)	สีขน บริเวณ อก
2A80823	NBS24	ผู้	16.4	11.6	29.4	119	11	108	42	66	31	13	ก
2A80824	NBS25	ผู้	12.4	11.6	28.3	116	10	86	42	44	23.5	15	จ
2A80825	NBS26	เมีย	13.9	12	28.8	112	11	82	42	40	14	9.5	ง
2A80826	NBS27	เมีย	13.8	11.3	28.2	114	11	78	42	36	15.5	6.5	ง
2A80827	NBS28	ผู้	14.2	11.4	28.7	118	10	96	43	53	31.5	19.5	จ
2A80828	NBS29	เมีย	14.3	10.8	28.6	116	10	82	44	38	21	12	จ
2A80829	NBS30	เมีย	13.4	11.7	28.5	111	11	71	43	28	18.5	9	จ
2A80830	NBS31	ผู้	15.1	13.2	27.7	111	11	80	39	41	23	16	ค
2A80831	NBS32	ผู้	13.7	12.4	29.1	109	9.8	79	40	39	26.5	10.5	ค
2A80832	NBS33	ผู้	14.7	11.4	29	118	11	96	40	56	24.5	19	ก
2A80833	NBS34	ผู้	14.7	11.2	27.8	112	10	85	42	43	23	12.5	ก
2A80834	NBS35	เมีย	13.6	11	28.8	115	11	84	44	40	18.5	10.5	ง
2A80835	NBS36	ผู้	13.9	11.8	29.3	113	10	88	42	46	23	12	ค
2A80836	NBS37	เมีย	13.2	11.5	28.7	113	9.8	80	44	36	19	10	ข
2A80837	NBS38	เมีย	13.8	11.9	29.6	118	11	80	44	36	20.5	12	ค
2A80838	NBS39	ผู้	15.7	10.3	27.7	117	11	98	42	56	22	13.5	ง

(ที่มา: ข้อมูลรหัสห้วงขาและลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้รับความอนุเคราะห์จากสถานีวิจัยสัตว์ป่าบึงบอระเพ็ด)

ตารางภาคผนวกที่ 1 (ต่อ)

รหัสห้วงขา	รหัสทดลอง	ระบุเพศ ด้วยเทคนิค ทางโมเลกุล	น้ำหนัก (g)	ความยาว ปาก (mm)	ความยาว หัวถึงปาก (mm)	ความยาว ปีก (mm)	ความยาว หน้าแข้ง (mm)	ความยาวขน หางคู่นอก (mm)	ความยาว ขนหางคู่ใน (mm)	ความเว้าลึกของ ขนหาง (mm)	ความยาวจุด แต้มขาวบนขน หางคู่นอก (mm)	พื้นที่ของจุด แต้มขาวบน ขนหางคู่นอก (mm ²)	สีขน บริเวณ อก
2A80839	NBS40	ผู้	13.9	11.3	28.7	122	11	94	45	49	21.5	12.5	จ
2A80840	NBS41	เมีย	14.4	11	28	114	11	93	46	47	25.5	13	จ
2A80841	NBS42	ผู้	13.5	11.3	27.6	114	9.7	94	43	51	13.5	10	จ
2A80842	NBS43	เมีย	14.3	12.2	29	118	10	90	46	44	22	11.5	จ
2A80843	NBS44	ผู้	14.4	12.1	29.7	114	10	76	42	34	20.5	12	ง
2A80844	NBS45	เมีย	13.9	11.6	28.9	117	11	96	47	49	26	17	ก
2A80845	NBS46	ผู้	14.6	12.5	29.7	113	11	84	42	42	25	14	ง
2A80846	NBS47	ผู้	14.6	11.9	28.6	114	11	105	46	59	35	22	ข
2A80847	NBS48	เมีย	13.4	12.2	29	116	11	82	44	38	20.5	13	ค
2A80848	NBS49	ผู้	14.8	11.2	29.3	118	11	88	42	46	32	17.5	จ
2A80849	NBS50	ผู้	14.5	11.4	28.7	118	11	96	41	55	29	21	ข
2A80850	NBS51	เมีย	14.1	11.4	27.8	114	11	77	42	35	13	7.5	ข
2A80851	NBS52	เมีย	13.7	11.5	29.2	111	11	78	42	36	16	9.5	จ
2A80852	NBS53	ผู้	13.6	12.3	29.3	119	10	100	43	57	25.5	12.5	ก
2A80853	NBS54	เมีย	14.2	11.5	28.8	117	12	79	44	35	18	11.5	ค
2A80854	NBS55	เมีย	13.4	11	28.8	115	11	76	43	33	17	9.5	จ

(ที่มา: ข้อมูลรหัสห้วงขาและลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้รับความอนุเคราะห์จากสถานีวิจัยสัตว์ป่าบึงบอระเพ็ด)

ตารางภาคผนวกที่ 1 (ต่อ)

รหัสห้วงขา	รหัสทดลอง	ระบุเพศ ด้วยเทคนิค ทางโมเลกุล	น้ำหนัก (g)	ความยาว ปาก (mm)	ความยาว หัวถึงปาก (mm)	ความยาว ปีก (mm)	ความยาว หน้าแข้ง (mm)	ความยาวขน หางคู่ใน (mm)	ความยาว ขนหางคู่ใน (mm)	ความยาวจุด แต้มขาวบนขน หางคู่ใน (mm)	พื้นที่ของจุด แต้มขาวบน ขนหางคู่ใน (mm ²)	สีขน บริเวณ อก	
2A80855	NBS56	เมีย	13.7	11	28.8	117	11	78	42	36	20.5	10.5	จ
2A80856	NBS57	เมีย	13.4	11.9	28.4	113	9.9	72	44	28	16	8.5	จ
2A80857	NBS58	เมีย	12.6	10.4	28	111	10	77	42	35	15	9	ค
2A80858	NBS59	ผู้	15.1	11.5	28.9	121	10	88	41	47	26.5	17.5	ง
2A80859	NBS60	เมีย	14.4	11.4	28.8	115	11	81	43	38	24.5	9	ง
2A80890	NBS61	เมีย	17.7	13.1	28.4	121	11	80	46	34	16	11.5	จ
2A80891	NBS62	ผู้	15.7	13.7	28.9	113	10	85	42	43	20	12	ก
2A80892	NBS63	เมีย	15.3	12.3	28.1	117	10	82	44	38	16.5	8	ง
2A80893	NBS64	ผู้	14.6	12.2	29.5	112	11	89	41	48	20	9.5	ง
-	NBS65	NA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	NBS66	NA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2A80894	NBS67	เมีย	13.2	12.8	28.3	110	11	55	40	15	10.5	7	จ
2A80897	NBS68	เมีย	14.8	11.2	28.3	113	10	77	43	34	11.5	7	จ
2A80898	NBS69	เมีย	15.4	11.6	27.8	114	11	75	43	32	19	13	จ
2A80899	NBS70	ผู้	14.7	11.8	28	117	11	93	42	51	31	13	ง
2A80900	NBS71	ผู้	14.6	11.8	28	113	11	83	43	40	16.5	12.5	ง

(ที่มา: ข้อมูลรหัสห้วงขาและลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้รับความอนุเคราะห์จากสถานีวิจัยสัตว์ป่าบึงบอระเพ็ด)

ตารางภาคผนวกที่ 1 (ต่อ)

รหัสห้วงขา	รหัสทดลอง	ระบุเพศ ด้วยเทคนิค ทางโมเลกุล	น้ำหนัก (g)	ความยาว ปาก (mm)	ความยาว หัวถึงปาก (mm)	ความยาว ปีก (mm)	ความยาว หน้าแข้ง (mm)	ความยาวขน หางคู่นอก (mm)	ความยาว ขนหางคูใน (mm)	ความยาวเล็กน้อย ของ ขนหาง (mm)	ความยาวจุด แต้มขาวบนขน หางคู่นอก (mm)	พื้นที่ของจุด แต้มขาวบน ขนหางคู่นอก (mm ²)	สีขน บริเวณ อก
2A81601	NBS72	เมีย	14.6	12.1	28.2	117	10	77	46	31	19.5	8	ง
2A81602	NBS73	เมีย	16.6	12.5	28.7	115	11	82	47	35	13.5	5.5	ง
2A81603	NBS74	ผู้	15.5	12.2	28.9	115	9.8	90	41	49	29.5	19.5	ข
2A81604	NBS75	เมีย	14.7	11.6	28.4	114	10	73	45	28	21	9.5	จ
2A81605	NBS76	ผู้	15.2	11.6	28.1	ผลัดขนปีก	11	83	42	41	21.5	13	ค
2A81606	NBS77	เมีย	15.5	12.1	28.8	112	11	74	42	32	21.5	10	จ
2A81607	NBS78	ผู้	15.4	12.5	28.6	115	10	80	42	38	21	14	จ
2A81608	NBS79	เมีย	15.7	12	28.4	112	11	74	41	33	18	10	จ
2A81609	NBS80	ผู้	15.8	12.3	29	116	11	84	42	42	23.5	15.5	ค
2A81610	NBS81	ผู้	15.7	12.3	28.5	117	11	83	43	40	24	17.5	จ
2A81611	NBS82	ผู้	14.8	12	28.2	115	11	86	42	44	25	12.5	ง
2A81612	NBS83	NA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2A81613	NBS84	เมีย	15	11.9	28.5	116	11	76	44	32	10.5	5.5	จ
2A81614	NBS85	เมีย	13.5	11.3	27.6	113	10	86	43	43	14	7.5	ง
2A81615	NBS86	เมีย	15.3	12	28.6	114	11	76	43	33	19.5	14.5	จ
2A81616	NBS87	เมีย	15.9	11.1	28.4	117	9.9	82	44	38	17	10.5	ง

(ที่มา: ข้อมูลรหัสห้วงขาและลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้รับความอนุเคราะห์จากสถานีวิจัยสัตว์ป่าบึงบอระเพ็ด)

ตารางภาคผนวกที่ 1 (ต่อ)

รหัสท่วงขา	รหัสทดลอง	ระบุเพศ ด้วยเทคนิค ทางโมเลกุล	น้ำหนัก (g)	ความยาว ปาก (mm)	ความยาว หัวถึงปาก (mm)	ความยาว ปีก (mm)	ความยาว หน้าแข้ง (mm)	ความยาวขน ทางคู่นอก (mm)	ความยาว ขนทางคู่ใน (mm)	ความเว้าลึกของ ขนทาง (mm)	ความยาวจุด แต้มขาวบนขน ทางคู่นอก (mm)	พื้นที่ของจุด แต้มขาวบน ขนทางคู่นอก (mm ²)	สีขน บริเวณ อก
2A81617	NBS88	ผู้	15.1	12.7	28.6	114	10	93	42	51	24.5	15.5	ง
2A81618	NBS89	เมีย	14.2	11.6	28	113	11	75	42	33	9	5.5	จ
2A81619	NBS90	เมีย	14.6	12.3	27.8	117	11	77	41	36	14	7	ง
2A81620	NBS91	ผู้	15	11.5	28.4	ผลัดขนปีก	9.9	81	42	39	27	15	ง
2A81621	NBS92	เมีย	15.4	12.7	28	123	11	76	44	32	17	9	ก
2A81622	NBS93	เมีย	14.7	12.5	29.1	114	11	79	41	38	17.5	12.5	ข
2A81623	NBS94	เมีย	13.6	12.1	27.8	ผลัดขนปีก	10	67	44	23	16.5	7.5	ค
2A81624	NBS95	เมีย	15.7	13	29.8	115	11	80	44	36	18	12.5	ง
2A81625	NBS96	เมีย	14.6	10.8	27.7	118	11	98	45	53	24	14.5	ง
2A81626	NBS97	เมีย	15.7	11.7	28.6	113	11	71	42	29	15	9.5	จ
2A81627	NBS98	เมีย	15.1	12.5	29.6	ผลัดขนปีก	11	73	43	30	18	10.5	ค
2A81628	NBS99	เมีย	15	11.6	28.4	116	10	81	43	38	20.5	9.5	จ
2A81629	NBS100	เมีย	15	12.6	29.1	110	11	68	40	28	18	13	จ
2A81630	NBS101	ผู้	14	12.2	28.9	113	11	70	42	28	18	14	จ
2A81631	NBS102	เมีย	15.8	12.1	29.5	119	11	78	45	33	18	10.5	ง
2A81632	NBS103	เมีย	15	12.2	28.3	116	11	78	45	33	16	9.5	ข

(ที่มา: ข้อมูลรหัสท่วงขาและลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้รับความอนุเคราะห์จากสถานีวิจัยสัตว์ป่าบึงบอระเพ็ด)

ตารางภาคผนวกที่ 1 (ต่อ)

รหัสห้วงขา	รหัสทดลอง	ระบุเพศ ด้วยเทคนิค ทางโมเลกุล	น้ำหนัก (g)	ความยาว ปาก (mm)	ความยาว หัวถึงปาก (mm)	ความยาว ปีก (mm)	ความยาว หน้าแข้ง (mm)	ความยาวขน หางคู่อก (mm)	ความยาว ขนหางคู่ใน (mm)	ความเว้าลึกของ ขนหาง (mm)	ความยาวจุด แต้มขาวบนขน หางคู่อก (mm)	พื้นที่ของจุด แต้มขาวบน ขนหางคู่อก (mm ²)	สีขน บริเวณ อก
2A81633	NBS104	ผู้	14.8	11.5	28.4	116	11	87	41	46	30.5	21.5	ง
2A81634	NBS105	ผู้	16	11.9	27.9	117	11	96	44	52	21.5	12	จ
2A81635	NBS106	ผู้	15.4	11.5	28.8	114	11	100	42	58	26	19.5	จ
2A81636	NBS107	ผู้	14	11.8	28.4	111	10	91	41	50	30.5	19	ง
2A81637	NBS108	ผู้	13.8	11.6	28	114	10	91	41	50	28	15.5	ช
2A81638	NBS109	เมีย	13.9	12.3	28.7	117	10	76	42	34	17	8	ช
2A81639	NBS110	เมีย	15.4	11.6	28	114	11	72	43	29	20	13	จ
2A81640	NBS111	ผู้	15.7	12.9	29.1	120	11	95	45	50	23.5	12	ง
2A81641	NBS112	เมีย	16	12.2	28.3	116	10	82	43	39	18	10	จ
2A81642	NBS113	เมีย	15	11.9	28.3	116	10	70	41	29	13.5	7	จ
2A81643	NBS114	ผู้	15.6	13.2	29.6	114	10	74	42	32	26	13	ช
2A81644	NBS115	เมีย	13.9	11.9	28	114	10	76	44	32	14	6.5	จ
2A81645	NBS116	ผู้	14.7	11.4	28.2	112	10	62	43	19	13.5	6	ง
2A81646	NBS117	ผู้	15.9	12.1	28.7	112	10	80	43	37	21	13.5	ง
2A81647	NBS118	ผู้	14.9	11.5	28.5	119	10	108	45	63	35	19.5	ง
2A81648	NBS119	ผู้	15.2	10.8	28.7	117	10	103	45	58	26	17	ช
2A81649	NBS120	เมีย	14.9	12	28.7	116	10	82	46	36	15	9	ง

(ที่มา: ข้อมูลรหัสห้วงขาและลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้รับความอนุเคราะห์จากสถานีวิจัยสัตว์ป่าบึงบอระเพ็ด)

ตารางภาคผนวกที่ 2 ตัวอย่างนกนางแอ่นบ้านฤดูอพยพที่ 2 ดักจับวันที่ 11 มกราคม 2559

รหัสห่วงขา	รหัสทดลอง	ระบุเพศ ด้วยเทคนิค ทางโมเลกุล	น้ำหนัก (g)	ความยาว ปาก (mm)	ความยาว หัวถึงปาก (mm)	ความยาว ปีก (mm)	ความยาว หน้าแข้ง (mm)	ความยาวขน หางคู่นอก (mm)	ความยาว ขนหางคู่ใน (mm)	ความเว้าลึกของ ขนหาง (mm)	ความยาวจุด แฉิมขาวบนขน หางคู่นอก (mm)	พื้นที่ของจุด แฉิมขาวบน ขนหางคู่นอก (mm ²)	ลักษณะ บริเวณ อก
2A42501	BS62	เมีย	14.5	12.3	28.8	111	10.5	81	44	37	12.5	5.5	ง
2A42502	BS63	เมีย	14.6	13.1	29.2	117	10.9	76	45	31	15.5	8	ง
2A42503	BS64	เมีย	14.8	11.4	28.6	ผลัดขนปีก	10.5	90	42	48	24	12	ง
2A42504	BS65	เมีย	14.1	12.6	28.1	117	10.9	86	49	37	25.5	14	จ
2A42505	BS66	ผู้	14.2	11.7	28.9	113	11.1	90	41	49	30	17.5	จ
2A42506	BS67	ผู้	15.3	12.2	29.2	115	10.1	102	40	62	23	6.5	ช
2A42507	BS68	ผู้	15.2	12.8	29.2	116	10.9	74	40	34	26.5	16	-
2A42508	BS69	ผู้	16.5	12.4	29.8	116	10.8	71	42	29	29.5	13.5	ช
2A42509	BS70	ผู้	16.1	12.3	29.3	112	11.2	71	39	32	28.5	9.5	ช
2A42510	BS71	ผู้	16.1	12.5	29.4	114	10.8	94	41	53	21.5	12.5	ง
2A42511	BS72	ผู้	16.7	11.3	28.8	116	10.8	62	42	20	22.5	12	ง
2A42512	BS73	ผู้	15.4	12.5	29.3	115	10.2	92	44	48	24	11	ช
2A42513	BS74	ผู้	15.1	11.6	28.7	111	10.3	87	44	43	23	9.5	ง
2A42514	BS75	ผู้	15.4	12.3	28.4	120	10.6	85	43	42	31.5	13	ง
2A42515	BS76	ผู้	13.6	12.4	28.6	112	10.1	72	41	31	23	9.5	จ
2A42516	BS77	ผู้	12.5	12.8	29.1	113	9.5	86	41	45	23	12.5	ง

(ที่มา: ข้อมูลรหัสห่วงขาและลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้รับความอนุเคราะห์จากสถานีวิจัยสัตว์ป่าบึงบอระเพ็ด)

ตารางภาคผนวกที่ 2 (ต่อ)

รหัสห้วงขา	รหัสทดลอง	ระบุเพศ ด้วยเทคนิค ทางโมเลกุล	น้ำหนัก (g)	ความยาว ปาก (mm)	ความยาว หัวถึงปาก (mm)	ความยาว ปีก (mm)	ความยาว หน้าแข้ง (mm)	ความยาวขน หางคู่นอก (mm)	ความยาว ขนหางคู่ใน (mm)	ความยาวเล็กของ ขนหาง (mm)	ความยาวจุด แถมขาบนบน หางคู่นอก (mm)	พื้นที่ของจุด แถมขาบน บนหางคู่นอก (mm ²)	สีขน บริเวณ อก
2A42517	BS78	ผู้	15.6	11.8	28.7	121	11	86	42	44	30.5	13	ข
2A42518	BS79	ผู้	13.7	11.7	28.9	115	10.3	72	44	28	22.5	8.5	ข
2A42519	BS80	ผู้	14	12	28.8	112	9.9	98	41	57	27.5	14	ง
2A42520	BS81	ผู้	14.7	11.8	29.1	ผลัดขนปีก	10.1	109	44	65	20	10	ง
2A42521	BS82	ผู้	14.8	12	28.5	108	10.1	79	40	39	19.5	9	ข
2A42522	BS83	ผู้	16	12.4	29.7	119	10.7	101	48	53	33	21	ง
2A42523	BS84	เมีย	13.3	12.2	29.1	112	9.8	76	43	33	26.5	8.5	จ
2A42524	BS85	เมีย	14.5	12.5	28.9	115	10.8	76	46	30	16.5	5.5	ง
2A42525	BS86	ผู้	14	11.7	29.4	13	10.8	90	42	48	30	7	ข
2A38848	BS87	ผู้	14.3	12	29	113	10.5	88	44	44	13	4.5	จ
2A42526	BS88	ผู้	13.8	12.1	29	112	9.8	78	41	37	17	5	ง
2A42527	BS89	เมีย	14.4	11.5	28.8	114	10.1	84	44	40	12.5	4.5	ง
2A42528	BS90	เมีย	14.2	12.1	29.3	115	10.9	88	43	45	16	6	ข
2A83611	BS91	ผู้	15.3	12	28.8	118	10.2	103	41	62	27	6	ง

(ที่มา: ข้อมูลรหัสห้วงขาและลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้รับความอนุเคราะห์จากสถานีวิจัยสัตว์ป่าบึงบอระเพ็ด)

หนังสือรับรองการใช้ประโยชน์จากงานวิจัยหรืองานสร้างสรรค์

ชื่อหน่วยงาน/องค์กร กลุ่มงานวิจัยสัตว์ป่า สำนักอนุรักษ์สัตว์ป่า กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช สถานที่ตั้ง 61 ถนนพหลโยธิน แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพมหานคร โทรศัพท์ 029407159
ข้าพเจ้าขอรับรองว่าได้นำผลงานวิจัย/งานสร้างสรรค์ เรื่อง เส้นทางบินอพยพและโครงสร้างประชากรของนกนางแอ่นบ้าน (*Hirundo rustica*): หลักฐานจากเครื่องหมายโมเลกุล ซึ่งเป็นผลงานของ ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เยี่ยม คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และ นายไกรรัตน์ เอี่ยมอำไพ หัวหน้าสถานีวิจัยสัตว์ป่าบึงบอระเพ็ด มาใช้ประโยชน์ช่วงเดือน ธันวาคม 2559 และมกราคม 25560 โดยนำไปใช้ประโยชน์สรุปดังนี้

นำข้อมูลการศึกษาเพศนกนางแอ่นบ้านจากเทคนิควิธีทางโมเลกุล มาหาความสัมพันธ์กับข้อมูล biometrics เพื่อใช้ในการบ่งชี้เพศในภาคสนาม จากข้อมูลทำให้ทราบอัตราส่วนระหว่างเพศของประชากนกนางแอ่นบ้านที่อพยพเข้ามายังประเทศไทย รวมทั้งทราบข้อมูลด้านความหลากหลายของนกนางแอ่นบ้านระหว่างนกนางแอ่นบ้านที่จังหวัดน่าน และกรุงเทพมหานคร ซึ่งเป็นประโยชน์ในการศึกษาวิจัยทั้งด้านพฤติกรรมและนิเวศวิทยาของนกนางแอ่นบ้าน

ลงชื่อ

(นายศักดิ์สิทธิ์ ชัมเจริญ)

ตำแหน่ง หัวหน้ากลุ่มงานวิจัยสัตว์ป่า สำนักอนุรักษ์สัตว์ป่า

วันที่/...../.....

ประทับตราหน่วยงาน (ถ้ามี)

หมายเหตุ แบบหลักฐานที่แสดงการนำไปใช้ประโยชน์ เช่น ภาพถ่าย (ถ้ามี)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลงานทางวิชาการ



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Sex identification in barn swallows (*Hirundorustica* Linnaeus) by molecular technique

Thanyalak Malaitad¹, Supattra Poeaim^{1*} and Krairat Eiamampai²

¹Department of Biology, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang(KMITL), Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand

²Wildlife Research Division, Wildlife Conservation Office, Department of National Parks, Wildlife and Plant Conservation, Chatuchak, Bangkok, 10900, Thailand

Malaitad, T., Poeaim, S. and Eiamampai, K. (2015). Sex identification in barn swallows (*Hirundorustica* Linnaeus) by molecular technique. *Journal of Agricultural Technology*. 11(8): 2411-2418.

Sex-ratio of birds is an important understanding behavior, population structure, patterns of migration and estimating extinction risk. However, it is difficult to understand in some birds because their external features are sexually monomorphic. In Thailand, the barn swallows (*Hirundorustica* Linnaeus) as a migratory bird that the female is similar in appearance to the male. So, the polymerase chain reaction (PCR) technique for determination of the sex were investigated. Birds sexing can be identified which based on *chromo-helicase-DNA-binding* (*CHD*) gene located on sex chromosomes. Male birds are homogametic sex (ZZ sex chromosomes) while female birds are heterogametic sex (Z and W sex chromosomes). To selection a suitable primer for gender identification, the PCR reactions were used three primer sets, including P2/P8, 1237L/1272H and 2550F/2718R primers. As results, P2/P8 primers were clearly differed between *CHD-Z* and *CHD-W* allele by agarose gel electrophoresis analysis. Therefore, sexing identification was attempted in 61 samples of *H. rustica* using P2/P8 primers. The sample consisted of 41 males (67.21%) and 17 females (27.87%); however, three samples (4.92%) could not amplify. The results of molecular sexing would also have implications for sex-ratio data of barn swallows in Thailand.

Keywords: Sexing identification, *chromo-helicase DNA binding* (*CHD*), barn swallows

Introduction

The barnswallows (*Hirundorustica* Linnaeus) are migratory bird that is a group of passerines in the family Hirundinidae. They migrate northwards into Thailand after the breeding season. In Bangkok, they are very numerous during peak migration period between November and January. Physical characteristics, the barn swallows are small to medium-sized birds about six inches long. They have a dark blue upper body and head, extending in a line through the eye. Their throat and forehead is brown or dark rusty orange with a paler orange chest and underside. The outer couple tail is the longest with a deeply forked

* Corresponding Author: Supattra Poeaim, E-mail: poeaim@hotmail.com

tail. Juveniles look similar to adults, but have much shorter tails. Including, these migratory birds are sexually monomorphic, which means that the female is similar in appearance to the male. However, some reports showed that the female's tail is a little less forked and her underparts are a little paler (Brown and Brown, 1999). In bird, colorful and elaborate feather are important traits in mate choice. Like the barn swallows, white tail markings or white spots and the length of the outermost tail feathers are importance and quality for sexual selection (Kose *et al.*, 1999). In particular, the length of the outermost tail feathers used to determine the sex that males had significantly longer outermost tail feathers than females (Smith and Montgomerie, 1991; Hermosell *et al.*, 2007). However, this observation might uncertain because the dual tail is broken from migration or flight. So, several papers showed significant positive correlation between the length or area of white spots and gender (Møller *et al.*, 1995; Kose and Møller, 1999). For example, Duijns *et al.* (2011) were found that the length of white spots less than 17.5mm as females and those with a white spot length more than 29.5 mm as males. However, this method is difficult to apply in the field and also take a long time for the measurement. So, the molecular techniques for birds sexing are developed.

Nowadays, birds sexing can be identified which based on *chromohelicase-DNA-binding (CHD)* gene located on sex chromosomes. Male birds are homogametic sex (ZZ sex chromosomes) while female birds are heterogametic sex (Z and W sex chromosomes) (Griffiths and Tiwari, 1995; Ellegren, 1996; Griffiths and Korn, 1997; Ellegren and Sheldon, 1997; Griffith *et al.*, 1998). Because of the intron length difference between the *CHD-Z* and *CHD-W* allele, amplicons with a single band are observed in males and two bands in females. However, the universal primers in bird sexing take advantage of size differences in the *CHD-Z* and *CHD-W* allele such as P2/P8 (Griffiths *et al.*, 1998) 1237L/1272H (Kahn *et al.*, 1998) and 2550F/2718R (Fridolfsson and Ellegren, 1999) primer. Those primers has been a commonly used primer set for sex identification in short-toed-eagle (Sacchi *et al.*, 2004), black-faced spoonbill (Cheng *et al.*, 2006), Eurasian oystercatcher (Watson *et al.*, 2004), some plover (Poeaim *et al.*, 2014), black-winged stilt (Siripong *et al.*, 2015). In Thailand, sex-ratio has not been reported in barn swallows. Therefore, the aims of research findings were investigated by the PCR technique for sex identification in barn swallows. Furthermore, the different primers (P2/P8, 1237L/1272H and 2550F/2718R) to select a suitable primer for gender identification were also determined.

Materials and methods

Sample collection and DNA extraction

The barn swallows were captured in January 2015 at Si Lom Road, Bangkok, Thailand which this site is a traditional roosting place of barn swallows during migration season. The barn swallows were identified into species based on morphological characters and banded by the staff of the wildlife research division, Department of National Parks, Wildlife and plant Conservation, Thailand. The feather quill contained soft tissue which were collected from individual barn swallow and placed in a 1.5 ml microcentrifuge tube containing 70% ethanol. A 0.2-0.5 cm section was cut from the terminal portion of feather quill, and used for DNA extraction with GF-1 tissue DNA extraction kit (Vivantis, Malaysia). The yield of the extracted DNA was quantified by spectrophotometry and DNA concentration was also checked by agarose electrophoresis method on 1 % agarose gel in 1X TBE buffer.

PCR amplification

In order to select a primer set, molecular sexing was run according to the procedure described in Poeaim *et al.*, (2014). In a preliminary test, two examples of barn swallows (BS19 and BS20) were used to amplify with chicken which know sex used as positive control (cock: C1 and hen: C2). For 61 barn swallows using PCR amplification of slightly modified. Briefly, samples were sexed using three universal targeting two different sizes of *CHD-W* and *CHD-Z* alleles. PCR reactions are consisted of 300 ng DNA template, 12.5 μ L of 2 X Taq master mixes (Vivantis), 4 μ L of each 20 pmol/ μ l primers and adjusted by 1.5 μ L nuclease free water. The conditions for PCR amplification conditions were determined an initial denaturing step at 95 °C for 5 min, 35 cycles of 95 °C for 1 min, 50 °C for 1 min, and 72 °C for 1 min, and final extension at 72 °C for 10 min. PCR products were separated by 3% agarose gel (Vivantis) electrophoresis with 50 bp DNA Ladder (New England Biolabs) that used as size markers.

Results and Discussions

In this study, the genomic DNA from feathers were isolated that the DNA yield was sufficient in quantity and quality. Although blood is highly recommended for DNA extraction however, the birds become stress and trauma. In order to select a primer set, three primer sets (including P2/P8, 1237L/1272H and

2550F/2718R) were used for gendering identification of CHD gene of barn swallows. The results were shown that 2550F/2718R and 1272H/1273L primers were not suitable for sex identification of barn swallows. Although, 2550F/2718R primers would give a difference in length between introns in the *CHD-Z* and *CHD-W* alleles, it seems that the deepness of *CHD-W* bands was not clearly shown. The 1272H/1237L primers were not stable both expressed multiple bands and not clearly shown the bands between male and female birds. Nevertheless, P2/P8 primers were differently cleared between male and female birds by fragments on agarose gel electrophoresis. The females had two PCR products of 400 bp (*CHD-W*) and 350 bp (*CHD-Z*) while males shared a single product of 350 bp (*CHD-Z*) (Figure 1). The reduced PCR products about 50 bp, enhanced the relative size contract between the two PCR amplicons with not easy and clear resolution in routine 1% agarose gel. So, a little higher 3% agarose gel was then used, running the gel slower than usual could help resolution and fresh buffer are always useful. In these barn swallows, the size differences ranged from 50 bp between the two ZW alleles. In general, the difference in size between *CHD-Z* and *CHD-W* fragments amplified with the P2/P8 primers ranges from 10 to 80 bp. These results were similar to the works of Fridolfsson and Ellegren (1999), Jensen *et al.* (2003) and De Marchi *et al.* (2012). For sexing determination, the P2/P8 primer sets usually used to amplify the CHD genes in barn swallows was also explained by Kleven *et al.* (2006), Boncoraglio *et al.* (2008) and Vortman *et al.* (2011). Therefore, P2/P8 primers were used to identify the gender with all samples.

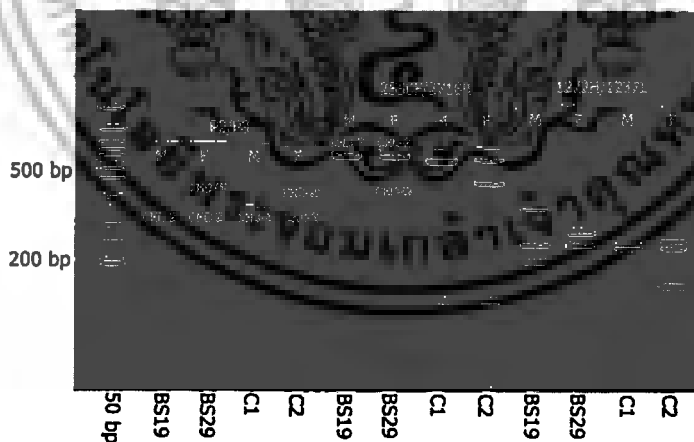


Figure 1. Comparison of PCR products in barn swallows (*Hirundo rustica*: BS19 and BS29) and chicken (*Gallus gallus*: C1 and C2) from P2/P8, 1237L/1272H and 2550F/2718R primers by 3% agarose gel electrophoresis. M = male and F = female

To identify sex in 61 barn swallows, the suitable condition to amplify DNA was found which the period of annealing at temperature 50°C by using primer P2/P8. The PCR products are the most shown clearly bands. After 3% gel agarose analysis, imager to check for the presence of bands; female PCR products appeared as two separated bands (BS53 and BS58) and male PCR products as a single (*CHD-Z*) band. The samples codes BS10, BS11, BS12, BS13, BS14, BS15, BS54, BS55, BS56, BS57, BS59, BS60, BS61 are male as seen in Figure 2.

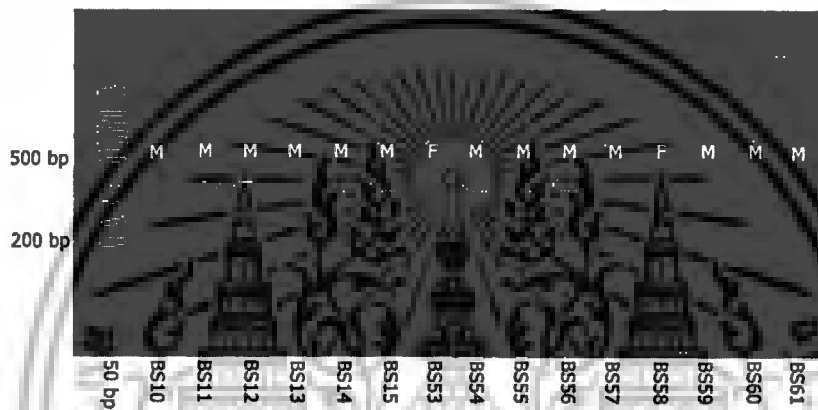


Figure 2. Sex identification in barn swallows (*Hirundorustica*) with P2/P8 primers for *CHD* gene. The PCR products were separated on 3% agarose gel. Female have two band (about 400 and 350bp) and males have one band (350bp) and marker DNA 50bp (lane1) M = male and F = female

Table 1. Expression of sexing identification of barn swallows

Sexing	Number of samples	Percentage(%)
Male	41	67.21
Female	17	27.87
No band	3	4.92

Sexing identification was attempted to distinguish in 61 samples of *H. rustica* using P2/P8 primers. The samples consisted of 41 males (67.21%) and 17 females (27.87%). However, three samples (4.92%) were failed to amplify or no band (Table 1). Other three samples were not identified because there were shown less concentration DNA. For the examples ratio of barn swallows in the period of January 2015 in Thailand, found that the ratios of male and

female were 2.41:1.00 which males were shown more than females. In a recent experimental study, many researchers reported that brood size enlargement had larger negative impact in male than female offspring when compared to brood reduction. Hence, male offspring appear to suffer more from chronic food intake reduction as similar reports from Kleven *et al.* (2006), Boncoraglio *et al.* (2008) and Vortman, *et al.* (2011).

Conclusion

Some bird species are dimorphic, which means there are visible differences in appearance between male and female birds plumage. In Thailand, the period of migration, barn swallows are hard to identify sex by using these external features. So, PCR technique by using *CHD* gene with P2/P8 primers can be used. For analysis, the PCR products were separated on 3% agarose gel. Female showed two bands clearly as 400 and 350 bp and males showed only 350 bp band. For 61 barn swallows in January 2015, the ratios of male and female were 2.41:1.00 which males had more than females. The results of molecular sexing would also have implications for understanding behavior, population structure, patterns of migration and estimating pollution risk.

Acknowledgement

This work was supported by a grant from Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang for fiscal year 2016. We gratefully acknowledge Bueng Boraphet Wildlife Research Station team, Wildlife Research Division, Wildlife Conservation Office, Department of National Parks, Wildlife and Plant Conservation, Bangkok, Thailand for sample collection and helpful general discussion. We thank anonymous reviewers for their helpful comments on the manuscript.

References

- Boncoraglio, G., Martinelli, R. and Saino, N. (2008). Sex-related asymmetry in competitive ability of sexually monomorphic barn swallow nestlings. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 62: 729-738.
- Brown, C.R. and Brown, M.B. (1999). Barn Swallow (*Hirundo rustica*). In *The Birds of North America*, No. 452 (A. Poole and F. Gill, eds.). The Birds of North America Online, Ithaca, New York.
- Cerit, H. and Avanus, K. (2007). Sex identification in avian species using DNA typing methods. *World Poultry Science Journal* 63:91-99.
- Cheng, Y.H., Kuo, T.F., Lee, D.N. and Weng, C.E. (2006) Sex identification of the black faced spoonbill (*Platalea minor*). *Zoological Studies*. 45(1):104-113.

- DuBiec, A. and Neubauer, M.Z. (2006). Molecular techniques for sex identification in bird. *Biological Letters*. 43:3-12.
- De Marchi, G., Fasola, M., Chiozzi, G., Bellati, A. and Galeotti, P. (2012). Sex discrimination of Crab Plovers (*Dromasardeola*) by morphometric traits. *Waterbirds* 35(2):332-337.
- Duijns, S., Dijk, J.G., Kraus, R.H., Mateman, C., Brink, B. and Hooft, P. (2011). An addition field method to sex adult Barn Swallows during the non-breeding season in Zambia: White spot length in the outer tail feather. *Ostrich* 82:129-133.
- Ellegren, H. (1996). First gene on the avian W chromosome (CHD) provides a tag for universal sexing of non-ratite birds. In: *Proceedings of the Royal Society of London Series B Biological Sciences* 263:1635-1641.
- Ellegren, H. and Sheldon, B. (1997). New tools for sex identification and the study of sex allocation in birds. *Trends in Ecology and Evolution* 12:255-259.
- Fridolfsson, A.K. and Ellegren, H. (1999). A Simple and universal method for molecular sexing of non ratite birds. *Journal of Avian Biology* 30:116-121.
- Griffiths, R. and Tiwari, B. (1995). Sex of the last wild Spix's macaw. *Nature* 375: 454.
- Griffiths, R. and Korn, R.M. (1997). A *CHD1* gene is Z chromosome linked in the chicken *Gallus domesticus*. *Gene* 197:225-229.
- Griffiths, R., Double, M.C., Orr, K. and Dawson, R.J. (1998). A DNA test to sex most birds. *Molecular Ecology* 7:1071-1075.
- Hermosell, I.G., Balbontin, J., Marzal, A., Reviriego, M. and de Lope, F. (2007). Sex determination in Barn Swallows *Hirundorustica* by means of discriminant analysis in two European populations. *Ardeola* 54: 93-100.
- Jensen, T., Pernaletti, 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.
- 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.
- Kleven, O., Jacobsen, F., Izadnegahdar, R., Robertson, R.J. and Lifjeld, J.T. (2006). Male tail streamer length predicts fertilization success in the North American barn swallow (*Hirundorustica erythrogaster*). *Behavioral Ecology and Sociobiology* 59:412-418.
- Kose, M., Mand, R. and Moller, A.P. (1999a). Sexual selection for white tail spots in the barn swallow in relation to habitat choice by feather lice. *Animal Behavior* 58:1201-1205.
- Kose, M. and Møller, A.P. (1999b). Sexual selection, feather breakage and parasites: the importance of white spots in the tail of the Barn Swallow (*Hirundorustica*). *Behavioral Ecology and Sociobiology*. 45:430-436.
- Møller, A.P., Magnhagen, C., Ulfstrand, A. and Ulfstrand, S. (1995). Phenotypic quality and moult in the Barn Swallow, *Hirundorustica*. *Behavioral Ecology* 6:242-249.
- Poeaim, S., Chobarporn, N., Eiamampai, K., Nimmuan, S. and Sornsua, T. (2014). Gender identification in some Plover using *CHD* gene. *International Journal of Arts and Sciences* 07(02):567-572.
- Sacchi, P., Soglia, D., Maione, S., Menequez, 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.
- Saino, N., Ellegren, H. and Moller, P. (1999). Offspring sexual dimorphism and sex-allocation in relation to parental age and paternal ornamentation in the barn swallow. *Molecular ecology* (8):399-406.
- Samuel, D.E. (1971). Field methods determining the sex of barn swallow (*Hirudorustica*). *The OHIO journal of science*. 71(2):125-128.

- Smith, H.G. and Montgomerie, R. (1991). Sexual selection and the tail ornaments of North-American barn swallows. *Behavioral Ecology Sociobiology* 28:195-201.
- Siripong, W., Poeam, S., Eiamampai, K. and Atittayawan, D. (2015). Gender identification of *Himantopus himantopus* using PCR-based method. *Journal of Agricultural Technology* 11(2): 307-314.
- Vortman, Y., Lotem, A., Dor, R., Lovette, I.J. and Safran, R.J. (2011). The sexual signals of the East-Mediterranean barn swallow: a different swallow tale. *Behavioral Ecology* 22(6): 1344-1352.
- 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. *Zoobiology* 26:425-431.
- Watson, H.K. Mogg, R.J. Bond, J.M. and Durell, S.A. (2004). Sexing Eurasian oystercatches *Haematopus ostralegus* from breast feathers collected when ringing. *Wader study group bulletin* 105:87-89.



Identification of the Subspecies and Gender of Barn Swallow (*Hirundo rustica*)

Thanyalak Malaitad¹, Pornchai Laipasu², Krairat Eiamampai³ and Supattra Poeaim^{1*}

¹ Department of Biology, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL), Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand

² Department of Statistics, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL), Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand

³ Wildlife Research Division, Wildlife Conservation Office, Department of National Parks, Wildlife and Plant Conservation, Chatuchak, Bangkok, 10900, Thailand.

Malaitad, T., Laipasu, P., Eiamampai, K. and Poeaim, S. (2016). Identification of the Subspecies and Gender of Barn Swallow (*Hirundo rustica*). International Journal of Agricultural Technology 12(7.1):1547-1554

The Barn swallow (*Hirundo rustica* Linnaeus) is one of the most abundant birds and widely distributed. They have long outer tail feathers and white spots across the outer end of the upper tail. They are weak evidence of sexually dimorphic meaning both sexes are identical. There are six currently recognized subspecies: *Hirundo rustica rustica*, *H. r. gutturalis*, *H. r. tylleri*, *H. r. transitiva*, *H. r. savignii* and *H. r. erythrogaster*. In Thailand, barn swallows are migratory birds that the appearance of both genders is similar and there is little information on there subspecies. Therefore, the objective of this study was to assess the gender and subspecies of barn swallows. Sixty samples were collected using mist net method from Nan province for gender identification. Based on *chromo-helicase- DNA-binding protein (CHD)* gene, the resulting PCR products from P2/P8 primers revealed one band in male and two bands in female birds with DNA fragments of different sizes clearly about 50 base pairs. The white spot length on the outermost tail feather was significantly related to genders: males (> 21.25 mm, n=25) and females (≤ 21.25 mm, n=28). However, seven samples were not identified (11.67%). For subspecies identification, we analysed 15 informative partial *Nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase subunit (ND2)* sequences compared with five subspecies sequences from GenBank. The sampling can be divided into at least three subspecies. Barn swallows which migrate to Thailand have genetic diversity.

Keywords: *Chromo-helicase DNA binding (CHD)*, Barn swallows, *Nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase subunit (ND2)*, Gender identification

*Coresponding Author: Supattra Poeaim; E-mail: poeaim@hotmail.com

Introduction

Barn swallows (*Hirundo rustica*) are small birds that are widely distributed swallow species in the world. These birds are divided into 6 subspecies corresponding to geography and differing only the coloration of the underparts. *Hirundo rustica rustica* which breeds in northern Eurasia, Africa and west Asia; *H. r. gutturalis* from southern and eastern Asian; *H. r. tyleri* from eastern Russia and may also reach Australia; *H. r. transitiva* from eastern of Mediterranean; *H. r. savignii* from the Egyptian delta region and *H. r. erythrogaster* from northern America, Alaska, Canada, and central Mexico (Turner and Rose, 1989; Zink *et al.*, 2006). In addition, the researcher commonly used molecular markers for assessing genetic diversity in Hirundinidae (Sheldon and Winkler, 1993; Sheldon *et al.*, 2005). Furthermore, using six regions of mitochondrial and nuclear DNA that can divide 6 subspecies of barn swallow into two groups: Asia-American and European-Middle Eastern (Dor *et al.*, 2010). However, barn swallows are migratory birds which migrate to Thailand in winter. At least three subspecies such as *H. r. tylerii*, *H. r. gutturalis* and *H. r. manchurica* were previously reported in Thailand but their distribution was not established.

Furthermore, barn swallows are sexually monomorphic, differences in the sexes are usually less distinct during migration. In many birds's species, a polymerase chain reaction (PCR) technique, targeting a chromo *helicase DNA binding protein (CHD)* gene, is used to determine gender (Griffiths *et al.*, 1998; Cerit and Avanus, 2006; Morinha *et al.*, 2012; Poaim *et al.*, 2014). Like the barn swallow, molecular sexing has been used to build discriminant functions to morphological data, population structure and behavior (Saino *et al.*, 2002; Boncoraglio *et al.*, 2008). In previous reports, the lengths of outermost tail feathers, the fork length and the white spot on the outermost tail feather are often used to distinguish between males and females in barn swallows (Samuel, 1971; Hermosell *et al.*, 2007; Duijns *et al.*, 2011). Therefore, the objectives of this study were to evaluate the subspecies of Barn swallow using *Nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase* subunit (*ND2*) gene sequence as well as to determine the correlation between the white spot size on the outermost tail feathers and gender.

Materials and methods

Sample collection and DNA extraction

Barn swallows were trapped by the mist nets method, when they migrate to Thailand (November-January). The barn swallows were captured and

identified to species based on morphological characters by the staff of the Wildlife Research Division, Department of National Parks, Wildlife and Plant Conservation, Thailand. For gender identification, the sixty samples were collected from Pua district, Nan province (NBS) in November 2015. After being trapped, the bird measurements were made such as: wing, bill, head, tail, weight, fat content as well as the length (mm), width (mm) and area (mm²) of white spots on outermost tail feather (Figure 1). Additionally, the blood or the feather was collected for DNA extraction. For subspecies evaluation, the eight blood samples were sampling from Nan province (NBS) and seven samples from Si Lom road, Bangkok (BS) in January 2016. DNA extraction was as described in Malaitad *et al.*, (2015).

Gender identification

For sexing, P2/P8 primers (Griffiths *et al.*, 1998) targeting the *CHD* gene were used in this study, PCR reactions and conditions were as reported by Malaitad *et al.*, (2015). To determine the correlation between the white spot size on the outermost tail feathers and gender, the data were analyzed by data mining approach. In this paper, we used RapidMiner Studio version 7.1 to predict correlation between gender and white spot size on outermost tail feather: length, width and area. A decision tree algorithm was used for data classification. First, decision tree model was created from the data, followed by testing the efficacy of the model, then the new data prediction. Finally, an automated decision tree approach to predicting white spot size was compare with molecular sexing.

Subspecies identification

The *ND2* region is located in mitochondrial DNA was amplified using METB and TRPC primers (Dor *et al.*, 2010). Amplification was performed in 25 µl total volume that contained 100 ng DNA template, 2.5 µl of 10X standard *Taq* reaction buffer, 0.2 µl of *Taq* DNA polymerase, 4 µl of 1.25 mM dNTPs, 2 µl of 50 mM MgCl₂, 1µl of 20 µM each primer and adjusted by 13.3 µl of nuclease free water. The PCR condition was an ininitial denaturing step at 95 °C for 4.5 min, 35 cycles of 95 °C for 1 min, 62 °C for 1 min, and 72 °C for 2 min, and final extension step at 72 °C for 4.5 min.

After that, PCR products were examined by agarose electrophoresis method on 1% agarose gel in 1X TBE buffer. PCR products were sequenced at Bioneer (Korea). Our sequences were compared for relationship with six subspecies of barn swallows which were taken from the GenBank DNA

database. The phylogenetic tree was constructed based on neighbor-joining (NJ) analysis using Phylip program version 3.6.

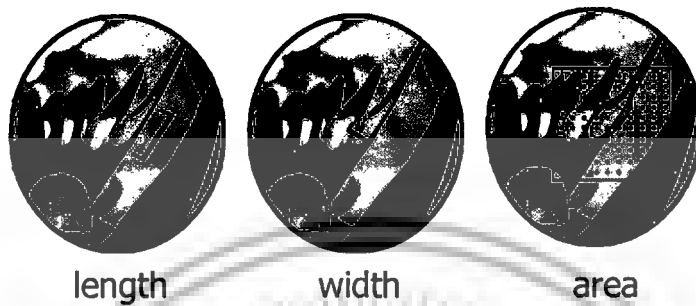


Figure 1 There are 3 scales of measurement, the length (mm), width (mm) and the area (mm²) of the white spot on the outermost tail feather

Results

Generally, sexes in barn swallows are similar in morphology with the exception of the length of the outermost tail feathers which are significantly longer than in males. Therefore, the researcher used this morphometric for sexing in the field. In Thailand, barn swallows are migratory birds which have breakage at the tips of the outer tail feather and tail moult, sexing becomes unreliable or even downright false. In this study, differences in the white spot size on the outermost tail feathers in Barn swallows were investigated using the length, width and the area for sexing. For molecular sexing, P2/P8 primers were used and determined with the white spot size on the outermost tail feathers, the data were presented with RapidMiner Studio version 7.1 (Figure 2).

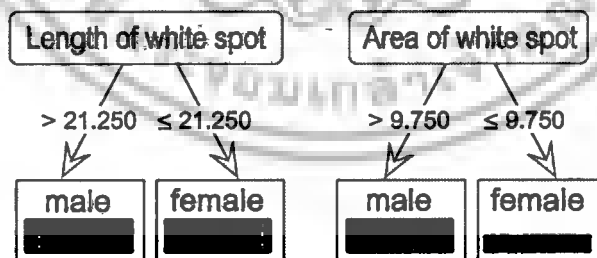


Figure2 The decision tree with Fisher's exact test showed white spot length and white spot area on the outermost tail feather for sexing identification (Blue color = female, Red color = male)

As results, P2/P8 primers were clearly differed between *CHD-Z* and *CHD-W* allele by agarose gel electrophoresis analysis. Sexing identification was attempted in 60 samples which consisted of 27 males and 33 females. Our data have the range of length, width and area of the white spot on the outermost tail feather are 10.50-35.00 mm, 2.50-7.00 mm and 4.50-21.00 mm², respectively. From the decision tree with Fisher's exact test, the length of the white spot on the outermost tail feather had positive correlation with gender. The white spot length less than or equal to 21.25 mm for female and greater than to 21.25 mm for male.

Discussion

Consistent with the previous report by Duijns *et al.*, (2010), this result showed the length of the white spot on the outermost tail feather is sexually dimorphic. The 101 adult barn swallows were caught during the non-breeding season in Zambia, the white spot length less than to 17.50 mm as a female and greater than to 29.50 mm as a male with 95% accurate. However, the rang between 17.50 to 29.50 mm was not reported. In this report, sex determination using the white spot length is 88.33% accurate. Only seven samples are error, it could be from juveniles birds. Because spot size increases with age with the total area of spots differing significantly between juveniles and adults, with the latter having larger spots than juveniles. The area of the white spot on the outermost tail feather was significantly related to the tail length of males, adult males had on average a total area larger than adult females (Kose and Müller, 1999). The area of the white spot on the outermost tail feather was weakly significantly correlated with male, but not in females. It was found from the decision tree that the white spot area less than or equal to 9.75 mm² as a female and greater than to 9.75 mm² as a male. However, sex determination using the white spot area is 70% accurate which eighteen samples are unreliable. Nevertheless, the females have the white spot area on the outermost tail feather smaller than the male. There was no significant correlation between the width of white spots of the outermost tail feather with gender since the RapidMiner can not make the decision tree.

For the subspecies and genetic diversity of barn swallows were evaluated using *ND2* sequences. The fifteen birds (eight samples from Nan province: NBS and seven samples from Bangkok: BS) were analyzed for the relationship with five subspecies (six of *Hirundo rustica rustica*: ru, only one *H. r. gutturali*: gu, four of *H. r. transitiva*: tr, two of *H. r. savignii*: sa and four of *H. r. erythrogaster*: er) in NCBI database. The phylogenetic tree was divided to two groups. Most of them in this study are in the same group which relate with *H. r.*

gutturalis with 93 bootstrap. However, only one sample (BS76) was related with *H. r. erythrogaster* with high bootstrap values (100%) as shown in the figure 3. The bootstrap values can be used for confidence levels for phylogenetic trees (Efron *et al.*, 1996). Moreover, fifteen Barn swallows are probably relative with *H. r. tylerii* toward having no sequence of *ND2* region in NCBI database. We also found *H. r. rustica*, *H. r. transitiva* and *H. r. savignii* in the same group as well as *H. r. erythrogaster* and *H. r. gutturalis* in the other group. The result was consistent with the result of Dor *et al.*, (2010) that divided genus *Hirundo* into Asia-American and European-Middle Eastern with *ND2* and *Cyt-b* sequence. Therefore, *Hirundo rustica* in Thailand may be in *H. r. erythrogaster*, *H. r. gutturalis* or *H. r. tylerii*. However, the diversity of *H. rustica* in Thailand could be study in another region in mitochondrial DNA such as *Cytochrome C oxidase subunit I (COI)* or *Cytochrome b (Cyt-b)* (Sheldon and Winkler, 1993; Hebert *et al.*, 2004; Sheldon *et al.*, 2005; Dor *et al.*, 2010) that will decrease our ability to determine the relationships among them.

Conclusion

The objectives of this study was to determine the correlation between the white spot size: the length, width and the area of the white spot on the outermost tail feather and gender. Sixty samples were collected from Nan province for analyzed. Our finding indicate that the length of the white spot on the outermost tail feather had positively correlation with gender. The white spot length less than or equal to 21.25 mm as a female and greater than to 21.25 mm as a male. Future research, this trait will be applying to sexing of barn swallows in the field. Forthemore, this study shown the diversity of *H. rustica* which may be in *H. r. erythrogaster*, *H. r. gutturalis* or *H. r. tylerii*.

- Efron, B., Halloran, E. and Holmes, S. (1996). Bootstrap confidence levels for phylogenetic trees. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 93: 7085-7090.
- Griffiths, R., Double, M.C., Orr, K. and Dawson, R.J. (1998). A DNA test to sex most birds. *Molecular Ecology* 7: 1071-1075.
- Hebert, P.D.N., Stoeckle, M.Y., Zemplak, T.S. and Francis, C.M. (2004). Identification of bird through DNA barcodes. *PLOS Biology* 2: 312.
- Hermosell, I.G., Balbontin, J., Marzal, A., Reviriego, M. and De Lope, F. (2007). Sex determination in barn swallows *hirundo rustica* by means of discriminant analysis in two European populations. *Ardeola* 54: 93-100.
- Kose, M. and Müller, A.P. (1999). Sexual selection, feather breakage and parasites: the importance of white spots in the tail of the barn swallow (*Hirundo rustica*). *Behavioral Ecology and Sociobiology* 45: 430-436.
- Malaitad, T., Poeam, S. and Eiamampai, K. (2015). Sex identification in barn swallows (*Hirundo rustica* Linnaeus) by molecular technique. *Journal of Agricultural Technology* 11(8): 2411-2418.
- 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.
- Poaim, S., Chobarporn, N., Eiamampai, K., Nimnuan, S. and Sornsa, T. (2014). Gender identification in some Plover using *CHD* gene *International Journal of Arts and Sciences*. 07(02): 567-572.
- Saino, N., Ambrosini, R., Martinelli, R., Calza, S., Møller, A.P. and Pilastro, A. (2002). Offspring sexual dimorphism and sex-allocation in relation to parental age and paternal ornamentation in the barn swallow. *Molecular Ecology* 11: 1533-1544.
- Samuel, D.E. (1971). Field methods for determining the sex of barn swallows (*Hirundo rustica*). *Ohio Journal of Science* 71: 125-128.
- Sheldon, F.H. and Winkler, D.W. (1993). Intergeneric phylogenetic relationships of swallows estimated by DNA-DNA hybridization. *Auk* 110:798-824.
- Sheldon, F.H., Whittingham, L.A., Moyle, R.G., Slikas, B. and Winkler D.W. (2005). Phylogeny of swallows (Aves: Hirundinidae) estimated from nuclear and mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 35: 254-270.
- Turner, A. and Rose, C. (1989). Swallows and martins. An identification guide and handbook. Boston, MA: Houghton Mifflin Co., Boston, MA.
- Zink, R.M., Pavlova, A., Rohwer, S. and Drovetski, S.V. (2006). Barn swallows before barns: population histories and intercontinental colonization. *Proceedings of the Royal Society B* 273: 1245-1251.