สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การระบุเพศและความหลากหลายทางพันธุกรรมในนกสกุล *Himantopus*

Sexing and genetic diversity in the genus *Himantopus*

ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม
นายไกรรัตน์ เอี่ยมอำไพ

b 12790849
i
เลขหมู่
เลขทะเบียน 143104
วันเดือน ปี 22 ก.ค. 2559

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ 2558
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงการวิจัย (ภาษาไทย) การระบุเพศและความหลากหลายทางพันธุกรรมในนก สกุล *Himantopus*

(ภาษาอังกฤษ) Sexing and genetic diversity in the genus *Himantopus*

แหล่งเงิน เงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ 2558 จำนวนเงิน 50,000 บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ 1 ตุลาคม 2557 - 30 กันยายน 2558

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

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

คำสำคัญ: การบ่งชี้เพศ; ยีน *chromo-helicase-DNA binding* (*CHD*); นกตีนเทียน

Keywords: gender identification, *chromo-helicase-DNA binding* (*CHD*) gene, *Himantopus himantopus*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทคัดย่อ

นกตีนเทียน (*Himantopus himantopus*) เป็นนกที่ไม่สามารถระบุเพศได้จากลักษณะภายนอก และมีความหลากหลายของสีขนบริเวณกระหม่อมและท้ายทอย งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อระบุเพศนก และศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกตีนเทียน ในการระบุเพศนใช้การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *chromo-helicase-DNA binding* (*CHD*) ด้วยไพรเมอร์ 2550F/2718R ตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ พบว่านกเพศผู้มีแถบดีเอ็นเอเพียง 1 แถบของอัลลีล *CHD-Z* และเพศเมียมีแถบดีเอ็นเอ 2 แถบ ที่มีชิ้นดีเอ็นเอขนาด 461 คู่เบส (*CHD-W*) และขนาด 620 คู่เบส (*CHD-Z*) ที่มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอแตกต่างกัน 159 คู่เบส จากการดักจับนกบริเวณเขตห้ามล่าสัตว์ป่าบึงบอระเพ็ด ทั้งฤดูทำรังวางไข่และฤดูอพยพ ได้นกตีนเทียน จำนวน 116 ตัวอย่าง พบว่าเป็นเพศผู้ 56 ตัวอย่าง เพศเมีย 59 ตัวอย่าง และระบุเพศไม่ได้จำนวน 1 ตัวอย่าง เนื่องจากไม่สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมได้ รวมทั้งไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างเพศกับลักษณะสีขนบริเวณกระหม่อมและท้ายทอยของนกทั้ง 6 ลักษณะ ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *cytochrome c oxidase I* (*COI*) พบว่าสามารถใช้ในการระบุสปีชีส์ของนกในสกุลตีนเทียนได้ โดยผลจากการระบุเพศและการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมมีความสำคัญต่อการบริหารจัดการและอนุรักษ์นก

คำสำคัญ: การบ่งชี้เพศ; ยีน *chromo-helicase-DNA binding* (*CHD*); นกตีนเทียน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ABSTRACT

Black-winged Stilts (*Himantopus himantopus*) are sexually monomorphic birds and vary considerably in pattern on their crown and hindneck. This research aimed to identify the gender and study genetic diversity of *H. himantopus*. For sex identification, *chromo-helicase DNA binding protein* (*CHD*) gene was amplified using 2550F/2718R primers. Only one PCR product from *CHD-Z* allele was obtained from male sample whereas two PCR products with a size of 461 base pair (bp) for *CHD-W* allele and 620 bp for *CHD-Z* allele were obtained from female sample that DNA fragments of different sizes about 159 bp. One hundred and sixteen Black-winged Stilts were trapped both breeding and migration season from Bueng Boraphet Non Hunting Area, 56 males and 59 females were determined. However, only one sample could not be amplified by PCR. Additionally, the gender were not related to the six crown and hindneck patterns. In genetic diversity, the nucleotide sequences of *cytochrome c oxidase I* (*COI*) gene were investigated and showed species differences between birds in genus *Himantopus*. The results of molecular sexing and genetic diversity will also have implications for birds management and conservation.

Keywords: gender identification, *chromo-helicase-DNA binding* (*CHD*) gene, *Himantopus himantopus*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่สนับสนุนทุนวิจัยในส่วนของเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ 2558 และภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่องมือต่างๆ ในการวิจัย

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

สุดท้ายนี้ผู้จัดทำขอขอบพระคุณบิดา มารดา และบุคคลในครอบครัวที่สนับสนุนและให้กำลังใจในการทำวิจัย นางสาววิภารัตน์ ศิริพงษ์และลูกศิษย์ทุกคนที่ร่วมในการวิจัย และทุกท่านที่มีส่วนเกี่ยวข้อง รวมทั้งนกทุกตัวทำให้งานวิจัยนี้เสร็จสมบูรณ์ จึงขอขอบคุณมา ณ ที่นี้

สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

		หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย		II
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ		III
กิตติกรรมประกาศ		IV
สารบัญ		V
สารบัญตาราง		VIII
สารบัญรูป		IX
บทที่ 1	**บทนำ**	1
	1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของการวิจัย	1
	1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	3
	1.3 ขอบเขตการวิจัย	3
	1.4 ทฤษฎีและกรอบแนวคิดของการวิจัย	3
	1.5 คำสำคัญของการวิจัย	3
	1.6 ประโยชน์ที่คาดจะได้รับ	3
บทที่ 2	**ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง**	4
	2.1 สกุลนกตีนเทียน	4
	2.2 การศึกษาความหลากหลายในระดับโมเลกุล	6
	2.3 การระบุเพศนก	8
	2.4 การเก็บตัวอย่าง	11
บทที่ 3	**วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง**	13
	3.1 การเก็บตัวอย่าง	13
	3.2 อุปกรณ์ และเครื่องมือ	13
	3.3 สารเคมี	14
	3.4 วิธีการทดลอง	16
	3.4.1 การทำให้ดีเอ็นเอในกระดาษ FTA บริสุทธิ์	16
	3.4.2 การสกัดดีเอ็นเอจากเลือด	16

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.4.3 การสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อบริเวณปลอกขน	17
3.4.4 การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอ	18
3.4.5 การระบุเพศนกด้วยเทคนิคระดับโมเลกุล	18
3.4.6 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน *cytochrome c oxidase I* (*COI*)	19
3.4.7 การทำให้ผลผลิตพีซีอาร์บริสุทธิ์	20
3.4.8 การศึกษาหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากลำดับนิวคลีโอไทด์	20
บทที่ 4 ผล และอภิปรายผลการทดลอง	22
4.1 การเก็บตัวอย่างนกตีนเทียน	22
4.2 การระบุเพศนกตีนเทียน	27
4.2.1 ไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการระบุเพศนกตีนเทียน	27
4.2.2 ผลการระบุเพศนก	30
4.2.3 ผลการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณอัลลีล *CHD-Z*	33
4.3 ผลการระบุสปีชีส์นกตีนเทียนด้วยยีน *COI*	37
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	40
บรรณานุกรม	41
ผลงานตีพิมพ์จากงานวิจัย	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
4.1	แสดงลักษณะนกตีนเทียน (A) การอยู่รวมกันเป็นฝูงช่วงฤดูอพยพ (B) การพบนกตามพื้นที่ชุ่มน้ำช่วงฤดูทำรังวางไข่ (C) ลักษณะนกตีนเทียน *H. himantopus* (D) ลักษณะของสีบริเวณกระหม่อมและท้ายทอย	23
4.2	แสดงวิธีและขั้นตอนการดักจับนกตีนเทียน (A) การติดตั้งตาข่ายดักจับนกด้วยวิธีท่อส่งตาข่าย (cannon net) ในช่วงฤดูอพยพ (B) การเก็บตัวอย่างหลังการยิงท่อส่งตาข่าย (C) การวางอุปกรณ์ดักจับด้วยวิธี spring trap บริเวณรังของนกในช่วงฤดูทำรังวางไข่ (D) ตำแหน่งของเชือกที่ติดอยู่ตรงกลางของครึ่งวงกลมและวางพาดกึ่งกลางของรัง	24
4.3	แสดงขั้นตอนการเก็บตัวอย่างเพื่อใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ (A) การใช้เข็มเจาะเส้นเลือดบริเวณหน้าแข้ง (B) การเก็บตัวอย่างเลือดด้วย haematocrit tube (C) การใช้กระดาษ FTA ซับหรือป้ายที่หยดเลือดบริเวณนิ้วเท้า (D) การเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อบริเวณปลอกขน	25
4.4	แสดงลักษณะสีขนบริเวณกระหม่อม และท้ายทอยของนกตีนเทียน ซึ่งแบ่งออกเป็น 6 ลักษณะ คือ (A) กระหม่อมและท้ายทอยสีขาว (B) กระหม่อมและท้ายทอยสีขาวปลายขนสีดำ (C) กระหม่อมสีขาวและท้ายทอยสีดำอ่อน (D) กระหม่อมสีขาวและท้ายทอยสีดำเข้ม (E) กระหม่อมและท้ายทอยสีเทา (F) กระหม่อมและท้ายทอยสีเทาบริเวณขอบตาสีเทาเข้ม	26
4.5	แสดงผลการวิเคราะห์ผลผลิตพีซีอาร์ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (เจลอะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์) จากการระบุเพศนกตีนเทียนด้วยไพรเมอร์ 3 คู่ ได้แก่ไพรเมอร์ P2/P8 (ช่อง 2-3) 1237L/1272H (ช่อง 4-5) และไพรเมอร์ 2550F/2718R (ช่อง 6-7) เปรียบเทียบกับ marker DNA ขนาด 50 คู่เบส (ช่อง 1)	28
4.6	แสดงตำแหน่งจับของไพรเมอร์ 2550F/2718R บนอัลลีล *CHD-Z* ของนกตีนเทียน	31
4.7	แสดงตำแหน่งจับของไพรเมอร์ 2550F/2718R บนอัลลีล *CHD-W* ของนกตีนเทียน	32
4.8	แสดง phylogenetic tree จากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *COI* ของนกในสกุลตีนเทียน โดยใช้พารามิเตอร์แบบ neighbor-joining และโมเดลของ Kimura 2-parameter โดยให้มีค่า bootstaping เท่ากับ 1000	39

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
3.1	แสดงชนิดไพรเมอร์ ลำดับนิวคลีโอไทด์ ตำแหน่ง และเอกสารอ้างอิงของไพรเมอร์	15
4.1	แสดงผลการระบุเพศนกตีนเทียนในช่วงฤดูอพยพ ในเดือนธันวาคม ปีพุทธศักราช 2557 โดยแยกตัวอย่างนกตีนเทียนออกเป็น 6 ลักษณะ ตามลักษณะสีขนบริเวณกระหม่อมและท้ายทอย	34
4.2	แสดงผลการระบุเพศนกตีนเทียนในช่วงฤดูอพยพ ในเดือนเมษายน ปีพุทธศักราช 2558 โดยแยกตัวอย่างนกตีนเทียนออกเป็น 3 ลักษณะ ตามลักษณะสีขนบริเวณกระหม่อมและท้ายทอย	36
4.3	แสดงผลการระบุเพศนกตีนเทียนในช่วงฤดูทำรังวางไข่ และฤดูอพยพ ในปีพุทธศักราช 2556-2558 โดยแยกตัวอย่างนกตีนเทียนออกเป็น 6 ลักษณะ ตามลักษณะสีขนบริเวณกระหม่อมและท้ายทอย	36
4.4	แสดงสปีชีส์ accession number ค่า identity และสถานที่ที่เก็บตัวอย่างของนกตีนเทียนพบในฐานข้อมูล GenBank ใน NCBI	38

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของการวิจัย

นกอพยพ คือนกที่อพยพย้ายถิ่น เพื่อแสวงหาพื้นที่ที่มีสภาพแวดล้อมเหมาะสมต่อการดำรงชีวิตในแต่ละฤดูกาล ทั้งแหล่งอาหารที่มีความสมบูรณ์ พื้นที่เหมาะสมในการสร้างรังวางไข่ และเลี้ยงดูลูกอ่อน ซึ่งเป็นวัฏจักรเช่นเดียวกันทุกปี โดยมากนกอพยพที่ย้ายถิ่นมาอาศัยในประเทศไทยจะอยู่ในช่วงนอกฤดูผสมพันธุ์ ช่วงตั้งแต่เดือนกันยายนถึงกุมภาพันธ์ และอพยพกลับในเดือนมีนาคมถึงเดือนเมษายน เส้นทางการอพยพของนกในประเทศไทย ตั้งอยู่ในเส้นทางการบินอพยพเอเชียตะวันออก-ออสเตรเลีย (East Asian-Australasian Flyway: EAAF) เป็นไปในทางเดียวกับการอพยพของนกในทวีปเอเชีย โดยมีนกหลายแสนตัวอพยพข้ามมหาสมุทร และแผ่นดินใหญ่เป็นระยะทางไกลเข้ามาอาศัยในประเทศไทย ซึ่งมีพื้นที่ชุ่มน้ำที่อุดมสมบูรณ์ และพื้นที่ป่าอนุรักษ์ที่มีความปลอดภัยสำหรับนกอพยพ ดังนั้นนกจึงเปรียบเสมือนดัชนีบ่งชี้คุณภาพ และความสมบูรณ์ของทรัพยากรชีวภาพ ชนิดนกอพยพที่เข้ามาในประเทศไทย สามารถแบ่งออกได้หลายกลุ่ม ได้แก่ นกเป็ดน้ำ (Waterfowl bird) นกบก (Terrestrial bird) นกล่าเหยื่อ (Raptor หรือ Bird of prey) นกทะเล (Sea Bird) นกน้ำ (Water bird) และนกชายเลน (Shorebird) ซึ่งเป็นนกที่อาศัยอยู่ตามชายเลนหรือชายน้ำ ช่วงฤดูหนาวเป็นช่วงที่นกชายเลนอพยพเข้ามาในประเทศไทยปริมาณมากที่สุด รวมกับนกชายเลนบางกลุ่มที่แวะพักก่อนการเดินทางต่อไปทางตอนใต้ โดยเฉพาะพื้นที่ชายฝั่งทะเล บริเวณนาเกลือ บ่อกุ้ง บ่อเลี้ยงสัตว์น้ำ และบริเวณพื้นที่ชุ่มน้ำของประเทศ (wetland) โดยเฉพาะพื้นที่ชุ่มน้ำบึงบอระเพ็ด (bung boraphet wetland)

นกชายเลนในอันดับ Charadriiformes เป็นนกที่มีความน่าสนใจ เนื่องจากนกในอันดับนี้มีความแตกต่างกันสูงทั้งลักษณะภายนอก การสืบพันธุ์ รวมทั้งแหล่งที่อยู่อาศัย โดยเฉพาะวงศ์นกหัวโต (Family Charadriidae) ที่มีขนาดตั้งแต่ขนาดเล็กจนถึงขนาดกลาง มีทั้งนกชายน้ำ และนกชายทะเล รูปร่างค่อนข้างแตกต่างกันไป จะงอยปากอาจจะยาว ตรง โค้ง แอ่น หรือสั้น ปลายจะงอยปากแหลม หากแบ่งนกในวงศ์นี้ออกเป็น 2 วงศ์ย่อย (Subfamily) ประเทศไทยพบทั้ง 2 วงศ์ย่อย คือ 1) วงศ์ย่อยนกหัวโต (Subfamily Charadriinae: Plovers และ Lapwings) และ 2) วงศ์ย่อยนกตีนเทียน (Subfamily Recurvirostrinae: Stilts และ Avocets) โดยวงศ์ย่อยนกตีนเทียนสามารถแบ่งออกเป็น 2 เหล่า คือ Tribe Haematopodini และ Tribe Recurvirostrini ประเทศไทยพบเพียงเหล่านกตีนเทียน (Recurvirostrini) และเพียง 2 สกุล คือ สกุลนกตีนเทียน (*Himantopus*) และสกุลนกปากงอน (*Recurvirostra*)

สำหรับสกุลนกตีนเทียน (*Himantopus*) ในประเทศไทยมีรายงานเพียงสปีชีส์เดียว คือนกตีนเทียน ชื่อสามัญว่า Black-winged Stilt มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Himantopus himantopus*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(Linnaeus, 1758) นกตีนเทียนมีสถานะเป็นทั้งนกประจำถิ่นและนกอพยพ พบไม่บ่อยและปริมาณน้อย (โอภาส, 2541) พบมาทำรังในบึงบอระเพ็ดครั้งแรกเมื่อปี 2535 และพบมีการทำรังเรื่อยมาจนถึงปัจจุบัน (ไกรรัตน์, 2545) นกตีนเทียนจัดเป็นสัตว์ป่าคุ้มครองของประเทศไทย เป็นนกที่มีขนาดเล็กถึงกลาง มีปากสีดำที่ยาวและเรียวแหลม คอยาวปานกลาง ปีกยาวแหลมสีดำ ขายาวสีแดงหรือชมพูเรื่อ ลำตัวส่วนล่างเป็นสีขาว สะโพกและขนคลุมโคนหางสีขาว (โดม, 2552) ตัวผู้บางตัวอาจมีสีดำบริเวณกระหม่อมและท้ายทอยรูปแบบแตกต่างกัน ขณะที่ตัวเมียกระหม่อมและท้ายทอยอาจมีแถบสีเทา อย่างไรก็ตามจากการสังเกตของผู้สนใจเรื่องนก พบว่านกตีนเทียนมีความผันแปรของสีและตำแหน่งของสีบนหัวและคอ ซึ่งยังไม่มีการศึกษาและรายงานในประเทศไทย แต่นกในสกุลนี้มักมีชื่อทั่วไปตามลักษณะสีและตำแหน่งของสีบนกระหม่อมและคอ (Brumfield, 2010) เช่น *Himantopus leucocephalus* หรือ White-headed Stilt/ Pied Stilt ซึ่งเป็นนกประจำถิ่นในออสเตรเลีย แต่สามารถพบได้บนเกาะชวา และฟิลิปปินส์ด้วย ซึ่งการระบุสายพันธุ์และศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกตีนเทียนที่อพยพและที่เป็นนกประจำถิ่นในประเทศไทย จะเป็นประโยชน์ทางด้านฐานข้อมูลทางพันธุกรรม การสำรวจประชากรนกอพยพที่เข้ามาตามแหล่งพื้นที่ต่างๆทั่วประเทศ เพื่อเป็นดัชนีชี้วัดความหลากหลายของนกอพยพ ความอุดมสมบูรณ์ของพื้นที่บริเวณต่างๆที่นกอพยพเข้ามาอาศัย เป็นประโยชน์ในการวางแนวทางการควบคุม ดูแล และลดการคุกคามต่อนก

ถึงแม้จะมีการกล่าวว่านกตีนเทียนสามารถระบุเพศจากลักษณะภายนอกได้ แต่จากการสำรวจลักษณะหัวและท้ายทอยของนกตีนเทียนบริเวณบึงบอระเพ็ด จังหวัดนครสวรรค์ ในช่วงฤดูทำรังวางไข่พบว่าส่วนใหญ่มีสีขาว ทำให้ตั้งข้อสันนิษฐานว่าลักษณะสีบริเวณหัวและท้ายทอยไม่สามารถระบุเพศนกตีนเทียนได้อย่างชัดเจน รวมทั้งนกตีนเทียนที่อพยพมาประเทศไทยนั้นเป็นช่วงนอกฤดูผสมพันธุ์ ซึ่งช่วงเวลานี้มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่เหมือนกัน กล่าวคือเพศผู้และเพศเมียมีลักษณะทางภายนอกที่เหมือนกัน (sexually monomorphic) ซึ่งยากต่อการจัดจำแนกเพศ เพื่อใช้ในการสำรวจประชากรนกที่อพยพเข้ามาจึงจำเป็นต้องอาศัยเทคนิคทางโมเลกุลช่วยเพื่อการระบุเพศนก ซึ่งเทคนิคทางโมเลกุลที่นิยมนำมาใช้ในการระบุเพศนกนั้นเกิดขึ้นหลังการค้นพบยีน *chromo-helicase-DNA binding* (*CHD*) บนโครโมโซม W (Griffiths และ Tiwari, 1995) และโครโมโซม Z (Griffiths และ Korn, 1997) เนื่องจากนกมีลักษณะของโครโมโซมเพศแตกต่างจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โดยนกเพศเมียมีโครโมโซมเพศที่แตกต่างกัน (heterogametic sex: ZW) ในขณะที่นกเพศผู้มีโครโมโซมเพศที่เหมือนกัน (homogametic sex: ZZ) ร่วมกับหลักการที่มีความแตกต่างของความยาวบริเวณ intron ของยีน *CHD* ระหว่างโครโมโซม Z (*CHD*-Z) กับโครโมโซม W (*CHD*-W) (Griffiths และ Tiwari, 1995; Ellegren, 1996; Griffiths และ Korn, 1997) จึงนำมาใช้ในการระบุเพศนกได้เป็นอย่างดี ยกเว้นนกที่บินไม่ได้ ซึ่งการระบุเพศนกด้วยเทคนิคทางโมเลกุล เป็นวิธีที่มีความรวดเร็วถูกต้อง แม่นยำ และเป็นประโยชน์ต่อการอนุรักษ์ และศึกษาอัตราส่วนระหว่างเพศเพื่อเป็นแนวทางในการประเมินประชากรของนก ซึ่งจะเป็นข้อมูลและประโยชน์ในการวางแผนและอนุรักษ์สายพันธุ์นกตีนเทียนในประเทศไทยต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 บ่งชี้เพศนกสกุลนกตีนเทียนในระดับโมเลกุล

1.2.2 ศึกษาสายพันธุ์ของนกตีนเทียนในระดับโมเลกุลด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

1.2.3 ศึกษาเปรียบเทียบสายพันธุ์ และความหลากหลายของนกสกุลนกตีนเทียนทั้งที่อพยพมาและประจำถิ่นในประเทศไทย

1.3 ขอบเขตการวิจัย

โครงงานนี้ดำเนินการขึ้นเพื่อบ่งชี้เพศ ศึกษาสายพันธุ์ และความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกสกุลนกตีนเทียน ทั้งที่อพยพมาและทำรังวางไข่ในประเทศไทย เก็บตัวอย่างอยู่ภายใต้การทำงานของผู้เชี่ยวชาญและเจ้าหน้าที่ในโครงการการศึกษาเส้นทางอพยพของนกโดยการติดเครื่องหมายติดตามตัวสัตว์และเฝ้าระวังโรคอุบัติใหม่ โดยสถานีวิจัยสัตว์ป่าบึงบอระเพ็ด กลุ่มงานวิจัยสัตว์ป่า สำนักอนุรักษ์สัตว์ป่า กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพันธุ์พืช โดยทำการเก็บตัวอย่างในบริเวณเขตห้ามล่าสัตว์ป่าบึงบอระเพ็ด จังหวัดนครสวรรค์

1.4 ทฤษฎีและกรอบแนวคิดของการวิจัย

การศึกษาและจัดจำแนกความหลากหลายทางพันธุกรรม นิยมศึกษาทั้งจากรูปร่างลักษณะทางสัณฐานวิทยาและข้อมูลระดับโมเลกุลของสิ่งมีชีวิต การศึกษาความหลากหลายในระดับโมเลกุลครั้งนี้จะเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *chromo-helicase-DNA binding* (*CHD*) ที่มีตำแหน่งอยู่บนดีเอ็นเอในนิวเคลียส รวมทั้งนกสกุลตีนเทียนที่อพยพมาประเทศไทยนั้นอยู่ในช่วงนอกฤดูผสมพันธุ์ โดยช่วงเวลาดังกล่าวทั้งเพศผู้และเมียมีลักษณะภายนอกที่เหมือนกัน (sexually monomorphic) ซึ่งยากต่อการบ่งชี้เพศ จึงจำเป็นต้องอาศัยเทคนิคระดับโมเลกุลเพื่อการบ่งชี้เพศนก โดยนกเพศเมียมีโครโมโซมเพศที่แตกต่างกัน (heterogametic sex: ZW) ในขณะที่นกเพศผู้มีโครโมโซมเพศที่เหมือนกัน (homogametic sex: ZZ) ร่วมกับหลักการที่มีความแตกต่างของความยาวบริเวณอินทรอน (intron) ของยีน *CHD* จึงนำความแตกต่างนี้มาใช้ในการบ่งชี้เพศนก

1.5 คำสำคัญของการวิจัย

การบ่งชี้เพศ (gender identification) ยีน *chromo-helicase-DNA binding* (*CHD*) (*chromo-helicase-DNA binding* (*CHD*) gene) นกตีนเทียน (*Himantopus himantopus*)

1.6 ประโยชน์ที่คาดจะได้รับ

หากงานวิจัยนี้ประสบผลสำเร็จจะสามารถบ่งชี้เพศนกตีนเทียน และความหลากหลายทางพันธุกรรมของกลุ่มตัวอย่างทั้งช่วงฤดูอพยพและทำรังวางไข่ เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการศึกษาด้านประชากรของนก รวมทั้งพฤติกรรมการอพยพและย้ายถิ่นต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 สกุลนกตีนเทียน

นกในวงศ์นกหัวโต (Family Charadriidae) แบ่งออกเป็น 2 วงศ์ย่อย ประเทศไทยพบทั้ง 2 วงศ์ย่อย คือวงศ์ย่อยนกตีนเทียน (Subfamily Recurvirostrinae) และวงศ์ย่อยนกหัวโต (Subfamily Charadriinae) สำหรับวงศ์ย่อยนกตีนเทียน (Subfamily Recurvirostrinae: Stilts และ Avocets) นกในวงศ์ย่อยนี้มีขนาดเล็กจนถึงขนาดกลาง (31 - 42 เซนติเมตร) ปากยาว ตรง หรือแอ่นขึ้นเล็กน้อย ขนกลางปีกเส้นนอกสุดยาวที่สุด ปลายหางตัด มีขนหาง 12 - 14 เส้น เกล็ดเป็นแบบเกล็ดร่างแห นิ้วอาจมีพังผืดนิ้วเชื่อมที่โคนนิ้ว เป็นนกชายน้ำจืดหรือชายทะเล สามารถว่ายและดำน้ำได้ อาหารส่วนใหญ่ ได้แก่ แมลงและสัตว์น้ำบางชนิด ทำรังตามพื้นดิน วางไข่ครอกละ 3 - 4 ฟอง ไข่สีเนื้อ มีลายจุดหรือลายแต้มสีดำ นกตัวเมีย 2 ตัว อาจวางไข่ในรังเดียวกัน ทั่วโลกแบ่งออกเป็น 2 เหล่า (Tribe) ประเทศไทยพบ 1 เหล่าคือ เหล่านกตีนเทียน (Tribe Recurvirostrini) ลักษณะของเหล่าไม่แตกต่างจากลักษณะของวงศ์ย่อย ทั่วโลกมี 11 ชนิดใน 4 สกุล ประเทศไทยพบนกในเหล่านี้ 2 สกุล คือ สกุลนกตีนเทียน (Genus *Himantopus*) และสกุลนกปากงอน (Genus *Recurvirostra*)

นกที่สนใจในการศึกษาครั้งนี้เป็นนกสกุลนกตีนเทียน (*Himantopus* sp.) ในประเทศไทยมีรายงานเพียงสปีชีส์เดียว คือนกตีนเทียน ชื่อสามัญ Black-winged Stilt ชื่อวิทยาศาสตร์ *Himantopus himantopus* (Linnaeus, 1758) นกตีนเทียนเป็นทั้งนกประจำถิ่นและนกอพยพ พบไม่บ่อยและปริมาณน้อย (โอภาส, 2541) มีลักษณะขาเรียวสีแดงอมชมพู ปากเล็กแหลมเรียวยาวสีดำ หัว คอ ตะโพก หาง และลำตัวด้านล่างสีขาว ตัดกับหลังและปีกสีดำ ขณะบินจะเหยียดขายาวพ้นหางออกไปมาก พฤติกรรมมักพบเดินหากินเป็นฝูงไปตามพื้นที่มีน้ำแฉะหรือท่วมขัง พร้อมกับใช้ปากยาวจิกอาหารตามผิวน้ำ บนเลน และใต้เลน ปัจจุบันในบึงบอระเพ็ดสามารถพบได้บ่อยและปริมาณมาก พบนกตีนเทียนทำรังในบึงบอระเพ็ดครั้งแรกเมื่อปี 2535 และพบมีการทำรังเรื่อยมาจนถึงปัจจุบัน (ไกรรัตน์, 2545) สำหรับนกประจำถิ่นจะทำรังบนพื้นดินใกล้แหล่งน้ำ โดยการขุดให้เป็นหลุมเล็กๆ รองด้วยใบหญ้าแห้ง รากบัวแห้ง แต่ไม่มากนัก หรือทำรังเป็นรูปถ้วย โดยนำพืชน้ำมาวางซ้อนทับกันเป็นถ้วยบนพืชลอยน้ำ หรือพืชโผล่พ้นน้ำ หรือชากพืชน้ำที่ลอยอยู่แผ่นผิวน้ำ ในปี 2548 พบรังทั้งหมด 680 รัง ในบริเวณชายฝั่งและทุ่งหญ้า 280 รัง บริเวณเกาะ 343 รัง บริเวณพืชโผล่พ้นน้ำ 21 รัง บริเวณพื้นน้ำโล่ง 35 รัง และบริเวณพืชลอยน้ำ 1 รัง (ไกรรัตน์, 2549)

อ้างอิงจากหนังสือ Systematics and taxonomy of Australian birds (Christidis และ Boles, 2008) ที่กล่าวว่า Peter (1934) ระบุว่ามีนกในสกุล *Himantopus* เพียงสปีชีส์เดียว และ Mayr และ Short (1970) จำแนกออกเป็น 8 สปีชีส์ แต่ส่วนใหญ่จำแนกออกเป็นเพียง 2 สปีชีส์ คือ *H. himantopus* (Black-winged Stilt) ที่พบในแอฟริกา ยุโรป เอเชีย ออสเตรเลีย และ *H.*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

novaezelandiae (Black Stilt) ในนิวซีแลนด์ แต่อย่างไรก็ตามนักปักษีวิทยายอมรับว่าเป็นชนิดใหม่ คือ White-headed Stilt (*H. leucocephalus*) หรือ Australian Stilt เพราะเป็นนกประจำถิ่นในออสเตรเลีย แต่สามารถพบได้บนเกาะชวา เกาะบอร์เนียว และฟิลิปปินส์ด้วย ลักษณะเด่นของ *H. leucocephalus* ที่แตกต่างจาก *H. himantopus* ตามที่คู่มือ Waterbirds of Asia คือบริเวณท้ายทอยมีแผงคอสีดำชัดเจน และปากจะแอ่นขึ้นเล็กน้อย และ Marchant และ Higgins, 1993; Pierce 1996; Dickinson, 2003 แบ่ง *H. himantopus* เป็น 5 subspecies คือ 1. *himantopus* พบในแอฟริกา ยุโรป เอเชีย 2. *leucocephalus* พบได้ตั้งแต่ Java ถึง Australasia และ 3. *knudseni* พบที่ Hawaii 4. *mexicanus* พบบริเวณทวีปอเมริกาเหนือ และกลาง และ 5. *melanurus* พบในทวีปอเมริกาใต้ แต่อย่างไรก็ตามนิยมแบ่งเพียง 3 สปีชีส์ คือ *H. himantopus* (Black-winged Stilt), *H. mexicanus* (Black-necked stilt) และ *H. leucocephalus* (White-headed Stilt) (AOU, 1998) โดย Rasmussen และ Anderton (2005) ได้แสดงให้เห็นถึงข้อแตกต่างทางลักษณะทางสัญฐานที่จะแยก *H. leucocephalus* ออกจาก *H. himantopus*

การศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของนกแต่เดิมการศึกษาและจัดจำแนกความหลากหลายทางชีวภาพเพื่อจัดกลุ่มสิ่งมีชีวิตเป็นหมวดหมู่ จะอาศัยการพิจารณารูปร่างลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphological analysis) เพียงอย่างเดียว แต่ปัจจุบันมีการอาศัยข้อมูลในระดับโมเลกุลมาช่วยเพื่อให้เกิดความถูกต้องมากขึ้น ซึ่งรายงานการศึกษาความหลากหลายในระดับโมเลกุลของนกชายเลนและในสกุลนกตีนเทียนมีน้อยมาก และมุ่งเน้นในการศึกษานกประจำถิ่นในนิวซีแลนด์ คือ *H. novaezelandiae* (Black Stilt) เนื่องจากพบจำนวนน้อยและใกล้สูญพันธุ์ จึงมีการดำเนินการในการเพาะเลี้ยงในสภาพกรง (Millar และคณะ, 1997; Wallis, 1999) นอกจากนั้นแล้วยังพบว่ามีการผสมพันธุ์กันได้ระหว่าง *H. novaezelandiae* (Black Stilt) ที่มีลักษณะแตกต่างที่เด่นชัดมากจากนกตีนเทียนชนิดอื่น ๆ เพราะมีขนสีดำทั้งหมด ขาสีแดงยาว และมีปากสีดำ และ *H. leucocephalus* (White-headed Stilt) ที่มีหัว แก้ม และหน้าผากสีขาว แต่ตั้งแต่ท้ายทอยเรื่อยลงมาถึงลำตัวช่วงบนเป็นสีดำ แต่มีแถบสีขาวตัดลำตัวเป็นแนวขวาง ลำตัวช่วงล่างสีขาว เกิดลูกผสมที่มีลักษณะของสีขนแตกต่างกัน โดยเฉพาะตัวไม่เต็มวัย (Elkington และ Maloney, 2000) และเกิดความสับสนกับ *H. mexicanus* (Black-necked Stilt) ที่นกตัวเต็มวัยมีขนคลุมปีกสีดำ ตั้งแต่หน้าผาก กระหม่อม และท้ายทอยเรื่อยลงมาถึงลำตัวช่วงบนเป็นสีดำสนิท แต่มีแต้มจุดสีขาวได้ และเช่นเดียวกันในการศึกษาในระดับโมเลกุลมุ่งเน้นในการศึกษา *H. novaezelandiae* (Black Slilt) และลูกผสม เช่น ศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค microsatellite (Steeves และคณะ, 2008; Steeves และคณะ, 2010; Brumfield, 2010; Hagen และคณะ, 2011)

นกในสกุลตีนเทียน (genus *Himantopus*) อยู่ในวงศ์ Recurvirostridae เป็นนกที่สามารถพบได้ทั่วโลก โดยลักษณะของนกในสกุลนี้ คือ มีปากยาวตรง และเรียว ปีกยาว ปลายปีกแหลม ขนปลายปีกเส้นนอกสุดยาวที่สุด หางสั้น ขนหางทุกเส้นยาวเท่ากัน และขายาว (โอภาส, 2543) ทั้งนี้จากการค้นคว้าข้อมูลพบว่ายังมีความสับสนในการจัดจำแนกสปีชีส์ของนกในสกุลนี้ โดยจากการจำแนกของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

International Ornithological Committee World Bird List version 5.1 (2015) จัดจำแนกนกในสกุลตีนเทียนเป็น 5 สปีชีส์ ตามถิ่นที่อยู่อาศัยของนกแต่ละสปีชีส์ คือ *H. himantopus* (Black-winged Stilt) อาศัยอยู่บริเวณทวีปยุโรป เอเชีย และแอฟริกา *H. leucocephalus* (White-headed Stilt) อาศัยอยู่บริเวณประเทศออสเตรเลีย นิวซีแลนด์ และหมู่เกาะใกล้เคียงในมหาสมุทรแปซิฟิก *H. novaezelandiae* (Black Stilt) พบอยู่ที่ประเทศนิวซีแลนด์เท่านั้น *H. melanurus* (White-backed Stilt) อาศัยอยู่ในทวีปอเมริกาใต้ และ *H. mexicanus* (Black-necked Stilt) พบอยู่ทางตอนใต้ของทวีปอเมริกาเหนือ รวมถึงตอนกลางและตอนใต้ของทวีปอเมริกาใต้ แต่อย่างไรก็ตาม BirdLife International (2015) และ The International Union for Conservation of Nature (IUCN) Red List of Threatened (2014) แบ่งนกในสกุลตีนเทียนออกเป็น 2 สปีชีส์ คือ (1) Black-winged Stilt (*Himantopus himantopus*) และ (2) Black Stilt (*Himantopus novaezelandiae*) โดยสปีชีส์ *H. himantopus*, *H. leucocephalus*, *H. mexicanus* รวมทั้ง *H. melanurus* จะจัดอยู่ในสปีชีส์เดียวกัน ซึ่งสอดคล้องกับการประชุมครั้งที่ 11 ของ Convention on Migratory Species (CMS) ในปี 2014 ที่มีการย้าย *H. leucocephalus* และ *H. mexicanus* รวมเป็น *H. himantopus* เพียงสปีชีส์เดียว ซึ่งการแบ่งสปีชีส์มีความสับสนอยู่มาก

2.2 การศึกษาความหลากหลายในระดับโมเลกุล

มีรายงานการศึกษาความหลากหลายในระดับโมเลกุลของนกในสกุลนกตีนเทียนจำนวนน้อย และยังไม่เคยมีรายงานการศึกษาในประเทศไทย โดยมีรายงานที่เกี่ยวข้อง คือ Paton และคณะ (2003) ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่ง large nuclear exon ของยีน RAG-1 (recombination activating gene 1) ขนาดความยาว 2850 คู่เบส ในนกชายเลนอันดับ Charadriiform จำนวน 36 สปีชีส์ จาก 34 สกุล 17 วงศ์ ยกเว้น 2 วงศ์ คือ crab plover และ ibisbill สามารถแบ่งนกชายเลนเป็น 3 กลุ่ม คือ Charadrii, Scolopaci และ Lari โดย Scolopaci และ Lari จะมีความใกล้ชิดกันมากกว่า ซึ่งให้ผลแตกต่างจากการศึกษาของ Sibley และ Ahlquist (1990) ที่แสดงว่า Charadrii และ Lari จะมีความใกล้ชิดกันมากกว่า Scolopaci เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ภายในกลุ่ม Charadrii สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อย คือ กลุ่มย่อย 1 ประกอบด้วยสกุล *Burhinus*, *Pluvianellus* และ *Chionis* และกลุ่มย่อยที่ 2 ประกอบด้วยสกุล *Charadrius*, *Phegornis*, *Vanellus*, *Himantopus*, *Haematopus* และ *Recurvirostra* และเมื่อศึกษาความสัมพันธ์แสดงให้เห็นว่าสกุล *Charadrius* แสดงความใกล้ชิดกับสกุล *Phegornis* และ *Vanellus* แต่สกุล *Himantopus* แสดงความใกล้ชิดกับสกุล *Haematopus* และ *Recurvirostra*

Ericson และคณะ (2003) ศึกษาความสัมพันธ์ของนกในอันดับ Charadriiformes จำนวน 23 สปีชีส์ จาก 15 วงศ์ จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอภายในนิวเคลียสในตำแหน่ง RAG-1 (930 คู่เบส) และ myoglobin intron II (693-734 คู่เบส) สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ โดยกลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยนก sandpiper (วงศ์ Scolopacidae, Jacanidae, Rostratulidae, Thinocoridae)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รวมทั้งนก gulls และสมาชิก (Laridae, Sternidae, Rynchopidae, Stercorariidae), auks (Alcidae) และ coursers (Glareolidae) ในกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยนก plover (Charadriidae, Haematopodidae, Recurvirostridae) รวมทั้ง sheathbill (Chionidae) และ thick-knee (Burhinidae) ซึ่งแม้ว่าให้ผลการศึกษาไม่สอดคล้องกับ Paton และคณะ (2003) ในจำนวนของกลุ่ม แต่แสดงให้เห็นว่า Scolopaci และ Lari จะมีความใกล้ชิดกันมากกว่า Charadrii และเมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ภายในกลุ่ม Charadrii สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อย คือ กลุ่มย่อย 1 ประกอบด้วยสกุล *Burhinus* (วงศ์ Burhinidae) และ *Chionis* (วงศ์ Chionidae) และกลุ่มย่อยที่ 2 ประกอบด้วยสกุล *Vanellus* (วงศ์ Vanellidae), *Haematopus* (วงศ์ Haematopodidae), *Recurvirostra* (วงศ์ Recurvirostridae) และสกุล *Pluvianellus* และ *Charadrius* (วงศ์ Charadriidae) ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาของ Paton และคณะ (2003) ที่แสดงให้เห็นว่าสกุล *Pluvianellus* ที่ใกล้ชิดกับสกุล *Burhinus* และ *Chionis* มากกว่า

โดย Paton และ Baker (2006) แสดงให้เห็นว่าการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ใน 14 ตำแหน่งของยีนในไมโทคอนเดรีย สามารถจัดกลุ่มนก 17 วงศ์ในอันดับนี้ได้ดีกว่าการใช้เพียงตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่งของลำดับนิวคลีโอไทด์จากยีนในนิวเคลียสหรือยีนในไมโทคอนเดรีย โดยจากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ใน 14 ตำแหน่งของยีนในไมโทคอนเดรีย เรียงตามลำดับนิวคลีโอไทด์ประมาณ 13,000 คู่เบส คือ 12S ribosomal RNA, 16S ribosomal RNA, NADH dehydrogenase 1 (ND1), NADH dehydrogenase 2 (ND2), cytochrome c oxidase I (COI), cytochrome c oxidase II (COII), ATP synthase protein 8 (ATP8), ATP synthase protein 6 (ATP6), cytochrome c oxidase III (COIII), NADH dehydrogenase 3 (ND3), NADH dehydrogenase 4L (ND4L), NADH dehydrogenase 4 (ND4), NADH dehydrogenase 5 (ND5) และ Cytochrome b และให้ข้อมูลสอดคล้องกับยีนในนิวเคลียสตำแหน่งยีน RAG-1 แต่อย่างไรก็ตามแนะนำให้มีการศึกษาทั้งยีนในนิวเคลียสและในไมโทคอนเดรียควบคู่กัน

ในอันดับย่อย Charadrii นั้นมีรายงานที่เป็นข้อขัดแย้งกันของนกในสกุล *Pluvialis* เช่น Black-bellied Plover (*Pluvialis squatarola*) ที่ไม่ได้จัดอยู่ในวงศ์ Charadriidae แต่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดแบบ paraphyletic กับวงศ์ Charadriidae หรือกับวงศ์ Recurvirostridae และ Haematopodidae รวมทั้งมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดแบบ paraphyletic กับอันดับย่อย Charadrii (Ericson และคณะ, 2003; Baker และคณะ, 2007; Fain และ Houde, 2007 และ Mayr, 2011) โดย Baker และคณะ (2007) ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนในไมโทคอนเดรีย 3 ตำแหน่ง (12S, ND2 และ Cyt b) และ RAG1 ซึ่งเป็นยีนในนิวเคลียส และ Fain และ Houde (2007) ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนในไมโทคอนเดรีย 2 ตำแหน่ง (12S+Val และ 16S) และยีนในนิวเคลียส 3 ตำแหน่ง คือ GPD3-5, ADH5 และ FGB7 แต่อย่างไรก็ตาม Baker และคณะ (2012) ได้ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์จากยีนภายในนิวเคลียสจำนวน 8 ยีน คือ Aldolase B fructose-bisphosphate (ALDOB), brain-derived neurotrophic factor (BDNF), bone morphogenetic protein 2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(BMP2), heavy chain of dynein axonemal 3 (DNAH3), neurotrophin 3 (NTF3), prolactin receptor (PRLR), Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 12 (PTPN12) และ TNF receptor association factor 6 (TRAF6) แสดงให้เห็นว่านกในสกุล *Pluvialis* มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดแบบ monophyletic กับวงศ์ Charadriidae และแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ของนกในวงศ์นี้ประกอบด้วยสกุล *Pluvialis*, *Oreopholus*, *Vanellus*, *Peltohyas* และ *Charadrius* รวมทั้งนกในสกุล *Haematopus* มีวิวัฒนาการร่วม (sister group) กับนกในสกุล *Himantopus* และ *Recurvirostra* จึงมีแนวโน้มในการแบ่งนกในวงศ์นี้ออกเป็น 4 วงศ์ย่อย (subfamily) คือ Pluvialinae, Oreopholinae, Vanellinae และ Charadriinae ซึ่งโดยทั่วไปนกในวงศ์ Charadriidae นิยมแบ่งออกเป็น 2 วงศ์ย่อย คือ lapwings (Vanellinae) และ plovers (Charadriidae) นอกจากนั้นแล้วยังมีข้อมูลทั้งการมีวิวัฒนาการร่วมกันระหว่างนกในสกุล Peltohyas กับสกุล Charadrius (Baker และคณะ, 2012) และกับสกุล Vanellus (Baker และคณะ, 2007) อีกด้วย

2.3 การระบุเพศนก

การระบุเพศในนกเป็นประโยชน์ในการติดตามการเปลี่ยนแปลงประชากรนก อัตราส่วนของเพศ (sex ratio) พฤติกรรมการผสมพันธุ์ นิเวศวิทยา การอนุรักษ์ และวิวัฒนาการ รวมทั้งความถูกต้องแม่นยำในการจับคู่เพื่อเพาะขยายพันธุ์เพื่อการค้า ซึ่งการระบุเพศของนกเป็นไปได้ยากในขณะที่ยังไม่แสดงลักษณะเฉพาะของเพศ นอกจากนี้ยังพบว่าประมาณ 50 เปอร์เซนต์ ของนกทั้งหมดมีลักษณะภายนอกเหมือนกันทั้งในเพศผู้และเพศเมีย (sexually monomorphic) ทำให้ไม่สามารถระบุเพศโดยดูจากลักษณะภายนอกได้ แม้ได้พยายามหาความสัมพันธ์ของลักษณะและพฤติกรรมระหว่างเพศ เช่น นกเพศผู้จะมีสีสันที่เข้มและสดใสกว่าเพศเมีย และมีขนาดที่เล็กกว่านกเพศเมีย การศึกษาเกี่ยวกับฮอร์โมน การตรวจโครโมโซมเพศ การผ่าหรือส่องกล้องเพื่อตรวจดูอวัยวะเพศภายใน ซึ่งนอกจากทำให้นกบาดเจ็บแล้ว ยังมีปัจจัยที่ทำให้การแปลผลคลาดเคลื่อนได้ เช่น อายุ ฤดูกาลผสมพันธุ์ และขนาดของลำตัว เป็นต้น รวมทั้งมีผลทำให้นกบาดเจ็บได้ (Bermúdez-Humarán และคณะ, 2002) ดังนั้นจึงได้มีการพัฒนาการระบุเพศด้วยเทคนิคทางโมเลกุลขึ้น (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* ระหว่างโครโมโซม Z (*CHD-Z*) กับโครโมโซม W (*CHD-W*) (Griffiths และ Tiwari, 1995; Ellegren, 1996; Griffiths และ Korn, 1997) จึงนำมาใช้ในการระบุเพศนกได้เป็นอย่างดี ยกเว้นนกที่บินไม่ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

ซึ่งนกอพยพที่สนใจศึกษาครั้งนี้เพศผู้และเพศเมียมีลักษณะสัณฐานแตกต่างกันเล็กน้อย ทำให้ยากต่อการระบุเพศ ดังนั้นจึงต้องอาศัยเทคนิคทางโมเลกุลเพื่อการระบุเพศนก โดยการเปรียบเทียบความแตกต่างของยีน *CHD* (*chromosome-helicase-DNA-binding*) ที่อยู่บนโครโมโซมเพศ ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส (PCR) ด้วยไพรเมอร์ชนิดต่างๆ ดังเช่น Jensen และคณะ (2003) ทำการระบุเพศนก 47 สายพันธุ์โดยใช้ไพรเมอร์ P2/P8 และ 1237L/1272H พบว่าสามารถใช้ไพรเมอร์ P2/P8 ระบุเพศนกเมอร์เล็ทลายหินอ่อนได้ ซึ่งเป็นนกทะเลในอันดับเดียวกันกับนกตีนเทียน รวมทั้งการบ่งชี้เพศเพื่อการดำเนินการในการเพาะเลี้ยงในสภาพกรงของ *H. novaezelandiae* (Black Stilt) เนื่องจากพบจำนวนน้อยและใกล้สูญพันธุ์ (Millar และคณะ, 1997; Wallis, 1999)

Watson และคณะ (2004) ระบุเพศนกกินหอยปากแดง (*Eurasian oystercatcher*) โดยเก็บตัวอย่างจากขนบริเวณอกของนกจากนั้นนำมาสกัดดีเอ็นเอ รวมทั้งวัดขนาดของปากเพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างเพศและลักษณะทางสัณฐาน การระบุเพศด้วยเทคนิคทางโมเลกุลโดยการเพิ่มปริมาณยีน *CHD* ด้วยไพรเมอร์ P2/P8 พบว่านกเพศผู้เกิด 1 แถบ ที่มีขนาด 380 คู่เบส นกเพศเมียเกิด 2 แถบ ที่มีขนาด 380 และ 400 คู่เบส และจากการระบุเพศนกจำนวน 80 ตัว สามารถระบุเพศ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ได้ 75 ตัว ไม่สามารถเพิ่มปริมาณยีน *CHD* ได้จำนวน 5 ตัว และจากการเปรียบเทียบพบว่าการระบุเพศด้วยการวัดความยาวปากให้ผลถูกต้องเพียง 90 เปอร์เซ็นต์

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

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

ในการระบุเพศนกในระดับโมเลกุลด้วยเทคนิคพีซีอาร์ นิยมใช้ไพรเมอร์ 3 คู่ (คู่ไพรเมอร์ P2/P8, 1237L/1272H และ 2550F/2718R) แต่อย่างไรก็ตามมีการรายงานว่านกบางสปีชีส์มีอัลลีล *CHD-Z* และ *CHD-W* ที่มีขนาดเท่ากัน จำเป็นต้องอาศัยเทคนิคทางโมเลกุลอื่นๆมาช่วยในการระบุเพศ ได้แก่ เทคนิคอาร์เอฟแอลพี (Restriction fragment length polymorphism: RFLP) ซึ่งเป็นการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะเข้ามาช่วยในการแยกความแตกต่างของชิ้นดีเอ็นเอ ดังเช่น Sacchi และคณะ (2004) ระบุเพศเหยี่ยวนิ้วสั้น (*Circaetus gallicus*) โดยเพิ่มจำนวนอัลลีล *CHD-W* และ *CHD-Z* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ P2/P8 เมื่อนำมาวิเคราะห์ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส พบผลผลิตพีซีอาร์ 1 แถบ มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอประมาณ 380 คู่เบส ในทุกตัวอย่าง ทำให้ไม่สามารถระบุเพศได้ จากนั้นทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของอัลลีลทั้งสอง พบว่าอัลลีล *CHD-W* ยาวกว่าอัลลีล *CHD-Z* อยู่เพียง 9 คู่เบส (387 และ 378 คู่เบส ตามลำดับ) จึงอาศัยเทคนิคอาร์เอฟแอลพี ในการระบุเพศเหยี่ยวนิ้วสั้น โดยใช้เอนไซม์ 2 ชนิด ได้แก่ เอนไซม์ *Hae*III และเอนไซม์ *Asp*700I โดยเมื่อนำนำไปวิเคราะห์ด้วยอิเล็กโทรโฟรีซิสพบว่าเอนไซม์ *Hae*III มีความจำเพาะกับอัลลีล *CHD-Z* ทำให้เกิดความแตกต่างของขนาดชิ้นดีเอ็นเอ คือเพศผู้เกิดผลผลิตพีซีอาร์ 2 แถบ (303 และ 75 คู่เบส) เพศเมียเกิดผลผลิตพีซีอาร์ 3 แถบ (387, 303 และ 75 คู่เบส) ส่วนเอนไซม์ *Asp*700I มีความจำเพาะกับอัลลีล *CHD-W* ทำให้เกิดความแตกต่างของขนาดชิ้นดีเอ็นเอ คือเพศผู้เกิดผลผลิตพีซีอาร์ 1 แถบ (378

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คู่เบส) และเพศเมียเกิดผลผลิตพีซีอาร์ 3 แถบ (378, 280 และ 107 คู่เบส) ดังนั้นการใช้เอนไซม์ *Hae*III และเอนไซม์ *Asp*700I มาช่วยย่อยผลผลิตพีซีอาร์จากไพรเมอร์ P2/P8 ทำให้เกิดความแตกต่างของชิ้นดีเอ็นเอที่สามารถระบุเพศนกได้ รวมทั้งงานวิจัยของ Costantini และคณะ (2008) พบปัญหาเช่นเดียวกันในการระบุเพศนกแพนกวินฮัมโบลด์ (*Spheniscus humboldti*) จากการตรวจสอบยีน *CHD* ด้วยไพรเมอร์ P2/P8 ผลการทดลองพบว่าเพศผู้เกิดผลผลิตพีซีอาร์ 1 แถบ (370 คู่เบส) เพศเมียเกิด 2 แถบ (370 และ 380 คู่เบส) ทำให้เกิดความคลุมเครือ เนื่องจากขนาดชิ้นดีเอ็นเอมีความแตกต่างกันน้อย จึงใช้เทคนิคอาร์เอฟแอลพีที่ใช้เอนไซม์ 2 ชนิด คือ เอนไซม์ *Hae*III (310, 60 และ 380 คู่เบส) และเอนไซม์ *Asp*700I (370, 270 และ 110 คู่เบส) ทำให้แยกความแตกต่างของเพศผู้และเพศเมียได้ดียิ่งขึ้น นอกจากนั้นแล้วยังมีการพัฒนาเทคนิคอื่นๆ เช่นเทคนิคอาร์เอพีดี (Random amplified polymorphic DNA: RAPD) (Wu และคณะ, 2007) รวมทั้งการใช้เทคนิค Real time รวมกับการวิเคราะห์ melting curve ที่สามารถแยกผลผลิตพีซีอาร์ที่มีความแตกต่างกันจากค่าของ Tm (melting temperatures) โดยนำมาใช้ในการระบุเพศนกจากการตรวจสอบอัลลีล *CHD-Z* และ *CHD-W* ที่มีค่า Tm ต่างกัน ซึ่งวิธีการระบุเพศนกด้วยเทคนิคนี้เป็นวิธีที่มีความรวดเร็วแต่มีข้อระมัดระวังคือการเลือกใช้ไพรเมอร์ต้องมีความเหมาะสม (Morinha และคณะ, 2012)

แต่ยังไม่มีการรายงานการเก็บตัวอย่าง การบ่งชี้เพศ การบ่งชี้สายพันธุ์ และการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิคทางโมเลกุลในนกสกุลตีนเทียนทั้งนกอพยพมาในประเทศไทยและนกสกุลนกตีนเทียนที่ประจำถิ่นในประเทศไทย ที่มีความผันแปรของสีและตำแหน่งของสีบนกระหม่อมและท้ายทอย นอกจากนั้นแล้วนกตีนเทียนมีทั้งนกประจำถิ่น และนกอพยพมาในช่วงฤดูหนาว ในช่วงฤดูผสมพันธุ์อาจพบเป็นคู่หรือเป็นฝูง นกตีนเทียนจะผสมพันธุ์ในช่วงฤดูร้อนระหว่างเดือนเมษายนถึงเดือนมิถุนายน ซึ่งการระบุสายพันธุ์และศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกจะเป็นประโยชน์ทางด้านฐานข้อมูลทางพันธุกรรม การศึกษาวิวัฒนาการ การสำรวจประชากรนกอพยพที่เข้ามาตามแหล่งพื้นที่ต่างๆทั่วประเทศ เพื่อเป็นดัชนีชี้วัดความหลากหลายของนกอพยพ ความอุดมสมบูรณ์ของพื้นที่บริเวณต่างๆที่นกอพยพเข้ามาอาศัย รวมทั้งจะเป็นประโยชน์ในการวางแนวทางการควบคุม ดูแล และลดการคุกคามต่อนกได้

2.4 การเก็บตัวอย่าง

ในงานวิจัยและการทดลองในระดับโมเลกุลต้องอาศัยดีเอ็นเอที่มีทั้งคุณภาพและปริมาณที่เหมาะสมกับงานวิจัย การได้มาซึ่งดีเอ็นเอของนกคือการใช้ตัวอย่างจากเลือด (Ellegren, 1996; Wang และคณะ, 2007) เพื่อใช้ในการสกัดดีเอ็นเอทำให้นกได้รับการบาดเจ็บและเกิดภาวะเครียด แม้ว่าจะมีการหลีกเลี่ยงการใช้ตัวอย่างจากเลือดแล้วก็ตาม เช่น การใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากขนนก (Jensen และคณะ, 2003; Sacchi และคณะ, 2004; Costantini และคณะ, 2008) เนื้อเยื่อ (Kahn และคณะ, 1998; Fridolfsson และ Ellegren, 1999; Wang และคณะ, 2007) เส้นเลือดบริเวณเปลือกไข่ (Jensen และคณะ, 2003) และอุจจาระ (Robertson และคณะ, 1999; Idaghdour และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คณะ, 2003) ซึ่งเป็นวิธีที่นกไม่ได้รับการบาดเจ็บ ถึงแม้ว่าเลือดจะเป็นแหล่งตัวอย่างที่เหมะสม แต่ต้องใช้ในปริมาณมากพอสำหรับการสกัดดีเอ็นเอ ซึ่งมีปริมาตรประมาณ 80-100 ไมโครลิตร (Harvey และคณะ, 2006; Wang และคณะ, 2007) ส่วนใหญ่ต้องเจาะจากบริเวณปีกทำให้นกได้รับบาดเจ็บและเกิดภาวะเครียดได้ นอกจากนั้นแล้วยังต้องใช้การสกัดดีเอ็นเอโดยวิธีมาตรฐาน คือการใช้ lysis buffer และ phenol/chloroform ที่ต้องใช้เวลาในการสกัด แม้ว่ามีการนำ Chelex มาใช้ในการสกัด รวมทั้งชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูปที่มีความสะดวก และรวดเร็วมากยิ่งขึ้น แต่ยังคงมีค่าใช้จ่ายสูง

ปัจจุบันมีการนำกระดาษสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูปหรือกระดาษ FTA (Fast Technology Analysis Card : FTA®card) มาใช้ในการเก็บตัวอย่าง ซึ่งเป็นวิธีที่ง่าย สะดวกรวดเร็วในการเก็บตัวอย่าง และยังพบว่าในหลายงานวิจัยที่นำมาใช้กับเทคนิคในระดับโมเลกุล เพื่อการตรวจสอบและวิจัยงานต่างๆ ดังเช่น Smith และ Burgoyne (2004) พบว่ากระดาษ FTA®card สามารถใช้ในการเก็บตัวอย่างดีเอ็นเอของตัวอย่างสัตว์ป่าได้ ซึ่งดีเอ็นเอที่ได้มีความบริสุทธิ์ สามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคทางโมเลกุลได้ การนำ FTA®card มาใช้เก็บตัวอย่างเลือด เพื่อลดปริมาตรของเลือด โดยใช้เพียงประมาณ 1-2 หยด จากการเจาะด้วยเข็มเบอร์ 26 หรือเมื่อหยดเลือดลงบนกระดาษแล้วมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางไม่น้อยกว่า 2 มิลลิเมตร ในงานวิจัยเกี่ยวกับนกมีการนำกระดาษ FTA®card มาใช้ในการเก็บตัวอย่าง เช่น Garcia และคณะ (2008) ที่เก็บตัวอย่างเลือดด้วยกระดาษ FTA®card และเก็บตัวอย่างขนมาสกัดดีเอ็นเอตามวิธีปกติทั่วไป เพื่อใช้ในการระบุเพศนกแร้งเครา (*Gypaetus barbatus*) พบว่าการใช้กระดาษ FTA®card ให้ผลการวิเคราะห์ที่ดีเหมือนกับการสกัดดีเอ็นเอแบบทั่วไป แต่มีความรวดเร็วและมีราคาถูกกว่าการสกัดดีเอ็นเอแบบปกติทั่วไป รวมทั้ง Kocijan และคณะ (2011) ใช้กระดาษ FTA®card ในเก็บตัวอย่างเลือดของแร้งกริฟฟอน (*Gyps fulvus*) รวมทั้งสุพัตราและคณะ (2012) ที่ใช้ระบุเพศในนกแก้ว ซึ่งสะดวกและง่ายกว่าการเจาะเลือดใส่หลอดทดลอง ดังนั้นจึงสามารถเก็บตัวอย่างได้คราวละจำนวนมาก และการใช้ FTA®card ระบุเพศนกจะใช้เวลารวดเร็ว เนื่องจากสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยตรงจากกระดาษ โดยไม่ต้องผ่านขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอแบบมาตรฐานที่ใช้ระยะเวลานาน มีเพียงขั้นตอนการล้างที่ทำให้ดีเอ็นเอบน FTA®card บริสุทธิ์เท่านั้น แต่มีคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอเพียงพอในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิคพีซีอาร์ นอกจากนั้นการเก็บรักษาและการขนส่งจากภาคสนามไปยังห้องปฏิบัติการก็เป็นไปอย่างสะดวก ประหยัดพื้นที่ และรวดเร็ว และสามารถจัดส่งทางไปรษณีย์ได้ (Gutiérrez-Corchero et al., 2002) และสามารถเก็บตัวอย่างได้ที่อุณหภูมิห้อง

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

3.1 การเก็บตัวอย่าง

ในประเทศไทย นกตีนเทียนเป็นสัตว์ป่าคุ้มครอง จึงต้องทำหนังสือขออนุญาตเก็บตัวอย่างนกตีนเทียนบริเวณเขตห้ามล่าสัตว์ป่าบึงบอระเพ็ด จังหวัดนครสวรรค์ ต่อกรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช และได้รับการอนุมัติในการเก็บตัวอย่างเลขที่ ทส 09074/20810 โดยอยู่ในความดูแลของเจ้าหน้าที่ของสถานีวิจัยสัตว์ป่าบึงบอระเพ็ด

ในการเก็บตัวอย่างจะเก็บตัวอย่างนกทั้งช่วงฤดูอพยพ ระหว่างเดือนธันวาคมถึงเดือนมกราคม และช่วงฤดูทำรังวางไข่ ระหว่างเดือนเมษายนถึงเดือนมิถุนายน โดยวิธีการเก็บตัวอย่างในแต่ละช่วงฤดูจะมีความแตกต่างกัน โดยปรับเปลี่ยนตามพฤติกรรมของนก ในช่วงฤดูทำรังวางไข่ของนกตีนเทียน นกจะฟักไข่อยู่ที่รัง ดังนั้นจะดักจับด้วยวิธี spring trap บริเวณรัง ซึ่งวิธีการนี้เจ้าหน้าที่จากสถานีวิจัยสัตว์ป่าบึงบอระเพ็ดดัดแปลงมาจากอุปกรณ์ดักจับสัตว์ทั่วไป ส่วนในฤดูอพยพ นกตีนเทียนอาศัยอยู่รวมกันเป็นฝูงและมีปริมาณมาก จึงดักจับด้วยวิธี cannon net (ทิฐิ และคณะ, 2553)

เมื่อดักจับนกตีนเทียนได้ ใส่รหัสห่วงขาโลหะและห่วงสี เพื่อให้เป็นรหัสประจำตัวของนกแต่ละตัว โดยในห่วงขาโลหะจะมีเลขรหัสประจำตัว ชื่อประเทศ (THAILAND หมายถึง ประเทศไทย) และ DNP (Department of National Park, Wildlife and Plant Conservation) หมายถึงกรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช (ทิฐิ และคณะ, 2554) และบันทึกข้อมูลชีวสัณฐานโดยเจ้าหน้าที่จากสถานีวิจัยสัตว์ป่าบึงบอระเพ็ด การเก็บตัวอย่างอาจเก็บทั้งตัวอย่างเลือด โดยใช้เข็มเบอร์ 24 เจาะเลือดบริเวณหน้าแข้ง และใช้ micro haematocrit tube ซึ่งปราศจาก heparin ดูดเลือด จากนั้นใส่เลือดลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เก็บไว้ในตู้เย็นจนกว่าจะนำไปสกัดดีเอ็นเอในขั้นตอนต่อไป หรือหลังการเจาะเลือดแล้วจะซับเลือดด้วยกระดาษ FTA และบรรจุกระดาษ FTA ลงบนหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร หรือเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อบริเวณโคนขน ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นปล่อยนกกลับคืนสู่ธรรมชาติ

3.2 อุปกรณ์ และเครื่องมือ

3.2.1 FTA Card: Whatman

3.2.2 Neddle ขนาดเบอร์ 26

3.2.3 Glove

3.2.4 Puncture ขนาด 2 มิลลิเมตร

3.2.5 Micropipette set และ Micropipette tips ขนาดต่างๆ

3.2.6 Microcentrifuge tube ขนาด 0.2, 0.5 และ 1.5 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.7 Thermal cycler: Eppendorf Mastercycler® ep Gradient S

3.2.8 Agarose gel electrophoresis: Mupid รุ่น mupid-exu

3.2.9 Gel documentation: SYNGENE InGenuis Bio imaging พร้อมโปรแกรม Genesnap

3.2.10 กระดาษปริ้น รุ่น UPP-110HG: Sony

3.2.11 Vortex mixer

3.2.12 Centrifuge: Hettich รุ่น Mikro 22R

3.2.13 Spin down

3.2.14 Microwave

3.2.15 Heat box

3.2.16 Hot air oven

3.2.17 pH meter

3.2.18 Water bath

3.2.19 Beaker ขนาด 100, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร

3.2.20 Erlenmeyer flask ขนาด 125 และ 250 มิลลิลิตร

3.2.21 Rack ขนาด 0.2 และ 1.5 มิลลิลิตร

3.2.22 Refrigerator 4 และ -20 องศาเซลเซียส

3.2.23 Balance ชนิดละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง

3.2.24 Forceps

3.2.25 Computer พร้อมโปรแกรมต่างๆ เช่น Notepad, BioEdit,

3.2.26 Haematocrit tube

3.2.27 Parafilm

3.2.28 Petri dish

3.2.29 Spectrophotometer

3.2.30 วัสดุและอุปกรณ์ท่อส่งตาข่ายสำหรับดักนก

3.3 สารเคมี

3.3.1 10X standard *Taq* reaction buffer; BioLab

3.3.2 2X *Tag* master mix; Vivantis

3.3.3 6X loading dye; Biolabs

3.3.4 Abosolute ethanol และ alcohol 70 เปอร์เซ็นต์

3.3.5 Agarose gel; Vivantis

3.3.6 Boric acid; Vivantis

3.3.7 Nuclaese free water: Vivantis

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.8 Deoxyribonucleotide triphosphates: dATP, dCTP, dGTP, dTTP ความเข้มข้นชนิดละ 100 mM; Vivantis

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

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

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

3.3.12 Ethidium bromide; Vivantis

3.3.13 Ethylenediaminetetraacetate (EDTA); Vivantis

3.3.14 FTA purification reagent; Whatman, UK

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

3.3.16 GF-1 blood DNA extraction kit; Vivantis

3.3.17 GF-1 tissue DNA extraction kit; Vivantis

3.3.18 Magnesium chloride; Vivantis

3.3.19 Nuclease free water; Vivantis

3.3.20 *Taq* DNA polymerase; Biolabs

3.3.21 Tris base; Vivantis

3.3.22 Primer แสดงดังตารางที่ 3.1-3.4

ตารางที่ 3.1 แสดงชนิดไพรเมอร์ ลำดับนิวคลีโอไทด์ ตำแหน่ง และเอกสารอ้างอิงของไพรเมอร์

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	ตำแหน่งยีน	อ้างอิง
2550F	5´-GTTACTGATTCGTCTACGAGA-3´	*CHD*	Fridolfsson และ Ellegren, 1999
2718R	5´-ATTGAAATGATCCAGTGCTTG-3´		
P2	5´-TCTGCATCGCTAAATCCTTT-3´	*CHD*	Griffiths และคณะ, 1998
P8	5´-CTCCCAAGGATGAGRAAYTG-3		
1237L	5´-GAGAAACTGTGCAAAACAG-3´	*CHD*	Kahn และคณะ, 1998
1272H	5´-TCCAGAATATCTTCTGCTCC-3´		
Bird F1	5'-TTCTCCAACCACAAAGACATTGGCAC-3'	*COI*	Hebert และคณะ, 2004
Bird R3	5'- AGGAGTTTGCTAGTACGATGCC-3'		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4 วิธีการทดลอง

ตัวอย่างที่เก็บมาใช้ในการทดลองมีทั้งหมด 3 รูปแบบ คือ ตัวอย่างเลือดบนกระดาษ FTA ตัวอย่างเลือดที่เก็บด้วย Haematocrit tube และเนื้อเยื่อบริเวณปลอกขน จึงมีวิธีการสกัดดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน ดังนี้

3.4.1 การทำให้ดีเอ็นเอในกระดาษ FTA บริสุทธิ์

ในกรณีเก็บตัวอย่างเลือดลงบนกระดาษ FTA จะต้องนำกระดาษ FTA มาทำให้บริสุทธิ์ก่อนที่จะนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยไม่ต้องผ่านขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ ซึ่งเหมาะแก่การนำมาใช้ในการระบุเพศ เนื่องจากใช้ปริมาณเลือดเพียงเล็กน้อยสัมผัสกับกระดาษ FTA และเป็นวิธีที่รวดเร็ว เนื่องจากมีเพียงขั้นตอนการทำให้กระดาษ FTA บริสุทธิ์ โดยดัดแปลงวิธีการทำให้ดีเอ็นเอในกระดาษบริสุทธิ์จากสุพัตรา และคณะ (2012) เริ่มจากการทำความสะอาดหัวเจาะกระดาษหรือ poucher ขนาด 2 มิลลิเมตร ด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ รอให้แห้ง หรือทำความสะอาด poucher โดยนำไปเจาะบนกระดาษ FTA ในตำแหน่งที่ไม่มีตัวอย่างเลือด เพื่อเป็นการกำจัดเศษฝุ่นหรือสิ่งสกปรกที่ยังตกค้าง หลังจากนั้นใช้ poucher เจาะกระดาษ FTA บริเวณที่มีตัวอย่างเลือดใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 0.2 มิลลิลิตร เติมสาร FTA purification reagent (Whatman, UK) ปริมาตร 125 ไมโครลิตร นำไป Vortex ซึ่งสาร FTA purification reagent จะมีคุณสมบัติในการชะล้างสิ่งสกปรกและเศษของเซลล์ที่ติดค้างบนกระดาษ FTA ให้หลุดออก แล้วนำไปบ่มด้วยเครื่อง Heatbox ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลานำไป vortex และดูดสารละลายออก และใส่สาร FTA purification reagent ปริมาตร 125 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 10 นาทีอีกครั้ง จากนั้นหยุดการทำงานของสาร FTA purification 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

3.4.2 การสกัดดีเอ็นเอจากเลือด

โดยเก็บตัวอย่างเลือดที่ได้จากการเจาะเลือดบริเวณหน้าแข้งของนกปริมาณ 100-200 ไมโครลิตร ด้วย Haematocrit tube ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร มาสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป GF-1 blood DNA extraction kit โดยทำตามวิธีการและคู่มือจากบริษัท โดยเติม buffer BB ปริมาตร 200 ไมโครลิตรลงในเลือด ผสมให้เข้ากัน และเติม proteinase K ความ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

เข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร นำไป vortex ให้เป็นเนื้อเดียวกัน แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 10 นาที จากนั้นเติม RNase A ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 10 นาที เพื่อย่อยสลายอาร์เอ็นเอ เมื่อครบเวลา เติม abosolute ethanol ปริมาตร 200 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาทันที จากนั้นนำสารละลายทั้งหมดใส่ลงใน column ซึ่งอยู่ใน 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 เพื่อทำให้ column แห้ง จากนั้นย้าย column ไปที่หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม elution buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตร โดยปริมาตรนี้สามารถปรับได้ตามความเหมาะสมกับปริมาณเลือดที่นำมาสกัด ปล่อยทิ้งไว้นาน 2 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 7,000 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 1 นาที นำ column ออก เก็บดีเอ็นเอที่ได้ไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในขั้นตอนการตรวจเพศด้วยเทคนิคทางโมเลกุลต่อไป

3.4.3 การสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อบริเวณปลอกขน

ในกรณีเก็บตัวอย่างเป็นเนื้อเยื่อบริเวณปลอกขน จะนำตัวอย่างเนื้อเยื่อบริเวณปลอกขนของนกมาสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป GF-1 tissue DNA extraction kit โดยทำตามวิธีการและคู่มือจากบริษัท ดังนี้ นำเนื้อเยื่อบริเวณปลอกขนมาสับให้เป็นชิ้นเล็กๆ ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม buffer TL ปริมาตร 250 ไมโครลิตร และ proteinase K ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาเพื่อให้สารผสมกัน เติม lysis enhancer ปริมาตร 20 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส 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 และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 10 นาที จากนั้นเติม absolute ethanol ปริมาตร 200 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาทันที ย้ายสารละลายทั้งหมดใส่ลงใน column ซึ่งอยู่ใน 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 เพื่อทำให้ column แห้ง จากนั้นย้าย column ไปที่หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม elution buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตร โดยปริมาตรนี้สามารถปรับได้ตามความเหมาะสมกับปริมาณเนื้อเยื่อที่นำมาสกัด ปล่อยทิ้งไว้นาน 2 นาที นำไปปั่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

143104

เหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 7,000 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 1 นาที นำ column ออก เก็บดีเอ็นเอที่ได้ไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในขั้นตอนการตรวจเพศด้วยเทคนิคทางโมเลกุลต่อไป

3.4.4 การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอ

นำดีเอ็นเอที่สกัดในข้อที่ 3.4.2 และ 3.4.3 มาตรวจสอบคุณภาพด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยเตรียมเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ TBE buffer ความเข้มข้น 1X ละลายให้เข้ากันด้วยการให้ความร้อนจากไมโครเวฟ ทิ้งไว้ให้อุ่นก่อนเทลงบนถาดที่มีหวีเสียบ รอให้เจลแข็ง ย้ายเจลลงใน chamber ของเครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิส เติม TBE buffer ความเข้มข้น 1X ให้ท่วมเจล เตรียม 6X loading dye ให้มีความเข้มข้นเป็น 3X โดยการผสม deionized water จากนั้นผสมดีเอ็นเอตัวอย่างปริมาตร 3 ไมโครลิตร กับ loading dye ความเข้มข้น 3X ปริมาตร 3 ไมโครลิตร ให้เข้ากันบนแผ่น parafilm หรือหลอดทดลอง และหยอดลงในหลุมเจลที่เตรียมไว้ เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1 กิโลเบส ปริมาตร 2 ไมโครลิตร แยกขนาดชิ้นดีเอ็นเอด้วยความต่างศักย์ 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 โดยใช้น้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วเป็นค่ามาตรฐาน (blank) คำนวณความเข้มข้นของดีเอ็นเอจากสูตร

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

3.4.5 การระบุเพศนกด้วยเทคนิคระดับโมเลกุล

การระบุเพศนด้วยเทคนิคระดับโมเลกุลโดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน *CHD* ในช่วงแรกของการทดลองจะทดสอบไพรเมอร์ 3 คู่ ซึ่งเป็น universal primer ที่ใช้ในการระบุเพศนก คือ ไพรเมอร์ P2/P8 (Griffiths และคณะ, 1998) ไพรเมอร์ 1237L/1272H (Kahn และคณะ, 1998) และไพรเมอร์ 2550F/2718R (Fridolfsson และ Ellegren, 1999) เพื่อหาไพรเมอร์ที่เหมาะสมที่สุดในการระบุเพศนกตีนเทียน ในกรณีเป็นกระดาษ FTA ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจะใช้ปริมาตรสารทั้งหมดเท่ากับ 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย FTA®card ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 มิลลิเมตร ที่ผ่านขั้นตอนการทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์แล้วจำนวน 1 แผ่น ไพรเมอร์อย่างละ 0.8 พิโคโมล (ความเข้มข้น 20 พิโคโมลต่อไมโครลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร) และ 1x *Taq* Master mix (2x Taq Master mix ปริมาตร 12.5 ไมโครลิตร) จากนั้นปรับปริมาตรด้วย Nuclaese free water ปริมาตร 10.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไมโครลิตร นำใส่เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ที่ตั้งโปรแกรมอุณหภูมิในขั้นต่างๆ ดังนี้ ดังนี้ initial denaturation ที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ denaturation ที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลาระยะ 45 วินาที annealing ที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 45 วินาที extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 45 วินาที จำนวน 35 รอบ และ final extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 นาที (Wang และคณะ, 2007) การวิเคราะห์ผลผลิตพีซีอาร์ของยีน *CHD* นั้นจะตรวจสอบทั้งคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ดังข้อ 3.4.4 เพื่อการวิเคราะห์ทั้งจำนวนและขนาดชิ้นดีเอ็นเอ โดยจะเตรียมอะกาโรสเจลที่ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ในบัฟเฟอร์ TBE buffer และใช้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ 5 ไมโครลิตร ผสมกับ loading dye ความเข้มข้น 3X ปริมาตร 3 ไมโครลิตร โดยเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 50 คู่เบส ปริมาตร 2 ไมโครลิตร แล้วปล่อยกระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 50 โวลต์ เป็นระยะเวลาประมาณ 50-60 นาที นำแผ่นเจลไปย้อมในสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ และนำไปวิเคราะห์ภาพเจลเพื่อดูขนาดชิ้นดีเอ็นเอ และถ่ายรูปบันทึกผลการทดลอง เลือกไพรเมอร์ที่สามารถแยกความแตกต่างของเพศได้ดีที่สุด และนำไปตรวจสอบกับทุกตัวอย่างต่อไป

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

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน *cytochrome c oxidase I* (*COI*) เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม โดยใช้ไพรเมอร์ BirdF1/BirdR3 (Hebert และคณะ, 2004) โดยมีสารทั้งหมด 25 ไมโครลิตรต่อหลอดทดลอง ประกอบด้วย deoxyribonucleotide triphosphates (dNTPs) ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.2 มิลลิโมลาร์ 10X standard *Taq* reaction buffer ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1X ไพรเมอร์ซึ่งมีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.8 ไมโครโมลาร์ และ *Taq* DNA polymerase ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.05 ยูนิต เติม deionized water จนครบ 25 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองที่มีดีเอ็นเอความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร นำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง DNA thermal cycler โดยให้มีสภาวะดังนี้ initial denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 1 รอบ denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที สำหรับขั้นตอน annealing อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 30 วินาที extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 30 วินาที จำนวน 30 รอบ และ final extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส นำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.7 การทำให้ผลผลิตพีซีอาร์บริสุทธิ์

การทำให้ผลผลิตพีซีอาร์บริสุทธิ์ด้วยชุด GF-1 AmbiClean Kit (PCR & Gel): Vivantis ภายหลังจากการตรวจสอบแถบดีเอ็นเอของผลผลิตพีซีอาร์แล้ว การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากตำแหน่งยีน *CHD* ซึ่งตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมเพศ ดังนั้นจะเกิดผลผลิตพีซีอาร์ 2 อัลลีล คือ อัลลีล *CHD-Z* และอัลลีล *CHD-W* จะทำการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากดีเอ็นเอทั้ง 2 อัลลีล โดยในกรณีต้องการเฉพาะอัลลีล *CHD-W* ให้นำผลผลิตพีซีอาร์มาแยกขนาดด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส เมื่อการตรวจสอบแถบดีเอ็นเอโดยใช้ UV transilluminator แล้ว ใช้ใบมีดตัดเจลอะกาโรสบริเวณมีแถบดีเอ็นเอที่ต้องการขณะที่ทำการส่องแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลต ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำเจลไปชั่งน้ำหนัก โดยต้องชั่งน้ำหนักหลอดทดลองที่ใช้ไว้ก่อน แล้วคำนวณหาเฉพาะน้ำหนักเจล เติมบัฟเฟอร์ DB (buffer DB) ปริมาตร 1: 1 โดยปริมาตร (เจลอะกาโรสน้ำหนัก 0.1 กรัม ใช้ปริมาตร 100 ไมโครลิตร) โดยจะต้องให้บัฟเฟอร์ท่วมเจล นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จนกว่าเจลอะกาโรสจะละลายเป็นเนื้อเดียวกันกับบัฟเฟอร์ หรือในกรณีต้องการทำให้ผลผลิตพีซีอาร์ในหลอดทดลองบริสุทธิ์ เช่นหลังการตรวจสอบด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแล้วพบว่ามีแถบดีเอ็นเอ เฉพาะอัลลีล *CHD-Z* เพียงแถบเดียว โดยนำผลผลิตพีซีอาร์มาปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้มีปริมาตรเป็น 100 ไมโครลิตร เติม 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

3.4.8 การศึกษาหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากลำดับนิวคลีโอไทด์

นำผลผลิตพีซีอาร์ดังกล่าว ส่งวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท 1st BASE DNA Sequencing Division ประเทศมาเลเซีย นำผลข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์แต่ละตัวอย่างมาวิเคราะห์เปรียบเทียบหาความคล้ายคลึงผ่านโปรแกรม BLAST (Altschul และคณะ, 1990) เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank ใน NCBI (National Center for Biotechnology Information) โดยใช้โปรแกรม BioEdit version 7.0.5.2 ในการตรวจสอบและแก้ไขความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาทำการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างตัวอย่างแบบ multiple alignment ด้วยโปรแกรม ClustalX version 1.83 และสร้างแผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมตามวิธี neighbor-joining กำหนดค่า bootstrapping คือ 1000 ครั้ง โดยใช้โปรแกรม Mega 6 (Tamura และคณะ, 2013)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผล และอภิปรายผลการทดลอง

4.1 การเก็บตัวอย่างนกตีนเทียน

ในประเทศไทยนกตีนเทียน (black-winged stilt: *H. himantopus*) มีสถานะเป็นทั้งนกอพยพและนกประจำถิ่นหรือมีการทำรังวางไข่ ซึ่งช่วงเวลาอพยพจะอยู่รวมกันเป็นฝูงใหญ่ (รูปที่ 4.1 A) แต่ในช่วงฤดูการทำรังวางไข่จะกระจายอยู่ทั่วไปบริเวณแหล่งน้ำ หรือพื้นที่ชุ่มน้ำ (รูปที่ 4.1 B) นกตีนเทียนเป็นนกที่มีขนาดเล็กถึงกลาง มีปากยาวสีดำ และเรียวแหลม ปีกยาวแหลมสีดำ ขายาวสีชมพู ลำตัวส่วนล่างเป็นสีขาว สะโพกและขนคลุมโคนหางสีขาว (รูปที่ 4.1 C) โดยจะพบความหลากหลายของสีบริเวณกระหม่อมและท้ายทอยตั้งแต่สีขาว เทา และดำ ดังตัวอย่างในรูปที่ 4.1 D ดังนั้นการดักจับนกตีนเทียน และวิธีการเก็บตัวอย่างในแต่ละช่วงจะมีความแตกต่างกันตามพฤติกรรมของนก โดยการเก็บตัวอย่างนกตีนเทียนในฤดูอพยพช่วงเดือนธันวาคมถึงเดือนมกราคม นกตีนเทียนอาศัยอยู่รวมกันเป็นฝูงและมีปริมาณมาก จึงดักจับด้วยวิธีท่อส่งตาข่าย (cannon net) ซึ่งท่อส่งตาข่ายเป็นอุปกรณ์ที่ใช้ในการจับนกที่สามารถจับนกได้ครั้งละมากๆโดยที่นกไม่เป็นอันตราย (ฑิฐิ และคณะ, 2554) โดยขั้นตอนแรกจะต้องสำรวจพื้นที่ที่นกบินมารวมกลุ่มกัน จากนั้นทำการติดตั้งอุปกรณ์ท่อส่งตาข่าย ในการเลือกพื้นที่สำหรับติดตั้งอุปกรณ์จะเลือกพื้นที่ที่นกมาอาศัยพักอยู่เป็นจำนวนมาก พร้อมติดตั้งชุดท่อส่งตาข่ายโดยขุดหลุมเพื่อฝังท่อส่งตาข่าย และพลางอุปกรณ์ให้กลมกลืนกับพื้นที่เพื่อให้นกผิดสังเกตน้อยที่สุด ไล่นกด้านหน้าตาข่าย เมื่อนกเข้ามาในพื้นที่จับที่ตั้งตาข่ายไว้และนกทุกตัวอยู่ในระยะปลอดภัย จึงดำเนินการยิงตาข่ายเพื่อจับนก และรีบเก็บนกอย่างปลอดภัย แสดงดังรูปที่ 4.2 A-B ในช่วงฤดูทำรังวางไข่ของนกตีนเทียนระหว่างเดือนเมษายนถึงเดือนมิถุนายน นกตีนเทียนจะฟักไข่อยู่ที่รัง ดังนั้นจึงดักจับด้วยวิธี spring trap บริเวณรังของนก แสดงดังรูปที่ 4.2 C-D ซึ่งวิธีการนี้เจ้าหน้าที่จากสถานีวิจัยสัตว์ป่าบึงบอระเพ็ดดัดแปลงโดยใช้อุปกรณ์ดักจับสัตว์ทั่วไป คือใช้เหล็กรูปครึ่งวงกลมจำนวน 2 ชิ้น เชื่อมต่อด้านปลายของครึ่งวงกลมด้วยสปริง และยึดตาข่ายกับครึ่งวงกลม ครึ่งวงกลมชิ้นแรกวางติดกับพื้น มีเชือกติดอยู่ตรงกลางของครึ่งวงกลม ใช้ในการทับครึ่งวงกลมชิ้นที่สอง และมีเชือกรูปตัว T ติดที่ด้านปลายทั้งสองข้างของครึ่งวงกลมชิ้นแรก ด้านหัวของรูปหัวของตัว T ทับปลายของเหล็กที่ติดกับครึ่งวงกลมชิ้นแรก ด้านหางของตัว T วางพาดกึ่งกลางของรังนก และยึดปลายเชือกด้วยเหล็กที่ปักลงกับพื้น เมื่อนกเข้ามานั่งฟักไข่ เชือกจะเลื่อนต่ำลง ทำให้เหล็กที่ทับครึ่งวงกลมทั้ง 2 ชิ้นดีดออก และทำให้ครึ่งวงกลมชิ้นที่สองดีดครอบบริเวณรังนก และจากการดักจับตัวอย่างนกตีนเทียนบริเวณเขตห้ามล่าสัตว์ป่าบึงบอระเพ็ด จังหวัดนครสวรรค์ ภายใต้การทำงานของหัวหน้าและเจ้าหน้าที่สถานีวิจัยสัตว์ป่าบึงบอระเพ็ด กลุ่มงานวิจัยสัตว์ป่า กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม สามารถเก็บตัวอย่างได้ทั้งหมดจำนวน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

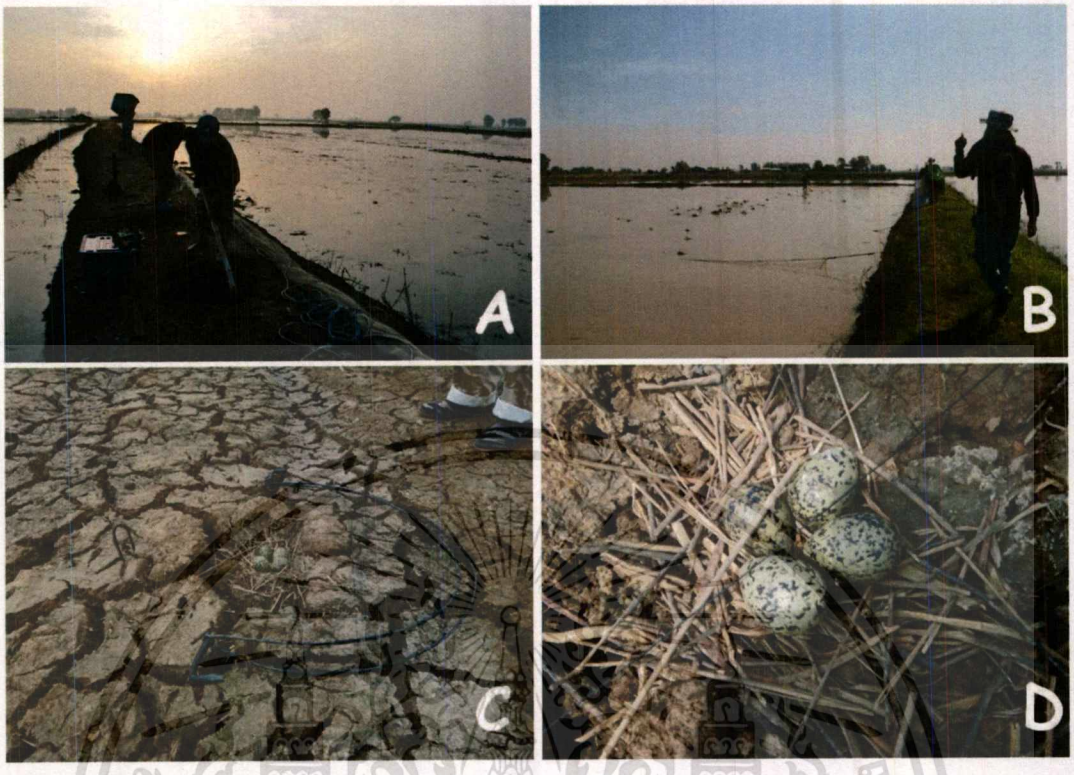
116 ตัวอย่าง แบ่งเป็นช่วงฤดูอพยพในเดือนธันวาคม 2557 จำนวน 103 ตัวอย่าง และช่วงฤดูทำรังวางไข่ในเดือนเมษายน 2558 จำนวน 13 ตัวอย่าง

หลังการเก็บข้อมูลชีวสัณฐานของนก บันทึกและถ่ายภาพสีบริเวณกระหม่อมและท้ายทอย และใส่เครื่องหมายติดตามตัวแล้ว จะจดบันทึกรหัสห่วงขานกและเก็บตัวอย่างเพื่อใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ โดยการเก็บตัวอย่างจะให้นกได้รับการบาดเจ็บน้อยที่สุด โดยจะทำความสะอาดด้วยแอลกอฮอลล์ และเจาะเลือดที่บริเวณส่วนปลายนิ้วเท้าหรือหน้าแข้งด้วยเข็มเบอร์ 26 จากนั้นใช้กระดาษ FTA ซับหรือป้ายที่หยดเลือดเพื่อเก็บตัวอย่าง หรือเก็บเลือดด้วย haematocrit tube และห้ามเลือด ในกรณีเก็บตัวอย่างในช่วงนกอพยพอาจใช้เนื้อเยื่อจากปลอกขน โดยไม่ต้องเจาะเลือด ซึ่งการเก็บตัวอย่างรูปแบบนี้จะรวดเร็วและทำให้นกบาดเจ็บน้อยที่สุด แต่ใช้ได้เฉพาะในฤดูอพยพที่นกผลัดขนเท่านั้น ขั้นตอนการเก็บตัวอย่างเลือดนกแสดงดังรูปที่ 4.3 A-D และเก็บตัวอย่างไว้ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร กรณีเป็นกระดาษ FTA ให้เปิดฝาทิ้งไว้ให้ตัวอย่างแห้งก่อน และหลังจากเลือดหยุดไหล ทำการปล่อยนกกลับคืนสู่ธรรมชาติในบริเวณเดียวกับที่ดักจับ นำหลอดตัวอย่างเก็บไว้ในกล่องที่มีซิลิกาเจลป้องกันความชื้น ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อนำไปในขั้นตอนต่อไป โดยการเก็บตัวอย่างจะให้รหัสชื่อตัวอย่างที่เก็บได้ในฤดูการอพยพจะใช้รหัสขึ้นต้น HHm และฤดูกาลทำรังวางไข่ใช้รหัส HHH

รูปที่ 4.1 แสดงลักษณะนกตีนเทียน (A) การอยู่รวมกันเป็นฝูงช่วงฤดูอพยพ (B) การพบนกตามพื้นที่ชุ่มน้ำช่วงฤดูทำรังวางไข่ (C) ลักษณะนกตีนเทียน *H. himantopus* (D) ลักษณะของสีบริเวณกระหม่อมและท้ายทอย

ที่มา : ถ่ายภาพโดยเจ้าหน้าที่สถานีวิจัยสัตว์ป่าบึงบอระเพ็ด

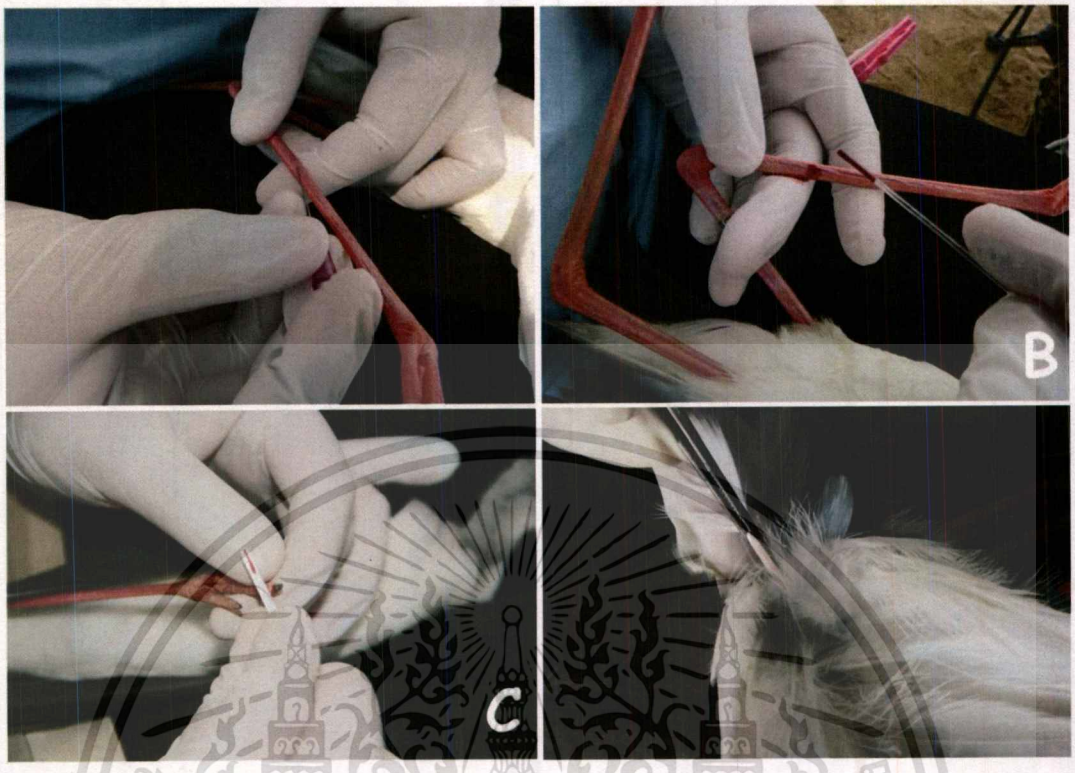
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.2 แสดงวิธีและขั้นตอนการดักจับนกตีนเทียน (A) การติดตั้งตาข่ายดักจับนกด้วยวิธีท่อส่งตาข่าย (cannon net) ในช่วงฤดูอพยพ (B) การเก็บตัวอย่างหลังการยิงท่อส่งตาข่าย (C) การวางอุปกรณ์ดักจับด้วยวิธี spring trap บริเวณรังของนกในช่วงฤดูทำรังวางไข่ (D) ตำแหน่งของเชือกที่ติดอยู่ตรงกลางของครึ่งวงกลมและวางพาดกึ่งกลางของรัง

ที่มา : ถ่ายภาพโดยเจ้าหน้าที่สถานีวิจัยสัตว์ป่าบึงบอระเพ็ด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



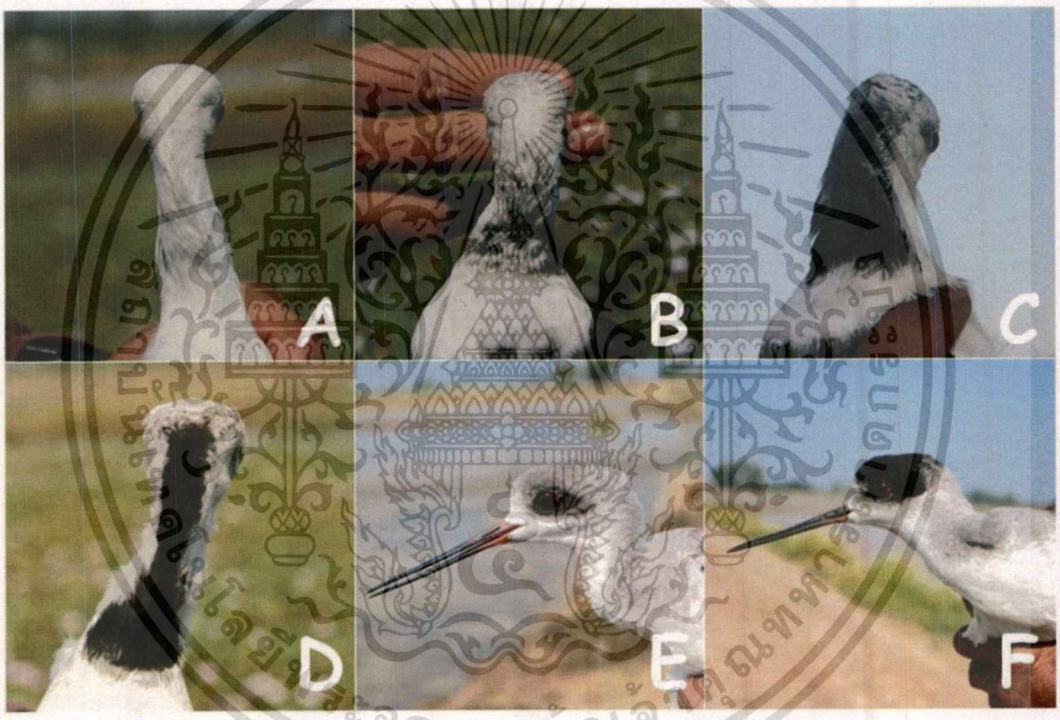
รูปที่ 4.3 แสดงขั้นตอนการเก็บตัวอย่างเพื่อใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ (A) การใช้เข็มเจาะเส้นเลือดบริเวณหน้าแข็ง (B) การเก็บตัวอย่างเลือดด้วย haematocrit tube (C) การใช้กระดาษ FTA ซับหรือป้ายที่หยดเลือดบริเวณนิ้วเท้า (D) การเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อบริเวณปลอกขน

ที่มา : ถ่ายภาพโดยเจ้าหน้าที่สถานีวิจัยสัตว์ป่าบึงบอระเพ็ด

จากการเก็บตัวอย่างนกตีนเทียนทั้งหมด พบว่านกมีลักษณะสีขนบริเวณกระหม่อมและท้ายทอยที่แตกต่างกัน สามารถแบ่งกลุ่มตามสีขนบริเวณกระหม่อมและท้ายทอยของตัวอย่างนกตีนเทียนออกเป็น 6 ลักษณะ คือ (ก) กระหม่อมและท้ายทอยสีขาว (รูปที่ 4.4 A) (ข) กระหม่อมและท้ายทอยสีขาว ปลายขนสีดำ (รูปที่ 4.4 B) (ค) กระหม่อมสีขาวและท้ายทอยสีเทา หรือดำอ่อนๆ (รูปที่ 4.4 C) (ง) กระหม่อมสีขาวและท้ายทอยสีดำเข้ม (รูปที่ 4.4 D) (จ) กระหม่อมและท้ายทอยสีเทา (รูปที่ 4.4 E) และ (ฉ) กระหม่อมและท้ายทอยสีเทา บริเวณขอบตาสีเทาเข้ม (รูปที่ 4.4 F) ซึ่งนกที่จับได้ในช่วงฤดูทำรังวางไข่จะพบเพียงลักษณะกระหม่อมสีขาวและท้ายทอยสีขาวถึงท้ายทอยสีดำเข้ม หรือลักษณะ ก-ง เท่านั้น และจะมีลักษณะบริเวณโคนปากเป็นสีดำ แต่ในในฤดูอพยพจะพบลักษณะต่างๆ ทั้ง 6 ลักษณะ และจะพบสีบริเวณโคนปากทั้งสีดำและชมพู (รูปที่ 4.4 E-F) จากลักษณะข้างต้นสันนิษฐานว่านกที่มีโคนปากสีชมพูเป็นนกที่โตไม่เต็มวัย (juvenile) จึงไม่พบในช่วงฤดูทำรังวางไข่ เนื่องจากในการศึกษาครั้งนี้ดักจับเฉพาะนกที่โตเต็มวัย (adult) จากบริเวณรังเท่านั้น รวมทั้งตัวอย่างนกในฤดูอพยพมีทั้งนกที่โตไม่เต็มวัยและนกที่โตเต็มวัยแล้ว ซึ่งความหลากหลายของสีขนบริเวณ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระหม่อมและท้ายทอยของตัวอย่างนกตีนเทียนในการวิจัยครั้งนี้สอดคล้องกับรายงานของ Xeira (1987) ซึ่งพบความผันแปรของสีบริเวณกระหม่อมและท้ายทอยของนกตีนเทียนในประเทศโปรตุเกส และรายงานวิจัยของ Parasharya และคณะ (2010) ซึ่งสำรวจนกตีนเทียนในประเทศอินเดีย ที่พบว่าในช่วงฤดูหนาวหรือฤดูอพยพ (เดือนธันวาคมถึงมกราคม) สีขนบริเวณกระหม่อมจะมีหลากหลายรูปแบบ โดยเฉพาะสีดำ ในขณะที่ในช่วงฤดูร้อนหรือฤดูทำรังวางไข่ (เดือนเมษายนถึงมิถุนายน) ไม่พบสีดำบริเวณกระหม่อมและท้ายทอย ซึ่งมีความเป็นไปได้อยู่ 2 ประการ คือ นกที่มีกระหม่อมและท้ายทอยเป็นสีดำที่พบเฉพาะในฤดูหนาวนั้นเป็นนกอพยพมาจากที่อื่น หรือสีดำบริเวณกระหม่อมและท้ายทอยของนกจะจางหายไปในช่วงฤดูทำรังวางไข่



รูปที่ 4.4 แสดงลักษณะสีขนบริเวณกระหม่อม และท้ายทอยของนกตีนเทียน ซึ่งแบ่งออกเป็น 6 ลักษณะ คือ (A) กระหม่อมและท้ายทอยสีขาว (B) กระหม่อมและท้ายทอยสีขาว ปลายขนสีดำ (C) กระหม่อมสีขาวและท้ายทอยสีดำอ่อน (D) กระหม่อมสีขาวและท้ายทอยสีดำเข้ม (E) กระหม่อมและท้ายทอยสีเทา (F) กระหม่อมและท้ายทอยสีเทา บริเวณขอบตาสีเทาเข้ม
ที่มา : ถ่ายภาพโดยเจ้าหน้าที่สถานีวิจัยสัตว์ป่าบึงบอระเพ็ด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 การระบุเพศนกตีนเทียน

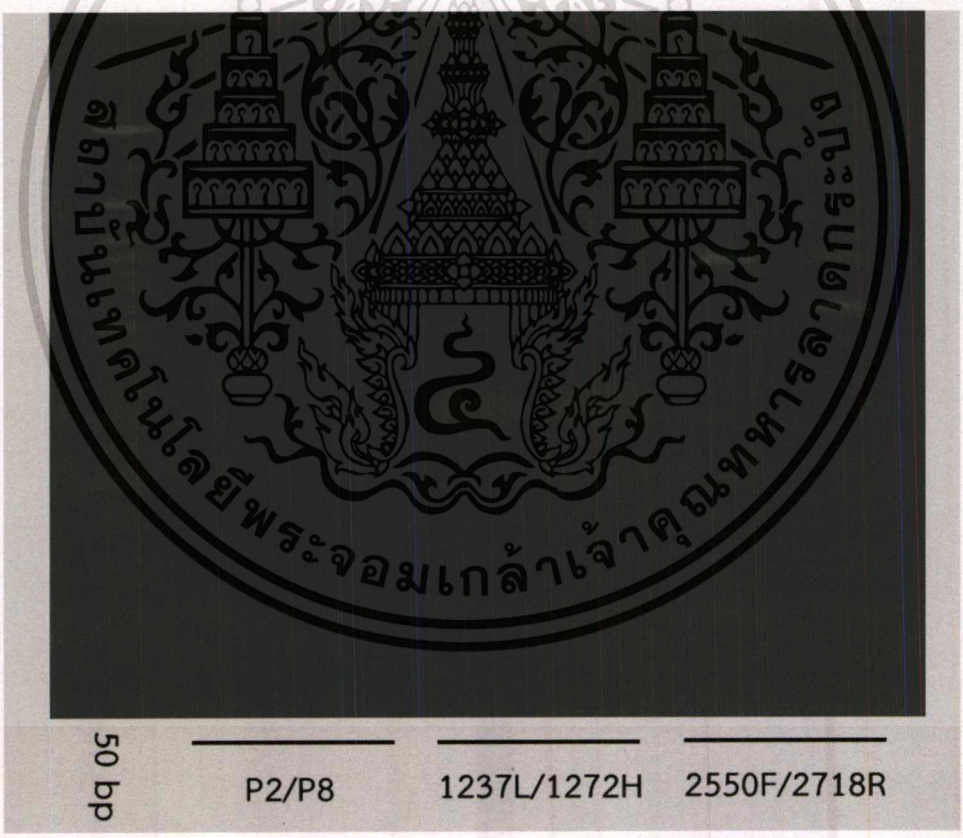
4.2.1 ไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการระบุเพศนกตีนเทียน

นกตีนเทียนเป็นนกประเภท sexually monomorphic ซึ่งไม่สามารถระบุเพศได้จากลักษณะภายนอก จึงนำเทคนิคระดับโมเลกุลมาใช้ในการระบุเพศนก ซึ่งยีนที่นิยมนำมาใช้ในการระบุเพศนกคือยีน *Chromo-helicase DNA binding protein* (*CHD*) ซึ่งเป็นยีนบนโครโมโซมเพศ ในขั้นตอนแรกของการทดลอง จะสุ่มเลือกตัวอย่างนกตีนเทียนจำนวน 2 ตัวอย่าง เพื่อนำมาทดสอบหาไพรเมอร์ที่เหมาะสมมากที่สุดในการระบุเพศ โดยเลือกใช้ไพรเมอร์จำนวน 3 คู่ ได้แก่ไพรเมอร์ P2/P8 (Griffith และคณะ, 1998) ไพรเมอร์ 1237L/1272H (Kahn และคณะ, 1998) และไพรเมอร์ 2550F/2718R (Fridolfsson และ Ellegren, 1999) ซึ่งเป็นไพรเมอร์ universal เมื่อนำผลผลิตพีซีอาร์ไปวิเคราะห์ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสโดยใช้เจลอะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์ ดังรูปที่ 4.5 เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 50 คู่เบส (ช่องที่ 1) พบว่าไพรเมอร์ P2/P8 สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้และมีขนาดชิ้นดีเอ็นเอประมาณ 400 คู่เบส แต่ให้แถบเพียงแถบเดียว (ช่องที่ 2-3) แต่อย่างไรก็ตามขนาดของนก 2 ตัวมีขนาดที่แตกต่างกันเล็กน้อย จึงอาจกล่าวได้ว่าไพรเมอร์ P2/P8 ไม่เหมาะสมในการนำมาใช้ระบุเพศนกตีนเทียน เช่นเดียวกับไพรเมอร์ 1237L/1272H ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน *CHD* ได้ แต่ไม่สามารถระบุเพศนกตีนเทียนได้ เนื่องจากให้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 300 คู่เบส เพียงชิ้นเดียว (ช่องที่ 4-5) ในขณะที่ไพรเมอร์ 2550F/2718R สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน *CHD* และให้แถบชัดเจน รวมทั้งให้ขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกันชัดเจน โดยนกเพศผู้จะเกิดชิ้นดีเอ็นเอ 1 แถบ จากอัลลีล *CHD-Z* นกเพศเมียเกิดชิ้นดีเอ็นเอ 2 แถบจากอัลลีล *CHD-Z* และ *CHD-W* ซึ่งพบว่าไพรเมอร์ 2550F/2718R จะเกิด 1 แถบของอัลลีล *CHD-Z* ขนาดประมาณ 650 คู่เบส ซึ่งจะแปลผลเป็นนกเพศผู้ และพบ 2 แถบของอัลลีล *CHD-Z* และอัลลีล *CHD-W* ขนาดประมาณ 650 และ 500 คู่เบส ซึ่งจะแปลผลเป็นนกเพศเมีย ดังแสดงในช่องที่ 6 และ 7 ตามลำดับ

ไพรเมอร์ 2550F/2718R ให้อัลลีล *CHD-Z* ที่มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอ 650 คู่เบส และอัลลีล *CHD-W* มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอ 500 คู่เบส ความแตกต่างของชิ้นดีเอ็นเอของอัลลีล *CHD-Z* และ *CHD-W* เท่ากับ 150 คู่เบส และขนาดชิ้นดีเอ็นเออัลลีล *CHD-Z* มีขนาดยาวกว่าอัลลีล *CHD-W* ซึ่งไพรเมอร์ 2550F/2718R เหมาะสมในการระบุเพศนกตีนเทียน เนื่องจากสามารถแยกความแตกต่างของนกเพศผู้และเพศเมียได้ ซึ่งสอดคล้องกับ Wakisaka และคณะ (2006) ที่ศึกษานกกระแตหัวสีเทา (*Vanellus cinereus*) ซึ่งเป็นนกสกุลใกล้กันกับนกตีนเทียนที่ระบุเพศโดยใช้ไพรเมอร์ 2550F/2718R พบว่านกเพศผู้เกิด 1 แถบ ขนาดชิ้นดีเอ็นเอ 600 คู่เบส (*CHD-Z*) เพศเมียเกิด 2 แถบ ขนาดชิ้นดีเอ็นเอ 600 และ 450 คู่เบส (*CHD-Z* และ *CHD-W*) ซึ่งอัลลีล *CHD-Z* และ *CHD-W* มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอแตกต่างกันประมาณ 150 คู่เบส รวมทั้งนกในสกุลหัวโตจำนวน 3 สปีชีส์ คือ หัวโตทรายเล็ก (*Charadrius mongolus*) หัวโตทรายใหญ่ (*C. leschenaultii*) และหัวโตขาดำ (*C. alexandrinus*) ซึ่งเป็นนกในอันดับ Charadriiformes ได้เช่นกัน โดยอัลลีล *CHD-Z* และอัลลีล *CHD-W* มีชิ้นดีเอ็นเอ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขนาด 650 คู่เบส และ 450 คู่เบส ตามลำดับ (ณิชาภัทร และคณะ, 2013) เช่นเดียวกับ Cheng และคณะ (2006) ที่ระบุเพศนกปากช้อนหน้าดำ (*Platalea minor*) ซึ่งเป็นนกน้ำประจำถิ่นของเอเชีย ด้วยไพรเมอร์ 2550F/2718R พบว่าอัลลีล *CHD-Z* มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอ 600 คู่เบส และอัลลีล *CHD-W* มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอ 450 คู่เบส ซึ่งมีความแตกต่างของชิ้นดีเอ็นเอประมาณ 150 คู่เบส เช่นกัน นอกจากนั้นแล้วจากการทดลองพบว่าไพรเมอร์ 2550F/2178R สามารถแยกความแตกต่างระหว่างเพศผู้และเพศเมียได้ชัดเจนมากกว่าการใช้ไพรเมอร์ P2/P8 ให้ผลสอดคล้องกับงานวิจัยของ Vucicevic และคณะ (2012) ที่ศึกษาจากตัวอย่างนกจำนวน 58 สปีชีส์ พบว่าไพรเมอร์ 2550F/278R สามารถระบุเพศนกได้ดีกว่าไพรเมอร์ P2/P8 โดยไพรเมอร์ 2550F/278R สามารถระบุเพศนกได้ 50 สปีชีส์ และทำให้อัลลีล *CHD-Z* และ *CHD-W* มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอแตกต่างกันอย่างชัดเจน โดยจากการระบุเพศนกได้ทั้งหมด 50 สปีชีส์ จะให้ความแตกต่างของขนาดอัลลีล *CHD-Z* และ *CHD-W* อยู่ในช่วง 150 - 250 คู่เบส ซึ่งสามารถแยกความแตกต่างชิ้นดีเอ็นเอด้วยวิธีเจลอะกาโรสอิเล็กโทรโฟรีซิส



รูปที่ 4.5 แสดงผลการวิเคราะห์ผลผลิตพีซีอาร์ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (เจลอะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์) จากการระบุเพศนกตีนเทียนด้วยไพรเมอร์ 3 คู่ ได้แก่ไพรเมอร์ P2/P8 (ช่อง 2-3) 1237L/1272H (ช่อง 4-5) และไพรเมอร์ 2550F/2718R (ช่อง 6-7) เปรียบเทียบกับ marker DNA ขนาด 50 คู่เบส (ช่อง 1)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการทดลองการระบุเพศนกด้วยไพรเมอร์ P2/P8 และไพรเมอร์ 1237L/1272H ที่ไม่สามารถให้ความแตกต่างชิ้นดีเอ็นเอระหว่างอัลลีล *CHD-Z* และ *CHD-W* ได้เมื่อตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอด้วยวิธีเจลอะกาโรสอิเล็กโทรโฟรีซิส อย่างไรก็ตามพบรายงานของ Watson และคณะ (2004) สามารถใช้ไพรเมอร์ P2/P8 ในการระบุเพศนกกินหอยปากแดง (*Haematopus ostralegus*) ที่เป็นนกในอันดับเดียวกับนกตีนเทียนได้ และพบว่าอัลลีล *CHD-Z* และอัลลีล *CHD-W* มีขนาด 380 และ 400 คู่เบส ตามลำดับ ซึ่งชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดใกล้เคียงกันมาก ต้องใช้เจลอะกาโรส 3 เปอร์เซ็นต์ในการตรวจสอบ เนื่องจากแถบมีขนาดต่างกันเพียง 20 คู่เบสเท่านั้น จากการระบุเพศด้วยไพรเมอร์ P2/P8 ซึ่งอาจจะเป็นปัญหาในการแยกความแตกต่างของขนาดชิ้นดีเอ็นเอระหว่างเพศผู้และเพศเมียด้วยวิธีเจลอะกาโรสอิเล็กโทรโฟรีซิส เมื่อ Conway และคณะ (2014) ศึกษาการแยกเพศนกหัวโตขาดำ (*C. alexandrinus*) ซึ่งเป็นนกในสกุลหัวโตเล็ก พบว่าอัลลีล *CHD-Z* และ *CHD-W* มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอแตกต่างกันไม่เกิน 15 คู่เบส ซึ่งไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างเพศผู้และเพศเมียได้ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส จึงปรับเปลี่ยนโดยใช้เจลอะคริลาไมด์ในการแยกความแตกต่างชิ้นดีเอ็นเอ และได้ประยุกต์การใช้เทคนิค Capillary electrophoresis ในการวิเคราะห์ความแตกต่างของชิ้นดีเอ็นเอได้ดียิ่งขึ้น นกบางสปีชีส์มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอของอัลลีล *CHD-Z* และ *CHD-W* ที่เท่ากัน เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธีเจลอะกาโรสอิเล็กโทรโฟรีซิส นกเพศผู้และเพศเมียจะเกิดดีเอ็นเอเพียง 1 แถบ จึงไม่สามารถระบุเพศได้ จำเป็นต้องตรวจสอบหรือแก้ไข ดังเช่นการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะเพื่อช่วยแยกความแตกต่างของชิ้นดีเอ็นเอ โดยเอนไซม์ที่นิยมใช้ได้แก่ เอนไซม์ *Hae*III ที่มีบริเวณตัดจำเพาะบนอัลลีล *CHD-Z* และเอนไซม์ *Asp700*I ที่มีบริเวณตัดจำเพาะบนอัลลีล *CHD-W* ดังเช่นงานวิจัยที่ระบุเพศนกในนกเหยี่ยวนิ้วสั้น (*Circaetus gallicus*) (Sacchi และคณะ, 2004) นกแร้งเครา (*Gypaetus barbatus*) (Garcia และคณะ, 2008) และนกแพนกวินฮัมโบลด์ (*Spheniscus humboldti*) (Costantini และคณะ, 2008) เป็นต้น

การใช้ไพรเมอร์ชนิดต่างๆในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในตำแหน่งยีน *CHD* จะให้ขนาดผลผลิตพีซีอาร์ที่แตกต่างกันนั้นขึ้นอยู่กับการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับตำแหน่งบนยีน *CHD* และความจำเพาะของไพรเมอร์ในแต่ละสปีชส์ ดังนั้นการเลือกใช้ไพรเมอร์จึงเป็นสิ่งสำคัญในการระบุเพศนก อีกหนึ่งปัจจัยที่สำคัญคือความแตกต่างขนาดชิ้นดีเอ็นเอของอัลลีล *CHD-Z* และ *CHD-W* จำเป็นต้องมีความแตกต่างกันชัดเจน เพื่อระบุเพศนกได้อย่างถูกต้อง (Wang และคณะ, 2007) การใช้ไพรเมอร์หลายชุดเพื่อป้องกันข้อผิดพลาดที่เกิดขึ้นในการระบุเพศนก ซึ่งตรงกับคำแนะนำของ Casey และคณะ (2009) ที่พบปัญหาจากการระบุเพศนก *Bartramia longicauda* โดยพบว่าอัลลีล *CHD-Z* เกิดลักษณะ polymorphisms ทำให้ผลการวิเคราะห์ผลผลิตพีซีอาร์ผิดพลาด ซึ่งโดยปกตินกเพศผู้จะเกิดชิ้นดีเอ็นเอเพียงหนึ่งขนาดและเมื่อนำมาวิเคราะห์ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส จะปรากฏเพียง 1 แถบ แต่ให้ผล 2 แถบ ในเป็นเพศเมีย แต่เนื่องจากเพศผู้เกิด heteroduplex ของอัลลีล *CHD-Z* ที่เบสบางตำแหน่งเกิดการหายไป ทำให้เพศผู้เกิดชิ้นดีเอ็นเอมากกว่าหนึ่งชิ้นส่งผลต่อการระบุเพศผิดพลาดขึ้น ดังนั้นควรมีการหาไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการระบุเพศนกในแต่ละสปีชีส์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก่อนการวิจัย เช่นการศึกษาจาก universal primers ที่สามารถนำมาใช้ในการระบุเพศนก ได้แก่ P2/P8 (Griffiths และคณะ, 1998), 1237L/1272H (Kahn และคณะ, 1998) และ 2550F/2718R (Fridolfsson และ Ellegren, 1999)

จากการส่งวิเคราะห์ลำนิวคลีโอไทด์ และนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาจัดเรียงด้วยโปรแกรม bioedit หาตำแหน่งจับของไพรเมอร์ ทำให้ทราบความยาวของชิ้นดีเอ็นเอที่แน่นอนทั้งอัลลีล *CHD-Z* และอัลลีล *CHD-W* โดยพบว่าอัลลีล *CHD-Z* มีความยาวของชิ้นดีเอ็นเอเท่ากับ 620 คู่เบส ซึ่งยกตัวอย่างจำนวน 3 ตัวอย่าง คือ HHm16, HHm42 และ HHm54 ดังรูปที่ 4.6 สำหรับอัลลีล *CHD-W* พบว่ามีความยาวของชิ้นดีเอ็นเอเท่ากับ 461 คู่เบส ซึ่งยกตัวอย่างจำนวน 2 ตัวอย่าง คือ HHH04 และ HHH12 ดังรูปที่ 4.7 ทั้งนี้พบว่าอัลลีล *CHD-Z* และอัลลีล *CHD-W* มีขนาดแตกต่างกัน 159 คู่เบส

4.2.2 ผลการระบุเพศนก

จากการทดสอบหาไพรเมอร์ที่เหมาะสมที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน *CHD* เพื่อระบุเพศนกตีนเทียน พบว่าไพรเมอร์ที่เหมาะสมที่สุด คือไพรเมอร์ 2550F/2718R ซึ่งสามารถแยกความแตกต่างของอัลลีล *CHD-Z* และอัลลีล *CHD-W* ได้อย่างชัดเจนด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส และมีขนาดชิ้นดีเอ็นเอแตกต่างกัน 159 คู่เบส เมื่อวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยเพศผู้เกิด 1 แถบของอัลลีล *CHD-Z* มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอประมาณ 620 คู่เบส และเพศเมียเกิด 2 แถบของอัลลีล *CHD-Z* และอัลลีล *CHD-W* ซึ่งมีขนาดชิ้นดีเอ็นเอประมาณ 620 และ 461 คู่เบส ตามลำดับ จากนั้นนำไพรเมอร์ 2550F/2718R ไปใช้ระบุเพศนกตีนเทียนทั้งหมด 116 ตัวอย่าง พบนกเพศผู้จำนวน 56 ตัว และเพศเมียจำนวน 59 ตัว แบ่งเป็นช่วงฤดูอพยพในเดือนธันวาคม 2557 จำนวน 103 ตัวอย่าง ระบุเป็นเพศผู้จำนวน 49 ตัว เพศเมียจำนวน 53 ตัว และไม่สามารถระบุเพศได้จำนวน 1 ตัว คิดเป็น 1 เปอร์เซ็นต์ คือตัวอย่างรหัส HHm64 ซึ่งเป็นตัวอย่างที่สกัดดีเอ็นเอมาจากเนื้อเยื่อบริเวณปลอกขน และช่วงฤดูทำรังวางไข่ในเดือนเมษายน 2558 จำนวน 13 ตัวอย่าง ระบุเป็นเพศผู้จำนวน 7 ตัว และเพศเมียจำนวน 6 ตัว ซึ่งจากการระบุเพศ พบว่าอัตราส่วนระหว่างนกเพศผู้ต่อนกเพศเมียของแต่ละฤดูมีค่าเท่ากับ 1: 1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.6 แสดงตำแหน่งจับของไพรเมอร์ 2550F/2718R บนอัลลีล *CHD-Z* ของนกตีนเทียน

รูปที่ 4.7 แสดงตำแหน่งจับของไพรเมอร์ 2550F/2718R บนอัลลีล *CHD-W* ของนกตีนเทียน

จากการแบ่งตัวอย่างนกตีนเทียนออกเป็น 6 ลักษณะตามสีบริเวณกระหม่อมและท้ายทอยในรูปที่ 4.4 นั้นจะไม่พบนกที่มีลักษณะสีบริเวณกระหม่อมและท้ายทอยสีเทา (รูปที่ 4.4 E) และกระหม่อมและท้ายทอยสีเทา บริเวณขอบตาสีเทาเข้ม (รูปที่ 4.4 F) ซึ่งมีบริเวณโคนปากเป็นสีชมพูอ่อน ในฤดูทำรังวางไข่ แต่จะพบในฤดูอพยพเท่านั้น ซึ่งเชื่อว่าเป็นนกที่ยังโตไม่เต็มวัย ส่วนนกที่พบในฤดูทำรังวางไข่ ซึ่งเป็นนกที่โตเต็มวัยแล้วจะมีปากสีดำสนิท จากการเปรียบเทียบลักษณะสีขนบริเวณกระหม่อมและท้ายทอยของนกตีนเทียน กับผลการระบุเพศในตารางที่ 4.3 พบว่าสีขนบริเวณกระหม่อมและท้ายทอยของนกตีนเทียนไม่สามารถระบุเพศได้ ซึ่งไม่สอดคล้องกับการรายงานก่อนหน้านี้ ที่กล่าวว่านกเพศผู้มีสีบริเวณกระหม่อมและท้ายทอยเป็นสีขาว และนกเพศเมียมีกระหม่อมและท้ายทอยเป็นสีเทา เนื่องจากนกตีนเทียนที่มีลักษณะสีบริเวณกระหม่อมและท้ายทอยเป็นสีขาวมีทั้งเพศผู้และเพศเมีย แต่อย่างไรก็ตามส่วนใหญ่ของนกตีนเทียนที่ลักษณะสีกระหม่อมและท้ายทอยสีเทาระบุเป็นเพศเมียมากกว่า และมีเพียงลักษณะกระหม่อมและท้ายทอยสีเทา บริเวณขอบตาสีเทาเข้มเท่านั้น ที่พบว่าส่วนใหญ่เป็นเพศผู้ ดังนั้นหากนำลักษณะภายนอกมาระบุเพศจะมีเพียงนกที่มีบริเวณขอบตาเป็นสีเทาหรือดำเข้มเท่านั้น ที่มีแนวโน้มเป็นนกเพศผู้ นอกจากนั้นแล้วพบว่านกตีนเทียนที่พบในประเทศไทยมีลักษณะกระหม่อมสีขาวและท้ายทอยสีดำเข้มมีจำนวนน้อยมาก โดยในการศึกษาครั้งนี้พบเพียง 1 ตัว ในช่วงฤดูอพยพ และระบุเป็นเพศผู้

4.2.3 ผลการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณอัลลีล *CHD-Z*

จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน *CHD* ด้วยไพรเมอร์ 2550F/2718R เพื่อระบุเพศนกตีนเทียน และลักษณะสีขนบริเวณกระหม่อมและท้ายทอยของนกที่มีความหลากหลาย จึงสนใจศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของอัลลีล *CHD-Z* เนื่องจากอัลลีล *CHD-Z* เป็นอัลลีลที่สามารถพบได้ทั้งนกเพศผู้และเพศเมีย และสามารถแบ่งนกได้ตามหลักอนุกรมวิธาน ดังรายงานของณิชาภัทร และคณะ (2013) ศึกษายีน *CHD-Z* ของนกในสกุลนกหัวโตเล็กจำนวน 3 สปีชีส์ คือหัวโตทรายเล็ก (*Charadrius mongolus*) หัวโตทรายใหญ่ (*C. leschenaultii*) และหัวโตขาดำ (*C. alexandrinus*) พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *CHD-Z* สามารถแยก *C. alexandrinus* ออกจาก *C. mongolus* และ *C. leschenaultii* ได้ เนื่องจากมีลำดับนิวคลีโอไทด์ต่างกัน 13 คู่เบส ดังนั้นจึงสนใจศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณอัลลีล *CHD-Z* ของนกตีนเทียน โดยสุ่มตัวอย่างจากสีขนบริเวณกระหม่อม และท้ายทอยของนกตีนเทียน ส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ไป blast เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank ใน NCBI พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของอัลลีล *CHD-Z* ทั้งหมดมีความใกล้เคียงกับ *CHD-Z* ของนกกินหอยปากแดง (*Haematopus ostralegus*) (AY178119.1) มากที่สุด ซึ่งเป็นนกในวงศ์เดียวกันกับนกตีนเทียน โดยมีค่า identity เท่ากับ 93 เปอร์เซ็นต์ และค่า e-value เท่ากับ 0 ข้อมูลนี้แสดงให้เห็นว่ายังไม่มีรายงานการวิจัยของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *CHD* ของนกในสกุลตีนเทียน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 แสดงผลการระบุเพศนกตีนเทียนในช่วงฤดูอพยพ ในเดือนธันวาคม ปีพุทธศักราช 2557 โดยแยกตัวอย่างนกตีนเทียนออกเป็น 6 ลักษณะ ตามลักษณะสีขนบริเวณกระหม่อมและท้ายทอย

ลำดับหลอด	ลักษณะสีขน*	เพศ*	ลำดับหลอด	ลักษณะสีขน*	เพศ*
HHm01	ฉ	เพศผู้	HHm30	จ	เพศเมีย
HHm02	จ	เพศเมีย	HHm31	จ	เพศผู้
HHm03	จ	เพศเมีย	HHm32	ฉ	เพศผู้
HHm04	จ	เพศผู้	HHm33	จ	เพศผู้
HHm05	จ	เพศผู้	HHm34	จ	เพศผู้
HHm06	จ	เพศเมีย	HHm35	จ	เพศผู้
HHm07	ข	เพศเมีย	HHm36	ข	เพศเมีย
HHm08	จ	เพศเมีย	HHm37	ฉ	เพศผู้
HHm09	ก	เพศเมีย	HHm38	จ	เพศเมีย
HHm10	จ	เพศเมีย	HHm39	จ	เพศผู้
HHm11	ข	เพศผู้	HHm40	ฉ	เพศผู้
HHm12	จ	เพศเมีย	HHm41	ก	เพศผู้
HHm13	จ	เพศเมีย	HHm42	ง	เพศผู้
HHm14	จ	เพศผู้	HHm43	ก	เพศเมีย
HHm15	จ	เพศเมีย	HHm44	ข	เพศเมีย
HHm16	ฉ	เพศผู้	HHm45	ก	เพศเมีย
HHm17	จ	เพศเมีย	HHm46	จ	เพศผู้
HHm18	ก	เพศเมีย	HHm47	ก	เพศเมีย
HHm19	จ	เพศเมีย	HHm48	ฉ	เพศผู้
HHm20	ข	เพศเมีย	HHm49	จ	เพศเมีย
HHm21	จ	เพศเมีย	HHm50	ก	เพศผู้
HHm22	ก	เพศผู้	HHm51	ข	เพศผู้
HHm23	จ	เพศเมีย	HHm52	ฉ	เพศผู้
HHm24	จ	เพศผู้	HHm53	ก	เพศผู้
HHm25	จ	เพศเมีย	HHm54	ก	เพศผู้
HHm26	จ	เพศเมีย	HHm55	จ	เพศเมีย
HHm27	จ	เพศผู้	HHm56	ข	เพศเมีย
HHm28	ระบุไม่ชัดเจน	เพศผู้	HHm57	จ	เพศเมีย
HHm29	จ	เพศผู้	HHm58	ข	เพศผู้

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

ลำดับหลอด	ลักษณะสีขน*	เพศ*	ลำดับหลอด	ลักษณะสีขน*	เพศ*
HHm59	จ	เพศเมีย	HHm82	ฉ	เพศผู้
HHm60	ก	เพศผู้	HHm83	จ	เพศเมีย
HHm61	ฉ	เพศผู้	HHm84	ค	เพศเมีย
HHm62	จ	เพศเมีย	HHm85	ฉ	เพศผู้
HHm63	ฉ	เพศผู้	HHm86	ค	เพศผู้
HHm64	จ	ไม่สามารถระบุเพศได้	HHm87	จ	เพศเมีย
HHm65	จ	เพศเมีย	HHm88	จ	เพศเมีย
HHm66	จ	เพศเมีย	HHm89	ค	เพศผู้
HHm67	ค	เพศเมีย	HHm90	ฉ	เพศผู้
HHm68	จ	เพศเมีย	HHm91	จ	เพศเมีย
HHm69	จ	เพศเมีย	HHm92	จ	เพศผู้
HHm70	จ	เพศผู้	HHm93	จ	เพศเมีย
HHm71	จ	เพศเมีย	HHm94	จ	เพศเมีย
HHm72	ข	เพศผู้	HHm95	จ	เพศผู้
HHm73	จ	เพศเมีย	HHm96	จ	เพศเมีย
HHm74	จ	เพศเมีย	HHm97	จ	เพศเมีย
HHm75	ก	เพศเมีย	HHm98	จ	เพศเมีย
HHm76	จ	เพศเมีย	HHm99	จ	เพศผู้
HHm77	ฉ	เพศผู้	HHm100	จ	เพศผู้
HHm78	ฉ	เพศผู้	HHm101	จ	เพศเมีย
HHm79	ฉ	เพศผู้	HHm102	จ	เพศผู้
HHm80	ฉ	เพศผู้	HHm103	จ	เพศเมีย
HHm81	ฉ	เพศผู้			

*หมายเหตุ: ก: กระหม่อมและท้ายทอยสีขาว ข: กระหม่อมและท้ายทอยสีขาว ปลายขนสีดำ
ค: กระหม่อมสีขาวและท้ายทอยสีดำอ่อน ง: กระหม่อมสีขาวและท้ายทอยสีดำเข้ม
จ: กระหม่อมและท้ายทอยสีเทา ฉ: กระหม่อมและท้ายทอยสีเทา บริเวณขอบตาสีเทาเข้ม
โดยระบุลักษณะสีกระหม่อมและท้ายทอยไม่ชัดเจน 1 ตัวอย่าง และไม่สามารถระบุเพศ
ได้จำนวน 1 ตัวอย่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 แสดงผลการระบุเพศนกตีนเทียนในช่วงฤดูอพยพ ในเดือนเมษายน ปีพุทธศักราช 2558 โดยแยกตัวอย่างนกตีนเทียนออกเป็น 3 ลักษณะ ตามลักษณะสีขนบริเวณกระหม่อมและท้ายทอย

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

*หมายเหตุ: ก: กระหม่อมและท้ายทอยสีขาว ข: กระหม่อมและท้ายทอยสีขาว ปลายขนสีดำ
ค: กระหม่อมสีขาวและท้ายทอยสีดำอ่อน ง: กระหม่อมสีขาวและท้ายทอยสีดำเข้ม
จ: กระหม่อมและท้ายทอยสีเทา ฉ: กระหม่อมและท้ายทอยสีเทา บริเวณขอบตาสีเทาเข้ม

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

ฤดูกาล	ลักษณะสีขนบริเวณกระหม่อมและท้ายทอย (เพศผู้ : เพศเมีย)						รวม
	ก	ข	ค	ง	จ	ฉ	
อพยพ 2557	6 : 6	4 : 5	2 : 2	1 : 0	18 : 39	17 : 1	48 : 53
ประจำถิ่น 2558	5 : 4	2 : 0	0 : 2	-	-	-	7 : 6

*หมายเหตุ: ก: กระหม่อมและท้ายทอยสีขาว ข: กระหม่อมและท้ายทอยสีขาว ปลายขนสีดำ
ค: กระหม่อมสีขาวและท้ายทอยสีดำอ่อน ง: กระหม่อมสีขาวและท้ายทอยสีดำเข้ม
จ: กระหม่อมและท้ายทอยสีเทา ฉ: กระหม่อมและท้ายทอยสีเทา บริเวณขอบตาสีเทาเข้ม
และจำนวนตัวอย่างในฤดูอพยพมีจำนวน 101 ตัวอย่าง เนื่องจากระบุลักษณะสีกระหม่อมและท้ายทอยไม่ชัดเจน 1 ตัวอย่าง และไม่สามารถระบุเพศได้จำนวน 1 ตัวอย่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ผลการระบุสปีชีส์นกตีนเทียนด้วยยีน *COI*

การนำยีน *COI* มาใช้ในการระบุสปีชีส์ พบว่ามีการศึกษายีนนี้ในนกหลายชนิด เช่น การศึกษานก 260 สปีชีส์ ที่พบว่าทำรังวางไข่ในทวีปอเมริกาเหนือ สามารถจำแนกความแตกต่างแต่ละสปีชีส์ได้ นอกจากนี้ยังสามารถจำแนกความแตกต่างของสปีชีส์ที่ใกล้เคียงกันได้ด้วย (Herbert และคณะ, 2004) จึงสนใจใช้ยีน *COI* ในการระบุสปีชีส์ของนกตีนเทียนที่ดักจับจากบริเวณเขตห้ามล่าสัตว์ป่าบึงบอระเพ็ด จังหวัดนครสวรรค์ โดยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์บริเวณยีน *COI* ด้วยไพรเมอร์ BirdF1/BirdR3 ที่อุณหภูมิ annealing เท่ากับ 60 องศาเซลเซียส จากการตรวจสอบขนาดด้วยวิธีเจลอะกาโรสอิเล็กโทรโฟรีซิสได้ผลผลิตพีซีอาร์ที่มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอประมาณ 1,000 คู่เบส เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่ามีขนาดชิ้นดีเอ็นเอเท่ากับ 1,059 คู่เบส และเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank จาก NCBI พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *COI* ของตัวอย่างนกตีนเทียนมีความใกล้เคียงกับ *Himantopus himantopus* (JF498780, AB843544, EU525416 และ EU525417) มากที่สุด โดยมีค่า identity เท่ากับ 99 เปอร์เซ็นต์ และมีความใกล้เคียงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของนกในสกุลตีนเทียน ดังแสดงในตารางที่ 4.4 ได้แก่ *Himantopus himantopus leucocephalus* (EU525419 และ EU525421) *Himantopus himantopus melanurus* (EU525423 และ FJ027650) รวมถึง *Himantopus mexicanus* (AY666255 และ JN801726) ซึ่งมีค่า identity เท่ากับ 98 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังมีนกในวงศ์เดียวกันคือ *Recurvirostra americana* (EU525493) และ *R. andina* (EU525495) มีค่า identity เท่ากับ 93 และ 92 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

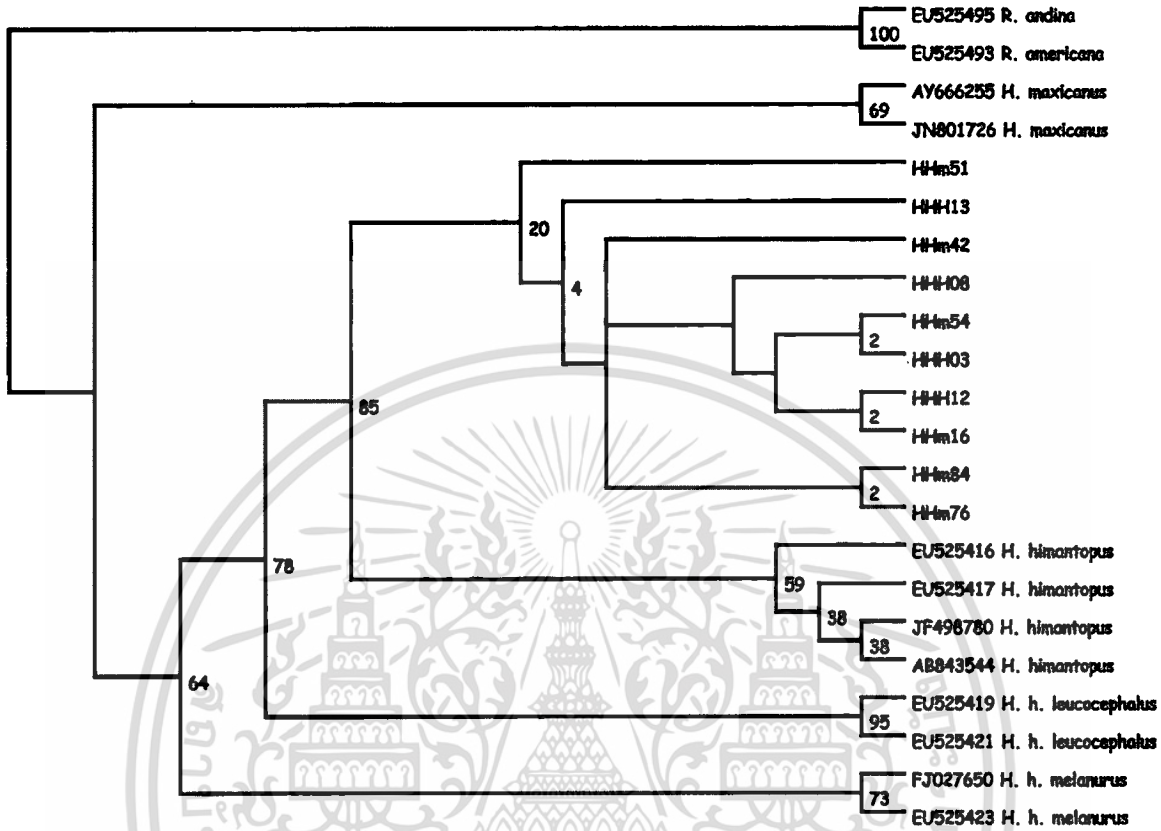
จากนั้นนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างนกตีนเทียนทั้ง 10 ตัวอย่าง และลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากฐานข้อมูล GenBank ใน NCBI ดังตารางที่ 4.4 มาศึกษาหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยการสร้าง phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม Phylip โดยใช้พารามิเตอร์แบบ neighbor-joining และโมเดลของ Kimura 2-parameter ระบุค่า bootstraping เท่ากับ 1000 พบว่าตัวอย่างนกตีนเทียนในการศึกษาครั้งนี้ทั้งนกที่ดักจับในฤดูอพยพ และทำรังวางไข่จัดอยู่ในกลุ่ม *H. himantopus* อย่างไรก็ตามมีความแตกต่างกันกับตัวอย่าง *H. himantopus* (JF498780, AB843544, EU525416 และ EU525417) อื่นๆ อาจเนื่องจากแหล่งที่ต่างกัน โดยเป็นตัวอย่างจากอิรัก ญี่ปุ่น นามิเบีย และแอฟริกาใต้ ตามลำดับ และเมื่อพิจารณาจากแผนภูมิ พบว่าสามารถแยกออกเป็น 5 กลุ่ม ดังรูปที่ 4.8 ตามสปีชีส์ของนกในสกุลตีนเทียน คือ (1) *Himantopus himantopus* (2) *H. himantopus leucocephalus* (3) *H. himantopus melanurus* (4) *H. mexicanus* และ (5) นกในสกุล *Recurvirostra* ที่ประกอบด้วย *R. americana* และ *R. andina* ซึ่งเป็นนกที่อยู่ในวงศ์เดียวกับสกุลตีนเทียน (genus *Himantopus*) จึงอาจกล่าวได้ว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *COI* สามารถจำแนกสปีชีส์ของนกในสกุลตีนเทียนออกจากกันได้ ซึ่งสอดคล้องกับการจัดจำแนกนกในสกุลตีนเทียนออกเป็น 5 สปีชีส์ ที่เพิ่ม *H. novaezelandiae* ที่มีขนสีดำอีกหนึ่งสปีชีส์ โดยยังไม่มีรายงานลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน *COI* ของ *H. novaezelandiae* จากฐานข้อมูล GenBank

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 แสดงสปีชีส์ accession number ค่า identity และสถานที่ที่เก็บตัวอย่างของนกตีนเทียนพบในฐานข้อมูล GenBank ใน NCBI

สปีชีส์	Accession number	ค่า identity	ประเทศ
Himantopus himantopus	JF498780	99%	อิรัก
Himantopus himantopus	AB843544	99%	ญี่ปุ่น
Himantopus himantopus	EU525416	99%	นามิเบีย
Himantopus himantopus	EU525417	99%	แอฟริกาใต้
Himantopus himantopus leucocephalus	EU525419	98%	ออสเตรเลีย
Himantopus himantopus leucocephalus	EU525421	98%	นิวซีแลนด์
Himantopus himantopus melanurus	EU525423	98%	บราซิล
Himantopus himantopus melanurus	FJ027650	98%	อาร์เจนตินา
Himantopus mexicanus	AY666255	98%	สหรัฐอเมริกา
Himantopus mexicanus	JN801726	98%	บราซิล
Recurvirostra americana	EU525493	93%	แคนาดา
Recurvirostra andina	EU525495	92%	ชิลี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.8 แสดง phylogenetic tree จากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *COI* ของนกในสกุลตีนเทียน โดยใช้พารามิเตอร์แบบ neighbor-joining และโมเดลของ Kimura 2-parameter โดยให้มีค่า bootstaping เท่ากับ 1000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ

ในประเทศไทยนกตีนเทียน (black-winged stilt: *Himantopus himantopus*) มีสถานะเป็นทั้งนกอพยพ และนกประจำถิ่นหรือมีการทำรังวางไข่ ซึ่งจะพบความหลากหลายของสีบริเวณกระหม่อมและท้ายทอย โดยนกตีนเทียนเป็นนกประเภท sexually monomorphic ซึ่งไม่สามารถระบุเพศได้จากลักษณะภายนอก แต่เชื่อว่าตัวผู้จะมีบริเวณกระหม่อมและท้ายทอยเป็นสีขาว และตัวเมียมีสีเทา จึงมีวัตถุประสงค์ระบุเพศของนกตีนเทียนด้วยเทคนิคระดับโมเลกุลและศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกตีนเทียน โดยดักจับนกจากบริเวณเขตห้ามล่าสัตว์ป่าบึงบอระเพ็ด จังหวัดนครสวรรค์ ทั้งช่วงฤดูอพยพและฤดูทำรังวางไข่ โดยในฤดูอพยพดักจับด้วยวิธีท่อส่งตาข่าย (cannon net) และในช่วงฤดูทำรังวางไข่ดักจับด้วยวิธี spring trap จากนั้นระบุเพศนกด้วยยีน *chromo-helicase DNA binding protein* (*CHD* gene) ซึ่งเป็นยีนบนโครโมโซมเพศ ด้วยไพรเมอร์ 2550F/2718R ที่สามารถระบุเพศได้ดีที่สุด เนื่องจากให้ขนาดอัลลีล *CHD-Z* และ *CHD-W* ที่มีขนาดแตกต่างกัน 159 คู่เบส ทำให้แยกความแตกต่างชิ้นดีเอ็นเอของนกเพศผู้และเพศเมียได้อย่างชัดเจน พบนกเพศผู้จำนวน 56 ตัว และเพศเมียจำนวน 59 ตัว แบ่งเป็นช่วงฤดูอพยพในเดือนธันวาคม 2557 จำนวน 103 ตัว ระบุเป็นเพศผู้จำนวน 49 ตัว เพศเมียจำนวน 53 ตัว และไม่สามารถระบุเพศได้จำนวน 1 ตัว และช่วงฤดูทำรังวางไข่ในเดือนเมษายน 2558 จำนวน 13 ตัว ระบุเป็นเพศผู้จำนวน 7 ตัว และเพศเมียจำนวน 6 ตัว ซึ่งจากการระบุเพศ พบว่าอัตราส่วนระหว่างนกเพศผู้ต่อนกเพศเมียของแต่ละฤดูมีค่าเท่ากับ 1: 1 โดยสีขนบริเวณกระหม่อมและท้ายทอยของนกไม่สัมพันธ์กับเพศ จึงควรมีการศึกษายีนบริเวณอื่นที่มีความเกี่ยวข้องกับลักษณะการแสดงออกของสีขนต่อไป

จากการสังเกตพบความหลากหลายของสีขนบริเวณกระหม่อมและท้ายทอยของนกตีนเทียน สามารถแบ่งตัวอย่างนกออกเป็น 6 ลักษณะตามสีขนบริเวณกระหม่อมและท้ายทอย และเมื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *cytochrome c oxidase I* (*COI*) และนำไปหาความสัมพันธ์กับสปีชีส์อื่นๆในสกุลนกตีนเทียน พบว่าตัวอย่างนกตีนเทียนที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ทั้งที่ดักจับในฤดูอพยพ และทำรังวางไข่จัดอยู่ใน *H. himantopus* ทั้งหมด แต่มีความแตกต่างกับตัวอย่าง *H. himantopus* อื่นๆ จากฐานข้อมูล GenBank และเมื่อพิจารณาจากแผนภูมิอาจกล่าวได้ว่าลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *COI* สามารถจำแนกสปีชีส์ของนกในสกุลตีนเทียนออกจากกันได้ ทั้งนี้ควรมีการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิคระดับโมเลกุลอื่นๆ ต่อไป เช่น AFLP และ next-generation sequencing (NGS) เป็นต้น รวมทั้งควรยืนยันจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนบริเวณอื่นร่วมด้วย เช่น *cytochrome b oxidase* และ control region เป็นต้น และจากการศึกษาวิจัยในครั้งนี้สามารถระบุเพศและระบุสปีชีส์ของนกตีนเทียนในประเทศไทยได้ สามารถนำไปเป็นฐานข้อมูลด้านประชากรนกตีนเทียนในประเทศไทยต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

ไกรรัตน์ เอี่ยมอำไพ. 2545. ความหลากชนิด ถิ่นที่อยู่อาศัย และการสร้างรังวางไข่ของนกในบึงบอระเพ็ด. หน้า 187-212. ในผลงานวิจัย และรายงานความก้าวหน้างานวิจัย ประจำปี 2544. ฝ่ายการพิมพ์ ส่วนผลิตสื่อสำนักสารนิเทศ กรมป่าไม้. กรุงเทพฯ.

ไกรรัตน์ เอี่ยมอำไพ. 2549. การทำรังวางไข่ของนกน้ำในพื้นที่ชุ่มน้ำบึงบอระเพ็ด. หน้า 91- 110 ในผลงานวิจัย และรายงานความก้าวหน้างานวิจัย ประจำปี 2548. กลุ่มงานวิจัยสัตว์ป่า สำนักอนุรักษ์สัตว์ป่า กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธ์พืช. กรุงเทพฯ

ฑิฐิ สอนสา สมชาย นิ่มนวล ไกรรัตน์ เอี่ยมอำไพ ตวงรัตน์ โพธิ์เที่ยง กุลทิดา อิทธิพร และมงคล โมรา. 2554. การจับนกชายเลนติดเครื่องหมายเพื่อศึกษาเส้นทางการอพย โดยการใช้เทคนิคท่อส่งตาข่าย (Cannon netting) บริเวณพื้นที่ปากแม่น้ำท่าจีน จังหวัดสมุทรสาคร. ผลงานวิจัยและรายงานความก้าวหน้างานวิจัยประจำปีประจำปี 2553. กรุงเทพฯ: กลุ่มงานวิจัยสัตว์ป่า สำนักอนุรักษ์สัตว์ป่า กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช. 125-135.

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

โดม ประทุมทอง. Birds study เรียนรู้เรื่องนก. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์กรีนแมคพาย. 2552.

สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม ณิชาภัทร ชอบอาภรณ์ ตฤณเศรษฐ์ วีระพันธุ์ นาถสุดา พุทธารักษ์ และอนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม. 2012. การระบุเพศในนกแก้วบางชนิด. Thai Journal of Genetics. 5: 94-202.

โอภาส ขอบเขตต์. 2541. นกในบึงบอระเพ็ด. สำนักงานนโยบายและแผนสิ่งแวดล้อม. กรุงเทพฯ. 215 น.

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

Baker, A.J., Pereira, S.L. and Paton, T.A. 2007. Phylogenetic relationships and divergence times of Charadriiformes genera: multigene evidence for the Cretaceous origin of at least 14 clades of shorebirds. Biology Letter. 3: 205-209.

Baker, A.J., Yatsenko, Y. and Tavares, E.S. 2012. Eight independent nuclear genes support monophyly of the plovers: the role of mutational variance in gene trees. Molecular Phylogenetics and Evolution. 65: 631-641.

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

monomorphic endangered *Ara* birds. Journal of Experimental Zoology. 292: 677-680.

Brumfield R.T. 2010. Speciation genetics of biological invasions with hybridization. Molecular Ecology. 19: 5079-5083.

Casey, A.E., Jones, K.L., Sandercock, B.K. and Wisely S.M. 2009. Heteroduplex molecules cause sexing errors in a standard molecular protocol for avian sexing. Molecular Ecology Resources. 9: 61-65.

Cerit, H. and Avanus, K. 2007. Sex identification in avian species using DNA typing methods. World's Poultry Science Journal. 63: 91-99.

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

Christidis, L. and Boles, W.E. 2008. Systematics and taxonomy of Australian birds. CSIRO Publishing, Collingwood, Australia. 277 p.

Conway, W.C., Wickliffe, J.K., Hoffmann, F.G., Baker, R.J. and Smith, L.M. 2004. An improved PCR based method for gender identification in birds. Occasional papers museum of Texas Tech university.

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

Elkington, S.P. and Maloney, R.F. 2000. Age- and sex-related differences in head feather patterns of black stilts (*Himantopus novaezelandiae*). Notornis, 47: 127-130.

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 B: Biological Sciences. 263: 1635-1641.

Ericson, P.G.P., Envall, I., Irestedt, M. and Norman, J.A. 2003. Inter-familial relationships of the shorebirds (Aves: Charadriiformes) based on nuclear DNA sequence data. BMC Evolutionary Biology. 3: 1-14.

Fain, M.G. and Houde, P. 2007. Multilocus perspectives on the monophyly and phylogeny of the order Charadriiformes (Aves). BMC Evolutionary Biology. 7: 1-15.

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.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Garcia, C.B., Insausti, J.A., Gil, J.A., Frutos, A.D., Alcantara, M., Gonzalez, J., Cortes, M.R., Bonafonte, J.I.B. and Arruga, M.V. 2008. Comparison of different procedures of DNA analysis for sex identification in the endangered bearded vulture (*Gypaetus barbatus*). European Journal of Wildlife Research. 55: 309-312.

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

Griffiths, R. and Korn, R.M. 1997. A *CHD*1 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.

Gutie'rrez-Corchero, F., Arruga, M.V., Sanz, L., Garc'ia, C., Herna'ndez, M.A. and Campos, F. 2002. Using FTA® cards to store avian blood samples for genetic studies. Their application in sex determination. Molecular Ecology Notes: 75–77.

Hagen, E.N., Hale, M.L., Maloney, R.F. and Steeves, T.E. 2011. Conservation genetic management of a critically endangered New Zealand endemic bird: minimizing inbreeding in the Black Stilt *Himantopus novaezelandiae*. Ibis. 153: 556 - 561.

Harvey, M.G., Bonter, D.N., Stenzler, L.M. and Lovette, I.J. 2006. A comparison of plucked feathers versus blood samples as DNA sources for molecular sexing. Journal of field ornithology. 77: 136–140.

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

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

Jensen, T., Pernasetti, F.M., and Durrant, B. 2003. Conditions for rapid sex determination in 47 avian species by PCR of genomic DNA from blood, shell-membrane blood vessels and feathers. Zoo Biology. 22: 561-571.

Kahn, N.W.; St. John, J. 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.

Kocijan I., Dolenec P., Inko T., Nenadic, D.D., Pavokovic G. and Dolennec Z. 2011. Sex-typing bird species with little or no sexual dimorphism: an evaluation of

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

molecular and morphological sexing. Journal of Biological Research-Hessaloniki. 15: 145-150.

Mayr, G. 2011. The phylogeny of charadriiform birds (shorebirds and allies) - reassessing the conflict between morphology and molecules. Zoological Journal of the Linnean Society. 161: 916-934.

Millar, C.D., Reed, C.E.M., Halverson, J.L. and Lambert, D.M. 1997. Captive management and molecular sexing of endangered avian species: an application to the black stilt *Himantopus novaezelandiae* and hybrids. Biological Conservation. 82: 81-86.

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.

Paton, T.A., Baker, A.J., Groth, J.G. and Barrowclough, G.F. 2003. RAG-1 sequences resolve phylogenetic relationships within Charadriiform birds. Molecular Phylogenetics and Evolution. 29: 268-278.

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

Robertson, B.C., Minot, E.O. and Lambert, D.M. 1999. Molecular sexing of individual kakapo, *Strigops habroptilus* Aves, from faeces. Mol Ecol 8: 1349–1350.

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

Sibley, C.G. and Ahlquist, J.E. 1990. Phylogeny and classification of birds: a study in molecular evolution. Yale University Press, New Haven.

Smith, L.M. and Burgoyne, L.A. 2004. Collecting, archiving and processing DNA from wildlife samples using FTA databasing paper. BMC Ecology. 4: 1-11.

Steeves, T.E., Hale, M.L. and Gemmell, N.J. 2008. Development of polymorphic microsatellite markers for the New Zealand black stilt (*Himantopus novaezelandiae*) and cross-amplification in the pied stilt (*Himantopus himantopus leucocephalus*). Molecular Ecology Resources. 8: 1105-1107.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

Vucicevic, M. Pavlovic, M.S. Stevanovic, J. Bosnjak, J. Gajic, B. Aleksic, N. and Stanimirovic, Z. 2012. Sex determination in 58 bird species and evaluation of *CHD* gene as a universal molecular marker in bird sexing. *Zoo biology*. 00: 1-3.

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

Wallis, G. 1999. Genetic status of New Zealand black stilt (*Himantopus novaezelandiae*) and impact of hybridisation. Conservation Advisory Science Notes No. 239, Department of Conservation, Wellington. 1-22.

Wang, L.C., Chen, C.T., Lee H.Y., Li, S.H., 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.E.A. le V. dit. 2004. Sexing Eurasian Oystercatchers *Haematopus ostralegus* from breast feathers collected when ringing. *Wader Study Group Bull*. 105 : 87-89.

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Journal of Agricultural Technology 2015 Vol. 11(2): 307-314
Available online http://www.ijat-aatsea.com
ISSN 1686-9141

Gender identification of *Himantopus himantopus* using PCR-based method

Siripong, Wiparat[1], Supattra Poeaim[1*], Krairat Eiamampai[2] and Dusit Atittayawan[3]

[1] Department of Biology, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL), Ladkrabang, Bangkok, 10520, Thailand.
[2] Wildlife Research Division, Wildlife Conservation Office, Department of National Parks, Wildlife and Plant Conservation, Chatuchak, Bangkok, 10900, Thailand.
[3]Wildlife Conservation Division, Protected Area Administration Office Region 12, Department of National Parks, Wildlife and Plant Conservation, Amphoe Muang, Nakhon Sawan, 60000, Thailand.

Siripong, Wiparat, Supattra Poeaim, Krairat Eiamampai and Dusit Atittayawan (2015). Gender identification of *Himantopus himantopus* using PCR-based method. Journal of Agricultural Technology Vol. 11(2): 307-314

The black-winged stilt (*Himantopus himantopus*: Recurvirostridae) has a wide distribution in nature. In Thailand, there are residents and migratory birds. The adult birds have very long pink legs and black wings. Crown and hindneck patterns vary from white to dusky-grey. In general, the gender can be identified by crown and hindneck color, white in female and black in male. However, in breeding season (April - June) of resident bird at Bung Boraphet where the largest freshwater swamp in central Thailand, most of their crown and hindneck are white. So, this species are not clearly sexually dimorphic and the color of their crown and hindneck are not directly correlated with sex. In this work, a molecular approach was used to assess differences in coloration of feathers in relation to gender. DNA was amplified from the *chromo-helicase-DNA-binding* (*CHD*) gene that located on both Z (*CHD-Z*) and W (*CHD-W*) chromosomes. Using FTA®card and genomic DNA which extracted from a small volume of blood samples were used in this experiment. The resulting PCR products from 2550F/2718R primer showed fragments on a conventional agarose gel electrophoresis with size differences ranging from 150 bp between the two ZW alleles. Males were identified by the presence of a single band about 650 bp (*CHD-Z*) and females were identified by the presence of a second additional fragment length of approximately 500 bp (*CHD-W*). For the resident bird included 32 white and 2 black head, female: male were 18 :16 which 2 black heads are male. On the other hand, the migratory bird included 32 white head, 12 black hindneck, 43 grey head and 5 grey crown. The migratory bird includes 37 female and 46 male. Our results showed clear evidence for a sex- related decrease in the color on the heads of black-winged stilt.

Keywords: *Himantopus himantopus* ,sex identification, *chromo-helicase-DNA binding* (*CHD*) gene

* Corresponding author: email: poeaim@hotmail.com

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Introduction

The black-winged stilt (*Himantopus himantopus*: Recurvirostridae) has a wide distribution in nature. The adult birds have white body, needle-like blackish bill, black wings and very long pinkish-red legs. According to gender, black-winged stilt can be identified by crown and hindneck pattern color. Male are typically all white and sometimes can have some variable grey or black while female are browner and may show grey and black (Lekagul and Round, 1991). Brumfield (2010) stated that this species is usually name based on its crown and hindneck patterns and colors. For example, the white-headed stilt/ pied stilt (*Himantopus leucocephalus*) which reside in Australia but also found in Borneo, Java and the Philippines.

In Thailand, black-winged stilt were divided into 2 groups (1) resident birds: non-migratory populations and (2) migratory (visitor) birds. There are listed as protected animal according to Wildlife Preservation and Protection Act B.E. 2535 (1992). The migratory birds migrate to Thailand during November and January. They mostly are found in swamp and wetlands where food resources are available such as Bung Boraphet; the largest freshwater swamp in central Thailand. The resident birds are also resided and breed in the wetland area. The breeding season of resident birds generally starts from April to June. However, the morphological of resident birds are mostly white crown and hindneck pattern from observation. Therefore, this species are not clear sexual dimorphism and the pattern color of crown and hindneck are not directly correlated with their gender. The gender are an important understanding behavior, social structure, breeding system, mechanisms and patterns of migration and estimating extinction risk.

The birds used traditional methods for sex identification (Cerit and Avanus, 2006; Morinha *et al.*, 2012) such as sexually dimorphism, acoustic sexing, laparoscopy, cloacal examination, steroid sexing and cytogenetic analysis. These methods are slow, expensive and harmful in some cases. So, the molecular techniques for birds sexing were developed. Most species of birds can be identified based on *CHD* gene; *chromo-helicase-DNA-binding* located on sex chromosomes (Griffith *et al.*, 1998). Male birds are homogametic sex which has two Z sex chromosomes. On the other hand, female birds are heterogametic sex and have Z and W sex chromosomes that containing *CHD-Z* and *CHD-W*, respectively (Watson *et al.*, 2004). Nowadays, molecular technique is a more reliable method for identifying the sex of birds which are monomorphic. However, this technique has not been in black-winged stilt. Therefore, the main aims of this research are to assess differences in coloration

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

of feathers in relation to gender of black-winged stilt. Including, examining genetics relationship of crown and hindneck colors and its species by using molecular technique.

Materials and methods

Sample collection

Thirty-four adult black-winged stilts were trapped by spring trapping method during breeding season (April-June) and ninety-two of migratory birds were trapped by cannon netting method during migration season (November-January) at Bueng Boraphet, Thailand. After being trapped, the bird measurements were made such as: wing, bill, head, tar, tail, weight and fat content. Secondly a small volume of blood sample was collected onto FTA®card (GE Healthcare, UK) by a puncture from the toe vein of the birds. Then photograph of the birds were taken especially their crown and hindneck pattern color. After all these processes the birds were released back to nature.

Purification of DNA onto FTA® Card

Blood samples in FTA®card were punched on dried blood sample (approximately 2 mm diameter). Place each disc in a PCR amplification tube and washed two times with 125 µl FTA Purification Reagent (GE Healthcare, UK). Each time the sample was mixed by pipetting up and down several times and incubates at 65°C for 10 min after which the liquid was removed. After that, 125 µl of 0.1 mM TE buffer was added and incubated at room temperature for 10 minutes. TE buffer was discarded and repeated the TE buffer step again. Finally the disk in PCR tube was dried at 65 °C for 10 minutes.

PCR amplification and sequencing

For gender identification, the PCR reactions were used 3 primer sets, including P2/P8 primers (Griffiths *et al.,* 1998), 1237L/1272H primers)Kahn *et al.,* 1998 (and 2550F/2718R primers)Fridolfsson and Ellegren, 1999(. Amplification was performed in 25 µl total volume that contained 12.5 µl of 2X *Taq* Master mix (Vivantis), 1 µl of 20 µM from each primer set and 10.5 µl of nuclease free water. The conditions for PCR amplification conditions were a initial denaturing step at 95 °C for 5 min, 35 cycles of 95 °C for 45 sec, 50 °C for 45 sec, and 72 °C for 45 sec, and final extension at 72 °C for 5 min. PCR products were electrophoresed through 1.5% agarose gel in 1X TBE buffer comparing with 50 base pairs DNA ladder (Vivantis) and stained with ethidium

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

bromide. Then, PCR products were purified by GF-1 AmbiClean Kit (Gel & PCR) from Vivantis. In addition, PCR products were sequenced by 1st BASE (Malaysia). Sequences were edited and analyzed by Bioedit and MEGA 6.

Results and discussion

Three primer sets (including P2/P8, 1237L/1272H and 2550F/2718R) were used for gender identification of *CHD* gene of black-winged stilt. The results were shown that P2/P8 primers are not specific for this bird and 1237L/1272H primers could not identify the gender (Fig.1). Nevertheless, 2550F/2718R primers were shown clearly different between male and female birds by fragments on a conventional agarose gel electrophoresis. The size differences ranged from 150 base pairs between the two ZW alleles. Fridolfsson and Ellegren (1999) show that the resulting PCR products from 2550F/2718R primers showed fragments on a conventional agarose gel electrophoresis with size differences ranging from 150 base pairs between *CHD-Z* and *CHD-W* allele. Male birds amplified a single band of approximately 650 base pairs. However, female birds amplified two bands 500 base pairs (*CHD-W*) and 650 base pairs (*CHD-Z*). Therefore, 2550F/2718R primers were used to identify the gender with all samples. Vucicevic *et al.* (2012) reported that the use of 2550F/2718R primers also gave good results in 50 species; most of them are in the same class as black-winged stilt. At the same time, P2/P8 primers were successful used for sexing in Eurasian Oystercatchers (*Haematopus ostralegus*) which is in Charadriiformes as same as black-winged stilt (Watson *et al.*, 2004). In these studies, the female chicken (*Gallus gallus domesticus*) was used as a positive control (Fig. 2: the last lane). However, some samples (7.1%) could not amplify (Fig. 2: lane 2-3). This failure may be from FTA®card purification step. In order to ensure success, FTA®card should be washed away all cell debris.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

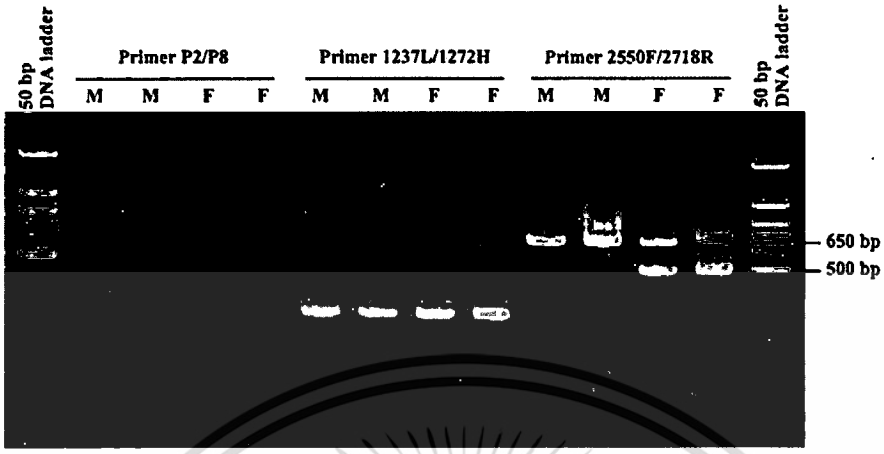


Fig.1 Gender identification of black-winged stilt using 3 primer sets were separated on 1.5% agarose gel. The first and last lane is 50 base pairs DNA ladder. Lane 2-5: samples were amplified by using P2/P8 primers. Lane 6-9: samples were amplified by using 1237L/1272H primers. Lane 10-12: samples were amplified by using 2550F/2718R primers

Fig. 2 DNA samples were extracted from FTA®card and were amplified by using 2550F/2718R primers. The first lane is 50 base pair DNA ladder, with black-winged stilt samples in lane 2 onwards. Samples with single bane are male and those with two bands are female. The last lane is female chicken which shows two bands pattern as positive control

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Table 1. Gender identification of black-winged stilts comparing with their crown/hindneck pattern colors during breeding and migratory season

Season	Crown/hindneck pattern color	Number of sample			Totals	
		Male	Female	Unknown		
Breeding	White	16	16	-	32	
	Black	2	-	-	2	
	Totals	18	16	-	-	34
Migratory	White	14	16	2	32	
	Black	5	6	1	12	
	Grey	22	15	6	43	
	Grey crown	5	-	-	5	
	Totals	46	37	9	-	92

The adult resident and migratory birds were separated into 2 and 4 patterns, respectively (Fig. 3). In breeding season of resident birds, there are white crown/hindneck and black hindneck pattern colors. However, there are (1) white crown/hindneck, (2) black hindneck, (3) grey crown/hindneck and (4) dusky-grey crown in migration season. From 126 samples, resident birds show that female: male were 18 :16 which 2 black hindneck are male. On the other hand, migratory birds were 37 female and 46 male (Table 1). Our results showed clear evidence for a sex- related decrease in the color on the heads of black-winged stilt.

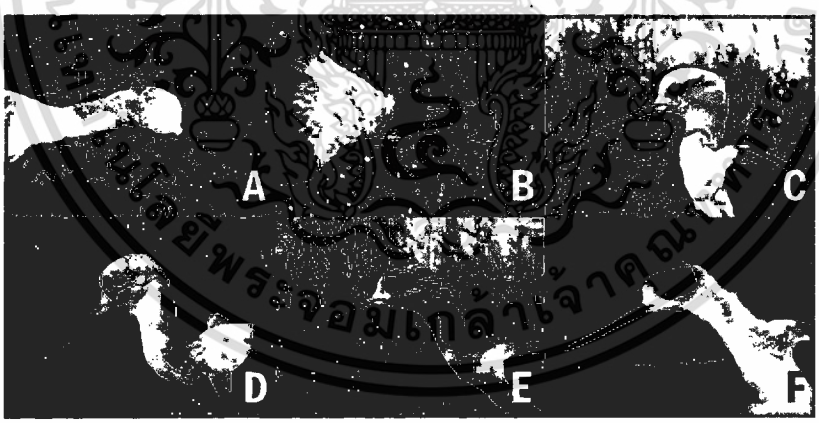


Fig. 3 The resident birds (A-B) and migratory birds (C-F) were separated by the crown and hindneck pattern color. A: white crown/hindneck, B: black hindneck, C: white crown/hindneck, D: black hindneck, E: grey crown/hindneck and F: dusky-grey crown

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

In addition, PCR products from 2550F/2718R primers were analyzed by comparing *CHD-Z* allele from 9 resident and 12 migratory birds (Fig. 4). About 554 base pairs nucleotide sequence were shown 2 regions of single nucleotide polymorphism. The black column on left side presents a transversion mutation which involves exchange of purine (A) and pyrimidine (G). On the other hand, the black column on right side presents a transition mutation which involves bases of purine (A) and purine (T). This result corresponds to Faux *et al.* (2014) which stated that the conserved regions between *CHD-Z* and *CHD-W* of Southern Ocean seabirds contain some base changes.

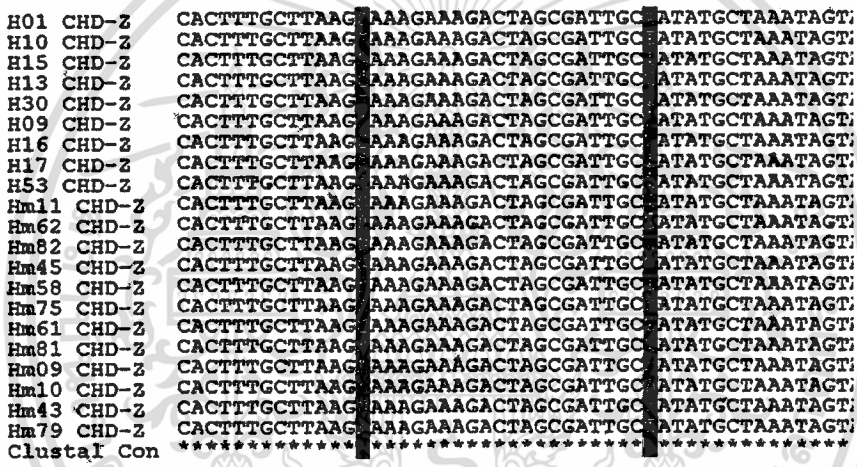


Fig. 4 Two regions of single nucleotide polymorphism on sequence of *CHD-Z* allele from 9 resident (H) and 12 migratory birds (Hm)

Conclusion

From 126 samples of black-winged stilt, the PCR of *CHD* gene could be detected 93% of samples for gender identification. Also, the use of FTA®card is successfully to this study and less harmful to the birds. However, the results of the *CHD* were compared with the gender assigned to each bird by crown and hindneck pattern colors, it confirmed that the gender could not be identify by the colors alone. In the future, it would be better if DNA analysis and the

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

biometrics of the birds to be used to compare. Additional, another gene and molecular techniques such as RAPD, SRAP and iPBS are interested for future research studies.

Acknowledgements

We gratefully acknowledge Bueng Boraphet Wildlife Research Station team for sample collection and helpful general discussion. Sampling was conducted according to the permit guidelines issued (5610309) by Department of National Parks, Wildlife and Plant Conservation, Thailand.

References

Brumfield, R.T. (2010). Speciation genetics of biological invasions with hybridization. *Molecular Ecology*. 19: 5079-5083.

Cerit, H. and Avanus, K. (2006). Sex identification in avian species using DNA typing methods. *World's Poultry Science Journal*. 63: 91-99.

Faux, C.E., McInnes, J.C. 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*. 20: 116-121.

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

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.

Lekagul, B. and Round, P.D. (1991). A Guide to the Birds of Thailand. Saha Karn Bhaet Co., Ltd., Bangkok. 457 pp.

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.

Vucicevic, M., Pavlovic, M.S., Stevanovic, J., Bosnjak, J., Gajic, B., Aleksic, N. and Stanimirovic, Z. (2012). Sex determination in 58 bird species and evalution of CHD gene as a universal molecular marker in bird sexing. *Zoo Biology*. 00: 1-13.

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้