

การระบุเพศและการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม  
ของนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่นด้วยเทคนิคระดับโมเลกุล

SEX IDENTIFICATION AND DIVERSITY OF  
*Acrocephalus orientalis* BY MOLECULAR TECHNIQUE



โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร  
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)  
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2560

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานภายในห้องปฏิบัติการ ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

SEX IDENTIFICATION AND DIVERSITY OF  
*Acrocephalus orientalis* BY MOLECULAR TECHNIQUE



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

ACADEMIC YEAR 2017



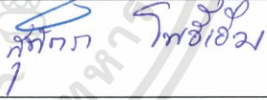
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**โครงการพิเศษ** การระบุเพศและการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม  
 ของนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่นด้วยเทคนิคระดับโมเลกุล  
*Sex identification and diversity of Acrocephalus orientalis*  
 by molecular technique

**ชื่อนักศึกษา** นางสาวอัญพร สุธรรมพงษ์ รหัสนักศึกษา 57050701  
 นางสาวพัชรี จันทรเนตร รหัสนักศึกษา 57050736  
 นางสาวภัสสร ลาโสภี รหัสนักศึกษา 57050746

**ปริญญา** วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)  
**ภาควิชา** ชีววิทยา  
**ปีการศึกษา** 2560  
**อาจารย์ที่ปรึกษา** ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม  
**อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม** คุณไกรรัตน์ เอี่ยมอำไพ

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้  
 โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต  
 (เทคโนโลยีชีวภาพ) ประจำปีการศึกษา 2560

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.อนรรักษ์ โพธิ์เอี่ยม ประธานกรรมการ	
คุณไกรรัตน์ เอี่ยมอำไพ กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	
ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงการพิเศษ	การระบุเพศและการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่นด้วยเทคนิคระดับโมเลกุล	
ชื่อนักศึกษา	นางสาวธัญพร สุธรรมพงษ์	รหัสนักศึกษา 57050701
	นางสาวพัชรี จันทรเนตร	รหัสนักศึกษา 57050736
	นางสาวภัสสร ลาโสภี	รหัสนักศึกษา 57050746
ปริญญา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)	
ภาควิชา	ชีววิทยา	
คณะ	วิทยาศาสตร์	
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)	
ปีการศึกษา	2560	
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม	
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	คุณไกรรัตน์	เอี่ยมอำไพ

### บทคัดย่อ

นกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น (*Acrocephalus orientalis*) จัดเป็นนกในกลุ่ม Sexually monomorphic ซึ่งเพศผู้และเพศเมียมีลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกที่เหมือนกัน จากรายงานการวิจัยก่อนหน้านี้พบว่า การใช้น้ำหนักควบคู่กับความยาวปีก สามารถระบุเพศได้โดยให้ค่าความผิดพลาดที่ร้อยละ 10.10 ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการระบุเพศจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาเปรียบเทียบกับการระบุเพศด้วยเทคนิคระดับโมเลกุล โดยเก็บตัวอย่างนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่นทั้งหมด 76 ตัว จากบริเวณเขตห้ามล่าสัตว์ป่าบึงบอระเพ็ด จังหวัดนครสวรรค์ นำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) ที่ตำแหน่งยีน *Chomo-Helicase-DNA binding (CHD)* ด้วยไพรเมอร์ P2/P8 สามารถระบุเพศได้ 73 ตัวอย่าง โดยเป็นเพศผู้จำนวน 17 ตัว เพศเมียจำนวน 56 ตัว และไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้จำนวน 3 ตัวอย่าง และนำมาหาความสัมพันธ์กับลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยวิเคราะห์น้ำหนักควบคู่กับความยาวปีก พบว่าให้ค่าความผิดพลาดที่ร้อยละ 10.96 และในการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *A. orientalis* จาก 4 สถานที่ จำนวน 30 ตัวอย่าง ด้วยเครื่องหมายทางโมเลกุล inter Primer Binding Site (iPBS) โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 5 ไพรเมอร์ (2242, 2251, 2252, 2253 และ 2402) เมื่อนำมาสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ ด้วยวิธี UPGMA ที่ค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.60 สามารถแบ่งกลุ่มตัวอย่างได้ 2 กลุ่ม โดยมีความสัมพันธ์กับสถานที่เก็บตัวอย่าง ซึ่งแบ่งกลุ่มกันอย่างชัดเจนระหว่างกลุ่มตัวอย่างที่เก็บจากบริเวณบนบก (หน้าวัดสโสมสร และท่าข้าวกำนันทรง) และกลุ่มตัวอย่างที่เก็บจากบริเวณบึง (แหลมตาเล็ง และเกาะตาเรือง)

**คำสำคัญ :** การระบุเพศ ความหลากหลายทางพันธุกรรม นกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น เครื่องหมายโมเลกุล iPBS

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Sex identification and diversity of <i>Acrocephalus orientalis</i> by molecular technique		
Student	Miss Thanyaporn Suthamphong	Student ID 57050701	
	Miss Patcharee Jannate	Student ID 57050736	
	Miss Phatsorn Lasopee	Student ID 57050746	
Degree	Bachelor of Science (Biotechnology)		
Department	Biology		
Faculty	Science		
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)		
Academic Year	2017		
Advisor	Asst.Prof.Dr.Supattra Poeaim		
Co-advisor	Mr. Krairat Eiamampai		

### Abstract

*Acrocephalus orientalis* is a one of the sexually monomorphic birds that males and females have similar morphological characteristics. From previous research, combination with weight and wing length measurement can be used to identify gender which error rate was 10.10%. So, the purpose of this study examined the relations among weight, wing length and gender which base on molecular technique for sex identification. A total of 76 blood samples of *A. orientalis* were collected from Bung Boraphet Non- hunting Area, Nakhon Sawan Province. DNA was isolated and the amplification of the *Chromo-Helicase-DNA binding (CHD)* by polymerase chain reaction (PCR) with P2/P8 primers. In the same way, the resulting combination of weight and wing length measurement can be used to identify gender with an average error rate of 10.96%. For genetic diversity analysis, inter-primer binding site (iPBS) marker was used to assess the genetic diversity among thirty of *A. orientalis* from four areas. Five of the iPBS primers (2242, 2251, 2252, 2253 and 2402 primers) from previous experiment were used to analyze. UPGMA dendrogram showing the genetic relationships among populations which divided by the land and the wetland areas.

**Keywords:** sex identification, genetic diversity, *Acrocephalus orientalis*, inter Primer Binding Site (iPBS) technique

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## คำย่อและสัญลักษณ์

คำย่อ	ความหมาย
bp	คู่เบส
CHD gene	ยีน <i>Chromo-Helicase-DNA binding</i>
CHD-W	ยีน CHD ที่อยู่บนโครโมโซม W
CHD-Z	ยีน CHD ที่อยู่บนโครโมโซม Z
iPBS	เครื่องหมายทางโมเลกุล inter Primer Binding Site Technique
kb	กิโลเบส
LTR	Long Terminal Repeat
M	โมลาร์
ml	มิลลิลิตร
mM	มิลลิโมลาร์
ng	นาโนกรัม
NP	รหัสตัวอย่างของนกฟงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น
PCR	polymerase chain reaction
Pmole	พิโคโมล
Ta	Optimal Annealing Temperature
μl	ไมโครลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## กิตติกรรมประกาศ

โครงการพิเศษหัวข้อเรื่องการระบุเพศและการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่นด้วยเทคนิคระดับโมเลกุลประสบความสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี เนื่องจากได้รับความช่วยเหลือจากบุคคลที่มีพระคุณดังต่อไปนี้

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการพิเศษ ที่มีความกรุณาเสียสละเวลาที่มีค่าในการให้ความรู้ คำปรึกษา คำแนะนำตลอดจนชี้แนะแนวทางการแก้ไขปัญหา รวมทั้งตรวจทานทำให้โครงการพิเศษเล่มนี้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม ประธานกรรมการ ที่ช่วยให้คำแนะนำและแก้ไขโครงการพิเศษเล่มนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณ คุณไกรรัตน์ เอี่ยมอำไพ หัวหน้าสถานีวิจัยสัตว์ป่าบึงบอระเพ็ด จังหวัดนครสวรรค์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการพิเศษร่วม รวมทั้งเจ้าหน้าที่ของสถานีวิจัยสัตว์ป่าบึงบอระเพ็ดทุกท่านที่คอยให้ความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างและให้ความรู้ คำแนะนำเกี่ยวกับนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่นเป็นอย่างดี

ขอขอบพระคุณ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาชีววิทยา ที่อำนวยความสะดวกในด้านอุปกรณ์เครื่องมือทางวิทยาศาสตร์ ขอขอบคุณเพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ ทุกคนที่ให้กำลังใจ ให้คำปรึกษาและคอยให้ความช่วยเหลือตลอดการทำโครงการพิเศษ

สุดท้ายนี้คณะผู้จัดทำขอขอบพระคุณ บิดา มารดา และบุคคลในครอบครัวที่สนับสนุนและให้กำลังใจตลอดการทำโครงการพิเศษครั้งนี้จนสามารถสำเร็จได้อย่างที่คาดหวังไว้ หากโครงการพิเศษเล่มนี้มีความผิดพลาดประการใดทางคณะผู้จัดทำกราบขออภัยมา ณ ที่นี้ด้วย

ธันยพร สุธรรมพงษ์  
พัชรี จันทร์เนตร  
ภัสสร ลาโสภี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ข
คำย่อและสัญลักษณ์.....	ค
กิตติกรรมประกาศ.....	ง
สารบัญ.....	จ
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญรูป.....	ซ
<b>บทที่ 1 บทนำ.....</b>	<b>1</b>
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการพิเศษ.....	2
1.3 ขอบเขตของโครงการพิเศษ.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
<b>บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....</b>	<b>3</b>
2.1 ลักษณะทั่วไปของนกฟงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น.....	3
2.2 การระบุเพศนก.....	4
2.2.1 การระบุเพศโดยดูจากลักษณะภายนอก.....	4
2.2.2 การระบุเพศด้วยเทคนิคระดับโมเลกุลโดยการใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่.....	5
2.3 วิธีการดักจับนก.....	6
2.4 วิธีการเก็บตัวอย่าง.....	8
2.4.1 การเก็บตัวอย่างแบบที่ไม่ก่อให้เกิดอันตรายแก่ตัวสัตว์.....	8
2.4.2 การเก็บตัวอย่างแบบที่มีการกระทำกับตัวสัตว์.....	8
2.5 การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายทางโมเลกุล inter Primer Binding Site (iPBS).....	8
<b>บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย.....</b>	<b>10</b>
3.1 ตัวอย่าง.....	10
3.2 วัสดุอุปกรณ์.....	12
3.3 สารเคมี.....	12
3.4 การสกัดดีเอ็นเอ.....	13
3.4.1 การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือดนก.....	13
3.4.2 การทำให้กระดาช FTA บริสุทธิ์.....	14
3.4.3 การระบุเพศนกด้วยเทคนิคระดับโมเลกุล.....	14
3.4.4 การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายทางโมเลกุล inter Primer Binding Site (iPBS).....	15

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

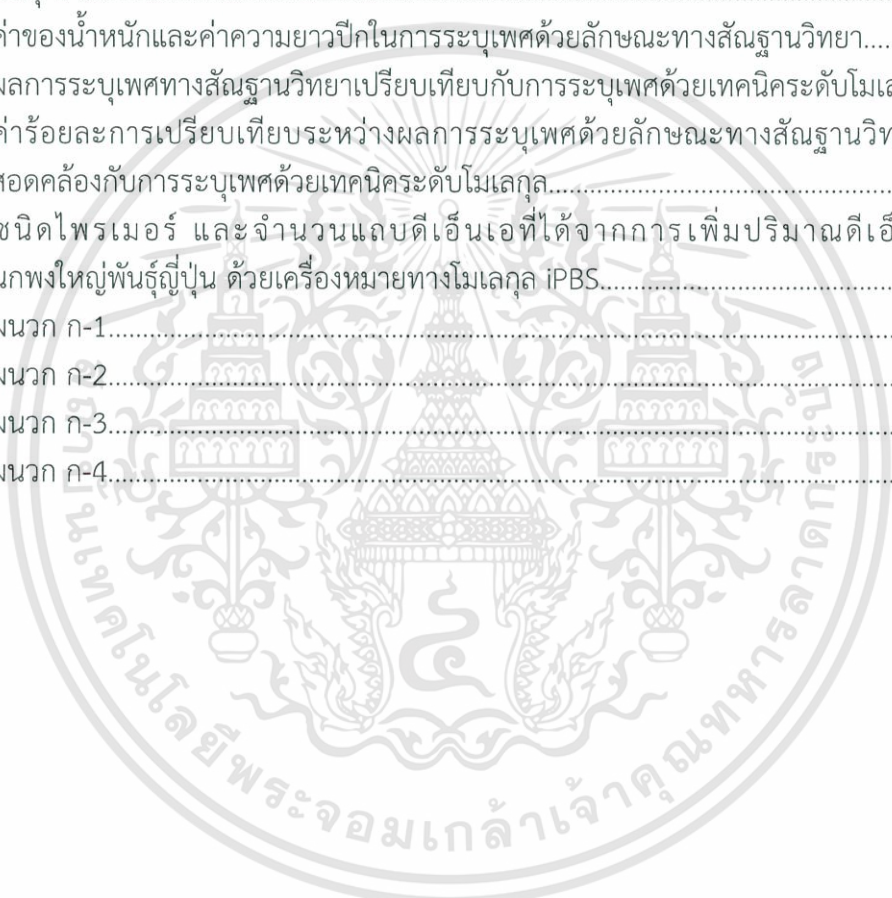
## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปราย.....	17
4.1 จำนวนตัวอย่างนกฟงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น.....	17
4.2 ผลการระบุเพศด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา.....	18
4.3 ผลการระบุเพศด้วยเทคนิคระดับโมเลกุล.....	23
4.4 ผลการระบุเพศด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาเปรียบเทียบกับการระบุเพศด้วย เทคนิคระดับโมเลกุล.....	24
4.5 ผลการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายทางโมเลกุล inter Primer Binding Site (iPBS).....	26
บทที่ 5 สรุปการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	31
5.1 สรุปผลการวิจัย.....	31
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	31
เอกสารอ้างอิง.....	32
ภาคผนวก.....	36
ภาคผนวก ก.....	37
ภาคผนวก ข.....	52
ภาคผนวก ค.....	61

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
3.1 สภาวะการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในการระบุเพศด้วยเทคนิคระดับโมเลกุล.....	14
3.2 แสดงชนิด ลำดับนิวคลีโอไทด์ และอุณหภูมิ Optimal annealing temperature ( $T_a$ ) (องศาเซลเซียส).....	15
3.3 สภาวะการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วย เครื่องหมายทางโมเลกุล iPBS.....	16
4.1 เวลา สถานที่ จำนวนที่เก็บตัวอย่าง และจำนวนที่นำมาวิเคราะห์ความหลากหลายทาง พันธุกรรม.....	17
4.2 ค่าของน้ำหนักและค่าความยาวปีกในการระบุเพศด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา.....	18
4.3 ผลการระบุเพศทางสัณฐานวิทยาเปรียบเทียบกับการระบุเพศด้วยเทคนิคระดับโมเลกุล..	24
4.4 ค่าร้อยละการเปรียบเทียบระหว่างผลการระบุเพศด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ สอดคล้องกับการระบุเพศด้วยเทคนิคระดับโมเลกุล.....	25
4.5 ชนิดไพรเมอร์ และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ นกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น ด้วยเครื่องหมายทางโมเลกุล iPBS.....	28
ภาคผนวก ก-1.....	37
ภาคผนวก ก-2.....	43
ภาคผนวก ก-3.....	46
ภาคผนวก ก-4.....	49



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 ลักษณะนกฟงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น.....	3
2.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของนก.....	4
2.3 โครโมโซมของนกเพศผู้ชนิด Homogametic sex: ZZ และนกเพศเมียชนิด Heterogametic sex: ZW.....	5
2.4 ตัวอย่างแถบแบนของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ตรวจสอบด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส กำหนดให้ M แทนเพศผู้ และ F แทนเพศเมีย.....	6
2.5 อุปกรณ์ที่ใช้สำหรับทำตาข่ายพราง (Mist Net).....	7
2.6 การเข้าเกาะของไพรมอร์ที่ตำแหน่ง LTR.....	9
3.1 การบันทึกข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั้งหมด 7 ลักษณะ.....	11
3.2 การเก็บตัวอย่างเลือดนกฟง.....	12
4.1 การวิเคราะห์ Cluster Dendrogram ที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม R x64 3.4.0 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเพศกับความยาวปีก.....	19
4.2 การวิเคราะห์ Cluster Dendrogram ที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม R x64 3.4.0 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเพศกับน้ำหนัก.....	20
4.3 การวิเคราะห์ Cluster Dendrogram ที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม R x64 3.4.0 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเพศกับความกว้างปาก.....	21
4.4 การวิเคราะห์ Cluster Dendrogram ที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม R x64 3.4.0 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเพศกับความยาวหัวไปปาก.....	22
4.5 ผลการระบุเพศนกฟงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่นด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้เจลอะกาโรสความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 50 คู่เบส จำนวน 7 ตัวอย่าง กำหนดให้ M แทนเพศผู้ และ F แทนเพศเมีย.....	23
4.6 แบบจำลองแถบดีเอ็นเอของไพรมอร์ (ก) 2242 (ข) 2251 (ค) 2252 (ง) 2253 (จ) 2402 ที่ใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายทางโมเลกุล iPBS.....	27
4.7 แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ (Dendrogram) ของนกฟงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่นจำนวน 30 ตัว ด้วยโปรแกรม NTSYSpc 2.1x เลือกวิธีจัดแบบ Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Average (UPGMA) .....	29
4.8 แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ (Dendrogram) ของนกฟงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่นจำนวน 22 ตัว ด้วยโปรแกรม NTSYSpc 2.1x เลือกวิธีจัดแบบ Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Average (UPGMA).....	30

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

ปัจจุบันประเทศไทยพบนกมากกว่า 982 ชนิด จัดเป็นนกอพยพย้ายถิ่น 326 ชนิด โดยนกอพยพบางชนิดได้เข้ามาตั้งถิ่นฐานเป็นนกอพยพประจำถิ่นในประเทศไทยจำนวนมากถึง 89 ชนิด ซึ่งสามารถพบการอพยพของนกในแต่ละชนิดได้ตามฤดูกาลต่างๆ (วิลยา, 2548) นกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น (*Acrocephalus orientalis*) เป็นนกอพยพมายังประเทศไทยในช่วงฤดูหนาวสามารถพบได้มากในพื้นที่ชุ่มน้ำที่สำคัญของประเทศ เช่น เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง จังหวัดอุทัยธานี และบึงบอระเพ็ด จังหวัดนครสวรรค์ เป็นต้น ซึ่งบึงบอระเพ็ด จังหวัดนครสวรรค์ มีสภาพพื้นที่เป็นบึงน้ำจืดกว้างใหญ่ มีพืชพันธุ์และสัตว์น้ำอาศัยอยู่อย่างอุดมสมบูรณ์ จึงเป็นแหล่งอาศัยหากินของนกมากกว่า 180 ชนิด ส่วนใหญ่เป็นนกน้ำ และนกอพยพ (รุ่งโรจน์, 2549)

นกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น (*A. orientalis*) มีลักษณะทั่วไปคือ ปากล่างมีสีเนื้อแกมส้มปลายสีคล้ำ คีวยาวสีขาว แถบตาดำ ขนลำตัวด้านบนน้ำตาลแกมเขียวโพล คอและลำตัวด้านล่างขาว ออกมีขีดสีเทาจาง สีข้างและก้นน้ำตาลแกมเหลืองเข้ม ปลายหางมีแต้มขาวหรือขาวแกมน้ำตาล ขณะเกาะขนปลายปีกยาวกว่าเมื่อเทียบกับปลายขนบริเวณโคนปีก ถิ่นอาศัยจะอยู่ที่ตงหญ้าสูงในพื้นที่ชุ่มน้ำ ทุ่งนา พื้นที่เกษตรกรรม และป่าละเมาะใกล้น้ำ (บุญส่ง, 2550) ซึ่งนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่นจัดเป็นนกในกลุ่ม Sexually monomorphic คือเพศผู้และเพศเมียมีลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกที่เหมือนกัน จึงไม่สามารถระบุเพศได้อย่างชัดเจน

โดยวิธีการระบุเพศที่ได้รับความนิยมสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การคลำตรวจลักษณะทางกายวิภาคของช่องเชิงกราน การสังเกตพฤติกรรมซึ่งวิธีนี้ใช้ได้เมื่อนกอยู่ในช่วงวัยเจริญพันธุ์ การส่องตรวจอวัยวะเพศโดยใช้กล้องผ่านทางช่องท้อง วิธีนี้มีข้อจำกัดคือเหมาะกับนกที่มีขนาดใหญ่เท่านั้น การตรวจวัดระดับสเตียรอยด์ฮอร์โมนในพลาสมาหรือสิ่งขับถ่าย การระบุเพศโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา วิธีนี้ยังคงมีข้อจำกัดคือ สามารถระบุเพศได้ในนกกลุ่ม Sexually dimorphic แต่ปัจจุบันเทคนิคที่ได้รับความนิยมมากคือ เทคนิคระดับโมเลกุล เช่น *Chromo-Helicase-DNA binding based sex identification* ซึ่งเป็นวิธีที่ได้รับความนิยมมากที่สุด เพราะเป็นวิธีที่ง่าย มีความแม่นยำสูง นกได้รับบาดเจ็บน้อย และมีค่าใช้จ่ายในการตรวจไม่สูงมากนัก การตรวจด้วยวิธีนี้ต้องการตัวอย่างเลือดหรือเนื้อเยื่อปริมาณเพียงเล็กน้อยเพื่อนำไปสกัดดีเอ็นเอ (ชนาธิป, 2552) เทคนิคนี้ถูกนำมาใช้หลังจากที่ Griffiths and Tiwari (1995) ได้พบยีนที่เกี่ยวกับการสร้างโปรตีน *Chromo-Helicase-DNA binding (CHD)* บนโครโมโซมเพศทั้ง 2 ชนิดคือ W Chromosome และ Z Chromosome ของนก (Griffiths and Korn, 1997) โดยพบว่ายีนดังกล่าวมีคุณสมบัติที่ดีในการใช้ตรวจแยกเพศนก (ชนาธิป, 2552) ดังนั้นจึงสนใจระบุเพศนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่นด้วยเทคนิคระดับโมเลกุลโดยเปรียบเทียบกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น (*A. orientalis*) ด้วยเครื่องหมายทางโมเลกุล inter Primer Binding Site (iPBS) วรณิภา และคณะ (2559) สามารถนำมาใช้แยกความแตกต่างทางพันธุกรรม และลักษณะทางพันธุกรรมสามารถถ่ายทอดไปยังรุ่นลูกได้ไม่ยาก โดยในงานวิจัยนี้ทำการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายทางโมเลกุล ซึ่งเป็น

เทคนิคที่ทำได้ง่ายไม่ซับซ้อน ใช้เวลาน้อย ค่าใช้จ่ายไม่สูง ให้รูปแบบข้อมูลหลากหลาย และมีความคงตัวสูง (โองการ , 2557)

## 1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการพิเศษ

- 1.2.1 เพื่อระบุเพศของนกฟงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่นด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาเปรียบเทียบกับการระบุเพศด้วยเทคนิคระดับโมเลกุล
- 1.2.2 เพื่อประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกฟงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่นด้วยเครื่องหมายทางโมเลกุล inter Primer Binding Site (iPBS)

## 1.3 ขอบเขตของโครงการพิเศษ

ศึกษาเฉพาะตัวอย่างนกฟงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น (*A. orientalis*) ที่เก็บตัวอย่างจากเขตห้ามล่าสัตว์ป่าบึงบอระเพ็ด จังหวัดนครสวรรค์ ทั้งหมด 4 สถานที่ ได้แก่ แหลมตาเส็ง เกาะตาเรือง ซึ่งอยู่บริเวณบึง และหน้าวัดสโมสรมหาเจ้าแก้วจันทร์ ซึ่งเป็นบริเวณบนบก ในช่วงเดือน ธันวาคม พ.ศ. 2560 - กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2561 โดยระบุเพศด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ได้แก่ ความยาวปีก ความยาวหัวไปปาก ความยาวปาก ความยาวหน้าแข้ง ความยาวหาง ความกว้างปาก และน้ำหนัก เปรียบเทียบกับการระบุเพศด้วยเทคนิคระดับโมเลกุล โดยศึกษาเฉพาะบริเวณยีน *Chromo-helicase-DNA-binding protein (CHD)* ด้วยไพรเมอร์ P2/P8 และประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายทางโมเลกุล inter Primer Binding Site (iPBS)

## 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1.4.1 เพื่อเป็นฐานข้อมูลทางด้านเพศของนกฟงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น
- 1.4.2 สามารถระบุเพศนกฟงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่นด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้ในภาคสนาม
- 1.4.3 ทราบความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกฟงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 2

### ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 ลักษณะทั่วไปของนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น

นกพงจัดอยู่ในวงศ์ Acrocephalidae มีทั้งหมด 221 สปีชีส์ (เกรียงศักดิ์, 2551) ในประเทศไทยพบ 47 สปีชีส์ (เจษฎา, 2559) โดยในงานวิจัยนี้จะกล่าวเฉพาะนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น (Oriental Reed Warbler) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ คือ *Acrocephalus orientalis* เป็นนกพงที่มีขนาดใหญ่ ทำรังวางไข่ในประเทศจีนตอนเหนือ มองโกเลีย ญี่ปุ่น และตอนใต้ของรัสเซีย เมื่อเข้าสู่ฤดูหนาวจะอพยพลงมาอาศัยอยู่ทางตอนใต้ของจีน พม่า ไทย ลงไปจนถึงอินโดนีเซีย ซึ่งในประเทศไทยพบมากในพื้นที่ชุ่มน้ำที่สำคัญของประเทศ เช่น บึงบอระเพ็ด จังหวัดนครสวรรค์ เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง จังหวัดอุทัยธานี (มงคล และวัลยา, 2549) ลักษณะทั่วไปของนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น คือ มีขนาดใหญ่ ปากล่างสีเนื้อแกมส้มปลายสีคล้ำ คิ้วยาวสีขาว แถบตาดำ ขนลำตัวด้านบนสีน้ำตาลแกมเขียวไพล คอและลำตัวด้านล่างสีขาว ออกมีขีดสีเทาจางๆ สีข้างและกันสีน้ำตาลแกมเหลืองเข้ม ปลายหางมีแต้มสีขาว หรือขาวแกมน้ำตาล ขณะเกาะขนปลายปีกจะยาวกว่าเมื่อเทียบกับขนบริเวณโคนปีก ดังรูปที่ 2.1 มักจะหากินเป็นกลุ่มหลายตัว โดยพบได้บริเวณป่าดงหญ้าสูงในพื้นที่ชุ่มน้ำ



รูปที่ 2.1 ลักษณะนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น  
(ที่มา : ถ่ายภาพโดย ธันยพร สุธรรมพงษ์, 2560)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.2 การระบุเพศนก

### 2.2.1 การระบุเพศโดยดูจากลักษณะภายนอก (external appearance)

การระบุเพศนกทั่วไป สามารถระบุได้จากลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอกที่แตกต่างกันระหว่างเพศผู้และเพศเมีย เช่น ขนาดรูปร่าง สีขน เสียง หรือพฤติกรรมการแสดงออก เรียกลักษณะนี้ว่า Sexually dimorphic เช่น นกเป็ดแมนดารินเพศผู้จะมีสีอันสวยงาม ในขณะที่เพศเมียจะมีสีเทาปนน้ำตาล (มนต์ชัย, 2557) ดังรูปที่ 2.2 ส่วนนกที่ไม่สามารถระบุเพศได้จากลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอก เรียกว่า Sexually monomorphic เช่น นกปรอทแม่ทะ ซึ่งตัวผู้และตัวเมียมีลักษณะเหมือนกัน ลักษณะที่เห็นเด่นชัดคือ บนกระหม่อมมีสีเหลือง และมีเส้นสีดำลากผ่านตาจากโคนปาก มีเส้นสีดำลงมาทางด้านข้างของลำคอ บนหัว บนหลัง และหน้าอก มีลายเป็นทางเล็กๆ สีเทา ดังรูปที่ 2.2ข (Morinha, 2012) ในงานวิจัยของ Izabela และคณะ (2013) ได้ศึกษาการระบุเพศในสิ่งมีชีวิตที่มีลักษณะเป็น Sexually monomorphic โดยการวิเคราะห์ทางสถิติ สำหรับการระบุเพศนก Savi's Warbler (*Locustella luscinioides*) ซึ่งอาศัยการวัดลักษณะทางสัณฐานวิทยา 9 ลักษณะ (ความยาวปีก ความยาวหาง ความยาวระหว่างหัวถึงปาก ความยาวปาก ความกว้างปาก ความสูงปาก ความกว้างของหน้าแข้ง ความกว้างของขาส่วนบน ความยาวของกรงเล็บ) พบว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอกที่เหมาะสมที่สุดสำหรับนกตัวเต็มวัยในการระบุเพศ คือ ความยาวของปีก เมื่อใช้ค่าความยาวปีกในการระบุเพศพบว่าค่าความผิดพลาดร้อยละ 23.23 และความยาวของปาก เมื่อใช้ค่าความยาวปากในการระบุเพศพบว่า มีค่าความผิดพลาดร้อยละ 14.14 โดยในงานวิจัยของวรรณิภาและคณะ (2559) ได้ทำการศึกษานกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่นซึ่งจัดเป็นนกกลุ่ม Sexually monomorphic ระบุไว้ว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอกที่เหมาะสมที่สุดในการระบุเพศของนก คือ การใช้น้ำหนักควบคู่กับความยาวปีก ในกรณีที่ น้ำหนักมากกว่า 23.85 กรัม ความยาวปีกมากกว่า 80.50 มิลลิเมตร จะระบุเป็นเพศผู้ ถ้าความยาวปีกน้อยกว่าหรือเท่ากับ 80.50 มิลลิเมตร จะระบุเป็นเพศเมีย กรณีที่ น้ำหนักน้อยกว่าหรือเท่ากับ 23.85 กรัม ความยาวปีกมากกว่า 84.50 มิลลิเมตร จะระบุเป็นเพศผู้ ถ้าความยาวปีกน้อยกว่าหรือเท่ากับ 84.50 มิลลิเมตร จะระบุเป็นเพศเมีย ซึ่งให้ค่าความผิดพลาดอยู่ที่ร้อยละ 10.10



รูปที่ 2.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของนก (ก) Sexually dimorphic

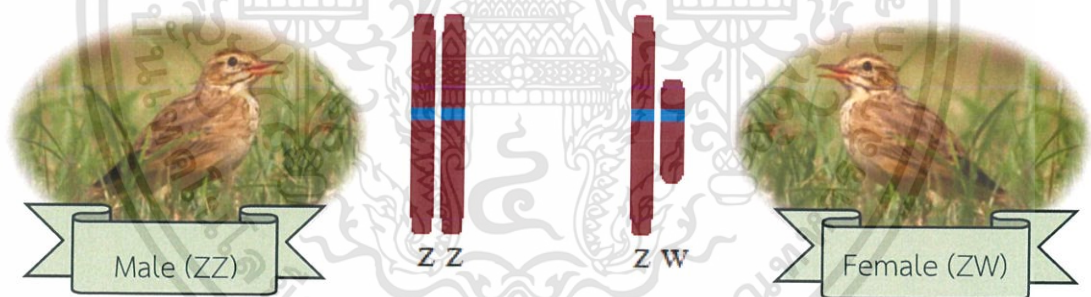
(ข) Sexually monomorphic

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์โดย (ก) <https://www.en.wikipedia.org> (ข) <http://www.rmuthphysics.com> การค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.2.2 การระบุเพศด้วยเทคนิคระดับโมเลกุลโดยการใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่ (Polymerase Chain Reaction: PCR method)

ปัจจุบันได้มีการนำเทคโนโลยี polymerase chain reaction (PCR) มาประยุกต์ใช้ในการตรวจแยกเพศนกอย่างกว้างขวาง เพราะเป็นวิธีที่ง่าย มีความแม่นยำสูง นกเจ็บตัวน้อย และมีค่าใช้จ่ายในการตรวจไม่สูงมากนัก การตรวจด้วยวิธีนี้ต้องการเลือดปริมาณเพียงเล็กน้อยเพื่อนำไปสกัดดีเอ็นเอ โดยเทคนิคนี้ถูกนำมาใช้หลังจากที่ Griffiths and Tiwari (1995) ได้พบยีนที่เกี่ยวกับการสร้างโปรตีน CHD บน W Chromosome ของนก ซึ่งต่อมาพบว่า มียีนลักษณะเดียวกันนี้บน Z Chromosome เช่นกัน (Griffiths and Korn, 1997) โดยพบว่ายีนดังกล่าวมีคุณสมบัติที่ดีในการใช้ตรวจแยกเพศนก เนื่องจาก เป็นยีนที่มีวิวัฒนาการช้า และแม้จะเป็นสัตว์ปีกต่างชนิดกันก็สามารถพบยีนนี้ได้ยกเว้นสัตว์ปีกในกลุ่ม ratites ซึ่งได้แก่ นกกระจอกเทศ และนกอีมู (emu; *Dromaius novaehollandiae*) เป็นต้น โดยนกทุกชนิดมีความแตกต่างของโครโมโซมเพศ นกเพศผู้มีโครโมโซม ZZ เป็น homogametic sex และนกเพศเมียมีโครโมโซม ZW เป็น heterogametic sex ดังรูปที่ 2.3 โครโมโซม Z และ W ซึ่งอยู่ระหว่างส่วนที่ถูกถอดรหัส (exon) หลักการแยกเพศโดยอาศัยยีน CHD นั้นอาศัยหลักพื้นฐานของความยาวที่แตกต่างกันของความยาวของอินทรอนระหว่างโครโมโซมเพศทั้งสองชนิด การออกแบบไพรเมอร์ที่เหมาะสม เพื่อสร้างสายดีเอ็นเอในตำแหน่งที่ครอบคลุม ส่วนอินทรอนของยีน CHD จะส่งผลให้สามารถแยกความแตกต่างของชิ้นส่วนของยีน CHD-W และ CHD-Z ได้



รูปที่ 2.3 โครโมโซมของนกเพศผู้ชนิด Homogametic sex: ZZ และ นกเพศเมียชนิด Heterogametic sex: ZW

(ที่มา : ตัดแปลงจาก <http://www.oknation.nationtv.tv>)

เมื่อนำไปผ่านกระบวนการ Polymerase Chain Reaction (PCR) ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมจำเป็นต้องมีไพรเมอร์ที่เหมาะสมสำหรับการระบุเพศ โดยในงานวิจัยของ สุพิศตรา และคณะ (2555) ได้ศึกษาการระบุเพศในนกแก้วบางชนิด โดยไพรเมอร์ P2 (5'-TCTGCATCGCTAAATCCTTT-3') และ P8 (5'-CTCCAAGGATGAGRAAYTG-3') (Griffiths *et al.*, 1998) ไพรเมอร์ 1237L (5'-GAGAACTGTGCAAACAG-3') และ 1272H (5'-TCCAGAATATCTTCTGCTCC-3') (Kahn *et al.*, 1998) จะเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน CHD บริเวณ intron เดียวกัน และไพรเมอร์ 2550F (5'-GTTACTGATTCTGCTACGAGA-3') และไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2718R (5'-ATTGAAATGATCCAGTGCTTG-3') (Fridolfsson and Ellegren, 1999) จะเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน *CHD* บริเวณ intron ที่ต่างไป สำหรับ universal primer ทั้ง 3 คู่ เหมาะกับการระบุเพศในนกแตกต่างกันไป เช่น โพรเมอร์ P2/P8 ให้ผลแม่นยำกว่าโพรเมอร์ 2550F/2718R ในนกแก้วบางชนิด (สุพัตรา และคณะ, 2555) กรณีของโพรเมอร์ P2/P8 นั้น แม่วานิยมนำมาใช้ในการระบุเพศนกในหลายสปีชีส์ แต่ต้องมีการเปลี่ยนแปลงสภาวะที่เหมาะสมในปฏิกิริยาพีซีอาร์ เมื่อนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ มาตรวจสอบผลด้วยวิธีเจลอเล็กโทรโฟรีซิสพบว่าเพศผู้จะปรากฏ 1 แถบแบน และเพศเมียปรากฏ 2 แถบ (ชนาธิป, 2552) ดังตัวอย่างการเกิดแถบในรูปที่ 2.4



รูปที่ 2.4 ตัวอย่างแถบแบนของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ตรวจสอบด้วยวิธีเจลอเล็กโทรโฟรีซิส กำหนดให้ M แทนเพศผู้ และ F แทนเพศเมีย (ที่มา : ณิชากัทร และคณะ, 2556)

### 2.3 วิธีดักจับนก

ตาข่ายพรางดักนก (Mist Net) ซึ่งการใช้ตาข่ายพรางดักนกนั้นเป็นอีกวิธีหนึ่งที่นักปักษีวิทยาและนักวิจัยที่เกี่ยวข้องนิยมใช้เป็นวิธีจับนกที่มีขนาดเล็กถึงขนาดกลางในธรรมชาติเพื่อการวิจัยต่างๆ เช่น การติดห่วงขา (รูปที่ 2.10) การเก็บตัวอย่างเลือดเพื่อตรวจโรค เป็นต้น ส่วนหลักการของการตั้งตาข่ายดักนกนั้นง่าย เพียงแค่กางตาข่ายขวางบริเวณที่นกบินผ่านประจำ ซึ่งจะอาจเป็นที่นกพักผ่อนหรือบริเวณที่นกใช้เป็นแหล่งอาหารเป็นประจำ (เกชา, 2552)

อุปกรณ์ที่ใช้สำหรับทำตาข่ายพราง (Mist Net)

ตาข่าย เป็นตาข่ายที่ใช้จับนกโดยเฉพาะ ดังรูปที่ 2.5ก โดยมากทำจากไนลอนที่มีความยืดหยุ่นสูง มีลักษณะเป็นถุงซ้อนกันเป็นชั้นๆ 3 ถึง 5 ชั้น (บุญญพัฒน์ และคณะ, 2558) ซึ่งมีขนาดแตกต่างกัน แล้วแต่ชนิดของนกที่ต้องการจับ (เกชา, 2552)

เสา ใช้สำหรับซึ่งตาข่าย (บุญญพัฒน์ และคณะ, 2558) อาจใช้เป็นเสาไม้ไผ่ เสาสแตนเลส หรือท่อพีวีซี แล้วแต่สถานที่ หรือผู้ปฏิบัติจะประยุกต์ใช้งาน (เกชา, 2552) ดังรูปที่ 2.5ข

เชือก ใช้สำหรับผูกยึดเสากับสมอบก รวมถึงใช้เชือกสำหรับมัดตาข่ายไม่ให้พันกันหลังจากใช้งาน (บุญญพัฒน์ และคณะ, 2558) อาจใช้เป็นเชือกป่าน เชือกฟาง หรือเชือกไนลอนแล้วแต่ความสะดวกของผู้ปฏิบัติงาน และความเหมาะสม (เกชา, 2552) ดังรูปที่ 2.5ค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์การเรียงพิมพ์และจัดพิมพ์โดยศูนย์อนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ  
ไม่ว่ากรรมใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สมอบก ทำมาจากเหล็ก ด้านบนมีลักษณะงอใช้สำหรับมัดเชือก ด้านล่างมีลักษณะยาวตรง ปลายแหลม ดังรูปที่ 2.5ง ใช้สำหรับปักยึดไว้กับดิน (บุญญพัฒน์ และคณะ, 2558) เวลาใช้งานควรเลือกให้มีขนาดและความยาวที่พอเหมาะ และเหมาะสมกับสถานที่ที่ปฏิบัติงานด้วย (เกชา, 2552)

ถุงผ้า เป็นถุงผ้าดิบมีลักษณะเป็นสี่เหลี่ยมผืนผ้า ด้านบนของถุงมีเชือกร้อยไว้สำหรับปิดปากถุง ด้านล่างถุงเย็บปิดสนิท (บุญญพัฒน์ และคณะ, 2558) ดังรูปที่ 2.5จ ใช้สำหรับเก็บตาข่าย และใส่นกที่ทำการดักจับได้ (เกชา, 2552)



รูปที่ 2.5 อุปกรณ์ที่ใช้สำหรับทำตาข่ายพราง (Mist Net) (ก) ตาข่าย (ข) เสือ (ค) เชือก (ง) สมอบก (จ) ถุงผ้า

(ที่มา : (ก) <https://www.maintracgroup.com>

(ข) <http://www.doh.go.th>

(ค) <https://www.nanagarden.com>

(ง) <https://www.fieldandcamping.com>

(จ) <https://www.uteeni.com>)

การตั้งตาข่ายพราง (Mist Net) จะต้องทำการสำรวจพื้นที่ที่จะติดตั้งตาข่ายดักนก โดยเลือกพื้นที่ที่เหมาะสม ได้แก่พื้นที่แนวเส้นทางการบินของนก เช่น ช่องทางแคบๆในป่า บริเวณนาข้าว ช่องว่างระหว่างแนวของต้นไม้ เป็นต้น (บุญญพัฒน์ และคณะ, 2558) หรือบริเวณที่นกบินผ่านประจำ ซึ่งจะอาจเป็นที่นกพักผ่อน หรือบริเวณที่นกใช้เป็นแหล่งอาหารเป็นประจำ (เกชา, 2552) เมื่อได้พื้นที่ที่จะติดตั้งตาข่ายดักนกแล้ว ต้องทำการวางหญ้าหรือสิ่งกีดขวางอื่นออก เพื่อให้สามารถเข้าไปติดตั้งตาข่ายดักนกได้

การติดตั้งตาข่ายเริ่มจากตั้งเสาต้นแรก โดยการกางตาข่ายออกโดยใช้คน 2 คน คนที่ 1 ยืนอยู่กับที่ และเกี่ยวห้วงตาข่ายด้านหนึ่งไว้ที่มือ จากนั้นคนที่ 2 ใช้นิ้วมือเกี่ยวกับห้วงของตาข่ายอีกด้านหนึ่งไว้และใช้มืออีกข้างจับตาข่ายแล้วค่อยๆเดินถอยหลังไปเรื่อยๆ พร้อมทั้งปล่อยตาข่ายที่ถืออยู่ในมือออกทีละน้อยจนตาข่ายเริ่มตึงทั้งสองด้าน จากนั้นคนที่ 1 นำห้วงของตาข่ายใส่เข้าไปในเสาที่ 1 ให้เรียบร้อย และในกรณีที่กางตาข่ายต่อกันมากกว่า 1 ปาก จะต้องมีเสาที่ต้องใช้ตาข่ายร่วมกัน 2 ปาก การใส่ห้วงตาข่ายจะต้องใส่สลับกันไปเป็นคู่ระหว่างตาข่ายปากที่ 1 และตาข่ายปากที่ 2 ในการกางตาข่ายควรกางให้ตาข่ายหย่อนเล็กน้อย หรือมีลักษณะเป็นถุง เพราะถ้าหากว่าตาข่ายหย่อนเกินไปจะทำให้เห็นนกที่บินมาติดตาข่ายพันเข้ากับตาข่ายมากจนไม่สามารถปลดออกจากตาข่ายได้ หรือถ้าหากตาข่ายไม่วางกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตั้งจนเกินไปจะทำให้คนที่บินมาติดตาข่ายแดงออกจากตาข่าย และบินหลบหนีข่ายได้ (ทีมา : ปุญญพัฒน์ และคณะ , 2558)

## 2.4 วิธีการเก็บตัวอย่าง

การเก็บตัวอย่างมีอยู่ 2 วิธี คือ แบบที่ไม่กระทบกับตัวสัตว์ หรือที่ไม่ก่อให้เกิดอันตรายแก่ตัวสัตว์ (non-invasive) และ แบบที่มีการกระทบกับตัวสัตว์ (invasive) (เฉลิมชาติ และคณะ, 2546)

### 2.4.1 การเก็บตัวอย่างแบบที่ไม่ก่อให้เกิดอันตรายแก่ตัวสัตว์ (non-invasive)

การเก็บตัวอย่างแบบที่ไม่ก่อให้เกิดอันตรายแก่ตัวสัตว์ คือ การเก็บตัวอย่างแบบที่ไม่ต้องมีการควบคุมบังคับนก ทำให้ไม่มีผลกระทบต่อตัวนกมากนัก และสามารถใช้ได้กับลูกนก นกตัวเล็ก นกที่เลี้ยงในกรงใหญ่ หรือนกป่าได้ ได้แก่ ตัวอย่างปัสสาวะ มูล และของเสียในเปลือกไข่ เป็นต้น ทั้งนี้ตัวอย่างปัสสาวะ และมูลก็มีเซลล์เยื่อๆ ลำไส้ปะปนอยู่ จึงสามารถนำมาสกัดดีเอ็นเอ และนำไปใช้แยกเพศได้ (Nota และคณะ, 1999) ส่วนของเสียในเปลือกไข่ ซึ่งประกอบไปด้วย สิ่งคัดหลั่ง เนื้อเยื่อหรือเลือด ที่ติดกับเปลือกไข่ จึงสามารถเป็นแหล่งดีเอ็นเอที่นำมาใช้ในการแยกเพศได้เช่นกัน

### 2.4.2 การเก็บตัวอย่างแบบที่มีการกระทบกับตัวสัตว์ (invasive)

การเก็บตัวอย่างแบบที่มีการกระทบกับตัวสัตว์ คือ การเก็บตัวอย่างที่ต้องมีการจับควบคุมสัตว์ โดยวิธีนี้มีผลกระทบต่อตัวนก เนื่องจากนกเป็นสัตว์ที่ไประบ่างตื่นตื่นและตกใจง่าย โดยเฉพาะนกที่มีขนาดเล็ก รวมถึงนกที่มีคุณค่าทางการอนุรักษ์หรือทางเศรษฐกิจ หากกระทำไม่เหมาะสมอาจทำให้เกิดการสูญเสียได้ (เฉลิมชาติ และคณะ, 2546) ได้แก่ การเก็บตัวอย่างขน และตัวอย่างเลือด

การเก็บตัวอย่างเลือดควรดูแลตัวอย่างดีๆ ไม่ควรใช้สารกันเลือดแข็งตัว เนื่องจากเฮปารินจะมีผลต่อการย้อมสี EDTA จะทำให้เม็ดเลือดบางชนิดแตก ซึ่งมีหลายตำแหน่งที่สามารถใช้เก็บตัวอย่างเลือด ได้แก่ การเจาะเลือดดำที่ขา การเก็บเลือดจากการตัดปลายเล็บให้เลือดซึมออกมา และการเจาะหลอดเลือดดำที่ปีก (Dorrestei, 1996)

กระดาษ FTA (Fast Technology Analysis Card) เป็นกระดาษที่พัฒนาขึ้นโดย Whatman ซึ่งเป็นวิธีการใหม่ที่มีความรวดเร็วสำหรับการเก็บตัวอย่าง การทำให้บริสุทธิ์ และการวิเคราะห์ดีเอ็นเอ จากตัวอย่างทางชีวภาพ (Whatman Inc. FTA Protocols, 2002) โดยกระดาษ FTA ถูกเคลือบด้วยสารเคมีเพื่อกักเก็บดีเอ็นเอรักษาเสถียรภาพ ทำให้มีศักยภาพในการเก็บและรักษาสภาพของดีเอ็นเอ ในการเก็บตัวอย่างภาคสนามที่ไม่มีสิ่งอำนวยความสะดวกเหมือนกับในห้องปฏิบัติการ (Lucky และคณะ, 2011)

## 2.5 การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายทางโมเลกุล inter Primer Binding Site (iPBS)

เครื่องหมายทางพันธุกรรม หมายถึง เครื่องมือสำคัญในการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมและวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตที่สำคัญ โดยเฉพาะการศึกษาลักษณะพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ ลักษณะหรือตัวบ่งชี้ที่มีความเฉพาะเจาะจง สามารถนำมาใช้แยกความแตกต่างทางพันธุกรรม และสามารถถ่ายทอดลักษณะนั้นๆไปยังรุ่นลูกได้ (ธีระชัย, 2553)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



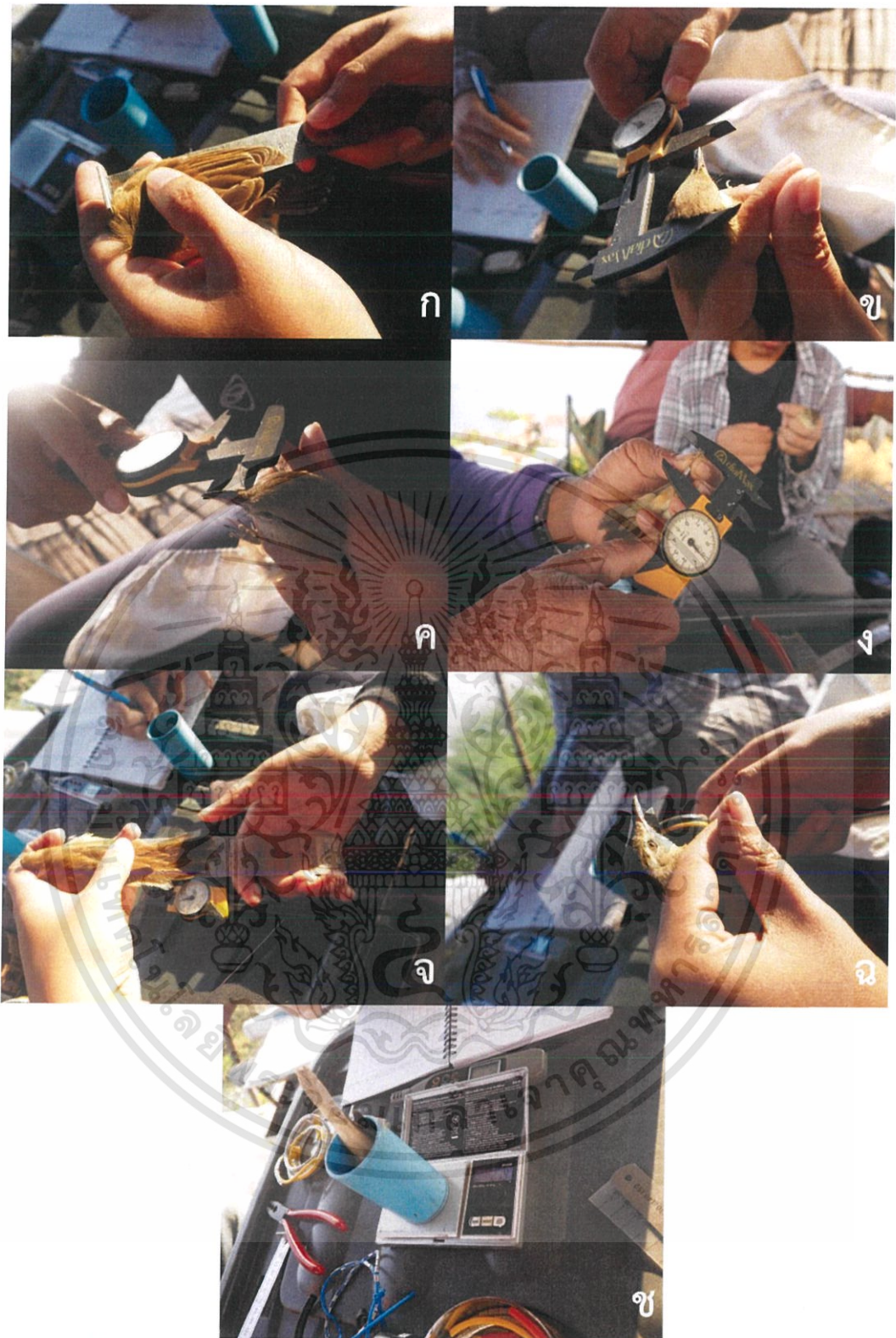
## บทที่ 3

### วิธีการดำเนินงานวิจัย

#### 3.1 ตัวอย่าง

ดักจับนกฟงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่นด้วยเทคนิคตาข่ายพราง (Mist Net) โดยเลือกพื้นที่ที่เหมาะสม ได้แก่พื้นที่แนวเส้นทางการบินของนกหรือบริเวณที่นกบินผ่านประจำ การติดตั้งตาข่ายควรกางให้ตาข่ายหย่อนเล็กน้อย หรือมีลักษณะเป็นถุง เพราะถ้าหากว่าตาข่ายหย่อนเกินไปจะทำให้นกที่บินมาติดตาข่ายพันเข้ากับตาข่ายมากจนไม่สามารถปลดออกจากตาข่ายได้ หรือถ้าหากตาข่ายตึงจนเกินไปจะทำให้นกที่บินมาติดตาข่ายดึงออกจากตาข่าย และบินหลบหนีข้ายได้ โดยดำเนินการร่วมกับเจ้าหน้าที่สถานีวิจัยสัตว์ป่าบึงบอระเพ็ด จังหวัดนครสวรรค์ เมื่อนกบินมาติดตาข่ายเจ้าหน้าที่จะทำการปลดนกออกจากตาข่ายแล้วนำมาใส่ห่วงขา จากนั้นจะทำการบันทึกข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั้งหมด 7 ลักษณะ ได้แก่ ความยาวปีก ความยาวหัวไปปาก ความยาวปาก ความยาวหน้าแข้ง ความยาวหาง ความกว้างปาก และน้ำหนัก ดังรูปที่ 3.1 ก-ข

เก็บตัวอย่างเลือดนกฟงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่นโดยการใส่เข็มเบอร์ 26x 1 " เจาะบริเวณเส้นเลือดดำที่ขาของนก (รูปที่ 3.2ก) และใช้ Hematocrit tube ดูดเลือด (รูปที่ 3.2ข) นำมาใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลังจากนั้นจะใช้ FTA card ชับเลือดบริเวณที่ผ่านการเจาะเลือด (รูปที่ 3.2ค) และนำใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร



รูปที่ 3.1 การบันทึกข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั้งหมด 7 ลักษณะ ได้แก่ (ก) ความยาวปีก (ข) ความยาวหัวไปปาก (ค) ความยาวปาก (ง) ความยาวหน้าแข้ง (จ) ความยาวหาง (ฉ) ความกว้างปาก (ช) น้ำหนัก

(ที่มา : ถ่ายภาพโดย ฉันทพร สุธรรมพงษ์, 2560)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3.2 การเก็บตัวอย่างเลือดนกฟอง (ก) เจาะเลือดนก (ข) ใช้ Haematocrit tube ดูดเลือด (ค) FTA card ซ้ำเลือดบริเวณที่ผ่านการเจาะเลือด  
(ที่มา : ถ่ายภาพโดย ฉันทพร สุธรรมพงษ์, 2560)

### 3.2 วัสดุอุปกรณ์

- 3.2.1 Autoclave
- 3.2.2 Autopipette
- 3.2.3 Centrifuge
- 3.2.4 Electrophoresis system
- 3.2.5 Forceps
- 3.2.6 FTA card
- 3.2.7 Heat box
- 3.2.8 Haematocrit tube
- 3.2.9 Microwave
- 3.2.10 Pouchet
- 3.2.11 Spin down
- 3.2.12 Syringes ขนาด 26G × 1 "
- 3.2.13 Thermal cycler
- 3.2.14 Tip
- 3.2.15 Tube ขนาด 0.2 มิลลิลิตรและ 1.5 มิลลิลิตร
- 3.2.16 Vortex
- 3.2.17 Water bath
- 3.2.18 UV Transilluminator
- 3.2.19 Spectrophotometer

### 3.3 สารเคมี

- 3.3.1 Absolute ethanol
- 3.3.2 Agarose
- 3.3.3 DNA ladder ขนาด 1 kb , 50 bp และ 100 bp
- 3.3.4 DI water
- 3.3.5 Distillation water
- 3.3.6 dNTPs

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.3.7 Ethidium bromide
- 3.3.8 70 เปอร์เซ็นต์ Ethanol
- 3.3.9 FTA purification reagent
- 3.3.10 6X Gel loading dye blue (บริษัท Biolab)
- 3.3.11 GF-1 Blood DNA Extraction Kit (บริษัท Vivantis)
- 3.3.12  $MgCl_2$
- 3.3.13 Nuclease free water
- 3.3.14 Proteinase K
- 3.3.15 Rnase A
- 3.3.16 10X Standard *taq* reaction buffer
- 3.3.17 *Taq* DNA polymerase
- 3.3.18 2X *Taq* mastermix (บริษัท Vivantis)
- 3.3.19 10X TBE buffer
- 3.3.20 0.1 มิลลิโมลาร์ TE buffer เตรียมจาก 10 โมลาร์ TE buffer
- 3.3.21 โพรเมอร์ P2 (5'-TCTGCATCGCTAAATCCTTT-3')  
และ P8 (5'-CTCCCAAGGATGAGRAAYTG-3')  
(Griffiths และคณะ, 1998)
- 3.3.22 โพรเมอร์ 2242 (5'-GCCCCATGGTGGGCGCCA-3')  
2251 (5'-GAACAGGCGATGATACCA-3')  
2252 (5'-TCATGGCTCATGATACCA-3')  
2253 (5'-TCGAGGCTCTAGATACCA-3')  
2402 (5'-TCTAAGCTCTTGATACCA-3')  
ดัดแปลงจาก Kalendar และคณะ, (2010)

### 3.4 การสกัดดีเอ็นเอ

#### 3.4.1 การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือดนก

นำตัวอย่างเลือดปริมาตร 20 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร ทำการสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัด GF-1 Blood DNA Extraction Kit (Vivantis) โดยเติม BB buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และเติม Proteinase K ปริมาตร 20 ไมโครลิตร นำไปบ่มใน Water bath ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-6 ชั่วโมง โดยจะทำการกลับหลอดทุก 15 นาที เมื่อครบเวลาที่กำหนดนำมาเติม Rnase A ปริมาตร 20 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที และเติม Absolute ethanol ที่เย็นปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันทันทีโดยพลิกหลอดไปมา ย้ายสารละลายตัวอย่างจากหลอดทดลองลงในคอลัมน์ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 5000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที เมื่อครบเวลาเทส่วนใสทิ้งและเติม Wash buffer 1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 5000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที เมื่อครบเวลาเทส่วนใสทิ้ง เติม Wash buffer 2 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยง ที่ 5000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง ทำซ้ำจำนวน 2 ครั้ง และนำคอลัมน์มาทำการปั่นเหวี่ยงอีกรอบที่ 14000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เวลา 3 นาที

จากนั้นนำคอลัมน์ย้ายไปใส่หลอดทดลอง 1.5 มิลลิลิตรหลอดใหม่ เติม Elution buffer ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ที่มีอุณหภูมิ 65 องศา และนำไปปั่นเหวี่ยง ที่ 5000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที ทำซ้ำจำนวน 2 ครั้ง จะได้สารละลายดีเอ็นเออยู่ที่กันหลอดทดลอง และเก็บดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ 4 ถึง -20 องศาเซลเซียส

### 3.4.2 การทำให้กระดาศ FTA บริสุทธิ์

นำ poucher มาแช่ทำความสะอาดโดยใช้แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ ทำการเจาะกระดาศ FTA ด้วย poucher โดยเลือกบริเวณที่มีเลือดจาง ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 0.2 มิลลิลิตร เติม Purification FTA ปริมาตร 125 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 นาที Vortex และนำไปปั่นใน Heat box ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เวลา 10 นาที เมื่อครบเวลาที่กำหนดนำมาติดและดูด Purification FTA ออก ทำซ้ำจำนวน 2 ครั้ง เติม TE buffer ปริมาตร 125 ไมโครลิตร เพื่อล้างน้ำยา Purification FTA ทำการติดหรือ Vortex นำไปปั่นใน Heat box ที่ 65 องศาเซลเซียส เวลา 10 นาที เมื่อครบเวลาดูด TE buffer ออก ทำซ้ำจำนวน 2 ครั้ง และทำให้กระดาศ FTAแห้ง โดยการเปิดฝาหลอด นำไปปั่นใน Heat box ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส จนกระดาศ FTAแห้ง

### 3.4.3 การระบุเพศนกด้วยเทคนิคระดับโมเลกุล

ทำการระบุเพศนกด้วยไพรเมอร์ P2 (5'-TCTGCATCGCTAAATCCTTT-3') และ P8 (5'-CTCCCAAGGATGAGRAAYTG-3') ซึ่งจะแยกเป็น 2 กรณี โดยกรณีแรก คือ ใช้ดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดเลือด (3.4.1) มีส่วนประกอบของสารเคมีในปฏิกิริยา PCR ดังนี้ 2x taq master mix ปริมาตร 12.5 ไมโครลิตร Forward primer P2 ปริมาตร 4 ไมโครลิตร Reverse primer P8 ปริมาตร 4 ไมโครลิตร DNA template ปริมาตร 1 ไมโครลิตร DI water ปริมาตร 3.5 ไมโครลิตร ส่วนกรณีสอง คือ ใช้ดีเอ็นเอบนกระดาศ FTA ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว มีส่วนประกอบของสารเคมีในปฏิกิริยา PCR ดังนี้ 2x taq master mix ปริมาตร 12.5 ไมโครลิตร Forward primer P2 ปริมาตร 4 ไมโครลิตร Reverse primer P8 ปริมาตร 4 ไมโครลิตร DI water ปริมาตร 4.5 ไมโครลิตร จากนั้นเข้าเครื่อง PCR เพื่อทำการเพิ่มปริมาณยีน *CHD* โดยสภาวะที่ใช้จะแสดงดังตารางที่ 3.1 (วิลาวณิชย์ และคณะ, 2558)

ตารางที่ 3.1 สภาวะการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในการระบุเพศด้วยเทคนิคระดับโมเลกุล

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (วินาที)	จำนวนรอบ
Initial denature	95	300	1
Denaturation	95	60	} 35
Annealing	53	60	
Extension	72	60	
Final extension	72	600	1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.4 การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายทางโมเลกุล inter Primer Binding Site (iPBS)

ใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดเลือด โดยใช้ไพรเมอร์ที่เหมาะสมสำหรับศึกษาความหลากหลาย ให้แถบดีเอ็นเอชัดเจนและหลากหลาย คือ ไพรเมอร์ 2242 2251 2252 2253 และ 2402 (วรรณิภา และคณะ, 2559) โดยปฏิกิริยา PCR ด้วยเครื่องหมายทางโมเลกุล iPBS โดยใช้ อุณหภูมิ Optimal annealing temperature ( $T_a$ ) ของแต่ละไพรเมอร์ที่ดัดแปลงจาก Kalendar และคณะ, (2010) ดังตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 แสดงชนิด ลำดับนิวคลีโอไทด์ และ อุณหภูมิ Optimal annealing temperature ( $T_a$ ) (องศาเซลเซียส)

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	Optimal annealing ( $T_a$ ) (องศาเซลเซียส)
2242	5'-GCCCCATGGTGGGCGCCA-3'	57.0
2251	5'-GAACAGGCGATGATACCA-3'	53.2
2252	5'-TCATGGCTCATGATACCA-3'	51.6
2253	5'-TCGAGGCTCTAGATACCA-3'	51.0
2402	5'-TCTAAGCTCTTGATACCA-3'	50.0

ส่วนประกอบสารเคมีในปฏิกิริยา ดังนี้ *Taq* polymerase ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร Standard taq buffer ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ ที่ความเข้มข้น 100 พิโคโมลต่อไมโครลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร Mix dNTPs ความเข้มข้น 1.25 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 4 ไมโครลิตร  $MgCl_2$  ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร DI water ปริมาตร 10.6 ไมโครลิตร DNA template ความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 2 ไมโครลิตร (วิลาวัณย์ และคณะ, 2558) นำเข้าเครื่อง Thermal cycler เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยสภาวะที่เหมาะสมดังตารางที่ 3.3 ตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟเรซิส โดยใช้เจลอะกาโรสความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส (Vivantis) แผลผลจากการให้คะแนนแบบ Binary คือ เมื่อปรากฏแถบดีเอ็นเอให้คะแนนเป็น 1 หากไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ ณ ตำแหน่งเดียวกันของแต่ละตัวอย่างให้คะแนนเป็น 0 จากนั้นนำคะแนนที่เกิดจากแต่ละไพรเมอร์ มาสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ (Dendrogram) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป NTSYS-pc เวอร์ชัน 2.1 โดยเลือกวิธีจัดกลุ่มแบบ UPGMA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.3 สภาวะการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วย เครื่องหมายทางโมเลกุล iPBS (ที่มา : วิลาวัณย์ และคณะ, 2558)

ขั้นตอน	อุณหภูมิ(องศาเซลเซียส)	เวลา(วินาที)	จำนวนรอบ
Initialdenaturation	95	180	1
Denaturation	95	15	} 30
Annealing	50.0-57.0	60	
Extension	68	60	
Final extension	72	300	1



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 4

### ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

#### 4.1 จำนวนตัวอย่างนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น

จากการเก็บตัวอย่างนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่นบริเวณเขตห้ามล่าสัตว์ป่าบึงบอระเพ็ด จังหวัดนครสวรรค์ ทั้งหมด 4 สถานที่ ได้แก่ แหลมตาเส็ง เกาะตาเรือง หน้าวัดสโสมสร และท่าข้าวกำนันทรง โดยทำการเก็บตัวอย่าง ตั้งแต่เดือนธันวาคม พ.ศ. 2560 ถึง เดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2561 เก็บตัวอย่างทั้งหมดจำนวน 76 ตัว โดยนำมาระบุเพศด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาเปรียบเทียบกับการระบุเพศด้วยเทคนิคระดับโมเลกุลได้จำนวน 73 ตัว และ คัดเลือกตัวอย่างมาวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม 30 ตัว ซึ่งผลการเก็บตัวอย่างทั้งหมดแสดงให้เห็นดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 เวลา สถานที่ จำนวนตัวอย่าง และจำนวนที่นำมาวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม

เวลา	สถานที่	จำนวน (ตัว)	จำนวนที่นำมาวิเคราะห์ความหลากหลาย (ตัว)
ธันวาคม (2560)	แหลมตาเส็ง	24	9
	เกาะตาเรือง	10	3
	หน้าวัดสโสมสร	4	2
มกราคม (2561)	ท่าข้าวกำนันทรง	2	2
	เกาะตาเรือง	7	5
	หน้าวัดสโสมสร	1	1
กุมภาพันธ์ (2561)	แหลมตาเส็ง	20	5
	ท่าข้าวกำนันทรง	1	1
	หน้าวัดสโสมสร	7	2
รวม	-	76	30

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

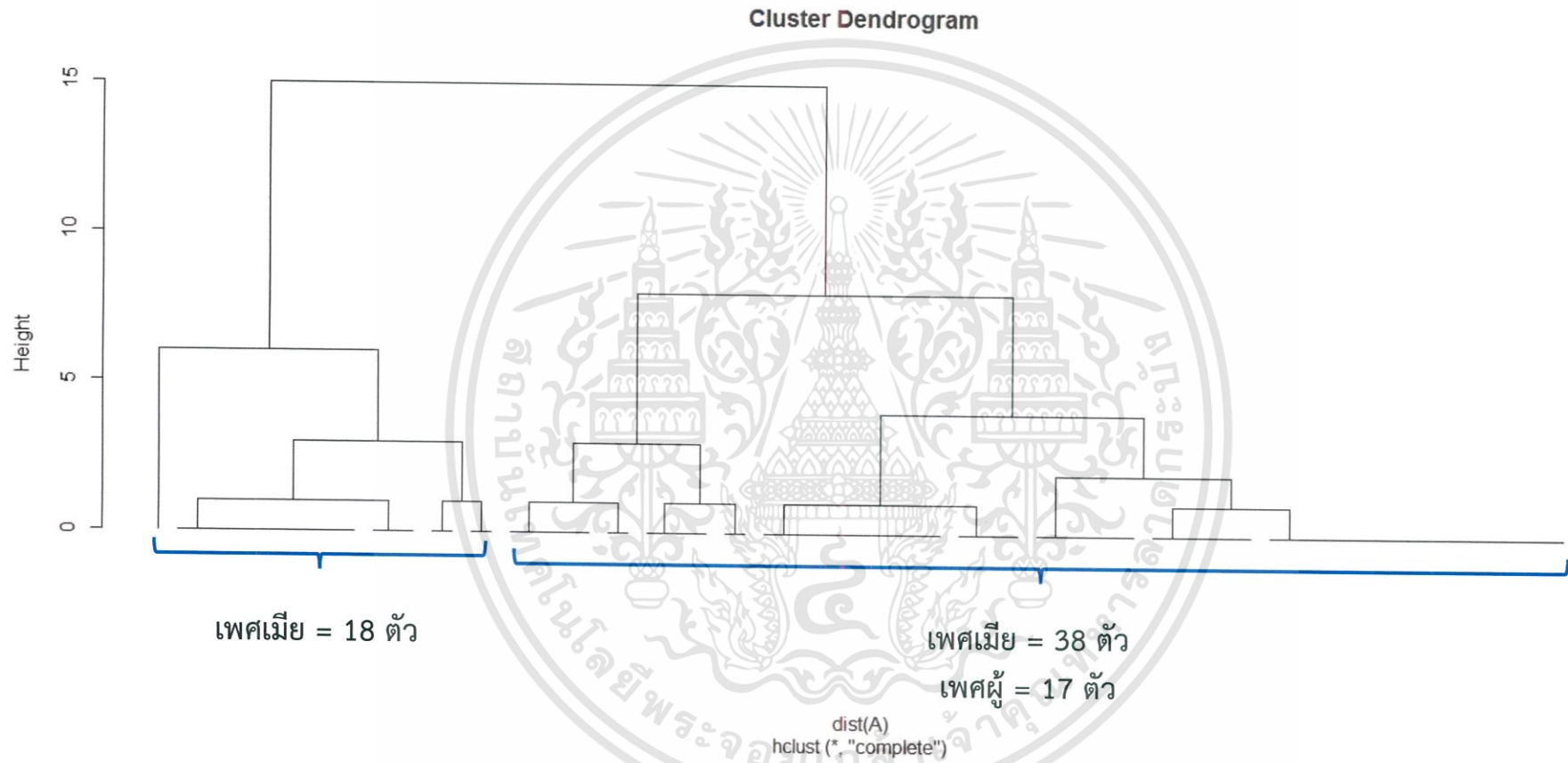
## 4.2 ผลการระบุเพศด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

จากการเก็บตัวอย่างนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่นจำนวน 76 ตัว มีนกหลุดไปขณะจับ 1 ตัว คือ NP227 จึงนำมาระบุเพศด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียง 75 ตัว โดยนำมาเก็บข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยาของนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่นทั้งหมด 7 ลักษณะ ได้แก่ ความยาวปีก ความยาวปาก ความยาวหัวปาก ความกว้างปาก ความยาวหน้าแข้ง ความยาวหาง และน้ำหนัก เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม R x64 3.4.0 เพื่อคัดเลือกหาลักษณะที่เหมาะสมกับการระบุเพศ พบว่าน้ำหนักและความยาวปีกมีความเหมาะสมสำหรับการระบุเพศมากที่สุด เนื่องจากสามารถแบ่งกลุ่มข้อมูลออกเป็น 2 กลุ่ม โดยแยกกลุ่มของเพศผู้และเพศเมียออกได้อย่างชัดเจน ดังรูปที่ 4.1 ตัวอย่าง Cluster Dendrogram ของความยาวปีก และ รูปที่ 4.2 ตัวอย่าง Cluster Dendrogram ของน้ำหนัก ส่วนอีก 5 ลักษณะไม่สามารถแยกกลุ่มของเพศผู้และเพศเมียออกได้อย่างชัดเจน ดังรูปที่ 4.3 ตัวอย่าง Cluster Dendrogram ของความกว้างปาก และรูปที่ 4.4 ตัวอย่าง Cluster Dendrogram ของความยาวหัวไปปาก ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของวรรณิกา และคณะ (2559) เนื่องจากในงานวิจัยได้กล่าวว่ น้ำหนักและความยาวปีก คือลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่เหมาะสมที่สุดในการระบุเพศ โดยจะพิจารณาน้ำหนักเป็นอันดับแรก ร่วมกับข้อมูลความยาวปีก โดยกรณีที่น้ำหนักมากกว่า 23.85 กรัม ความยาวปีกมากกว่า 80.50 มิลลิเมตร จะระบุเป็นเพศผู้ ถ้าความยาวปีกน้อยกว่าหรือเท่ากับ 80.50 มิลลิเมตร จะระบุเป็นเพศเมีย และกรณีที่น้ำหนักน้อยกว่าหรือเท่ากับ 23.85 กรัม ความยาวปีกมากกว่า 84.50 มิลลิเมตร จะระบุเป็นเพศผู้ ถ้าความยาวปีกน้อยกว่าหรือเท่ากับ 84.50 มิลลิเมตร จะระบุเป็นเพศเมีย แสดงดังตารางที่ 4.2 โดยในงานวิจัยนี้ได้ทำการระบุเพศจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา 2 ลักษณะ คือ ใช้น้ำหนักควบคู่กับความยาวปีก

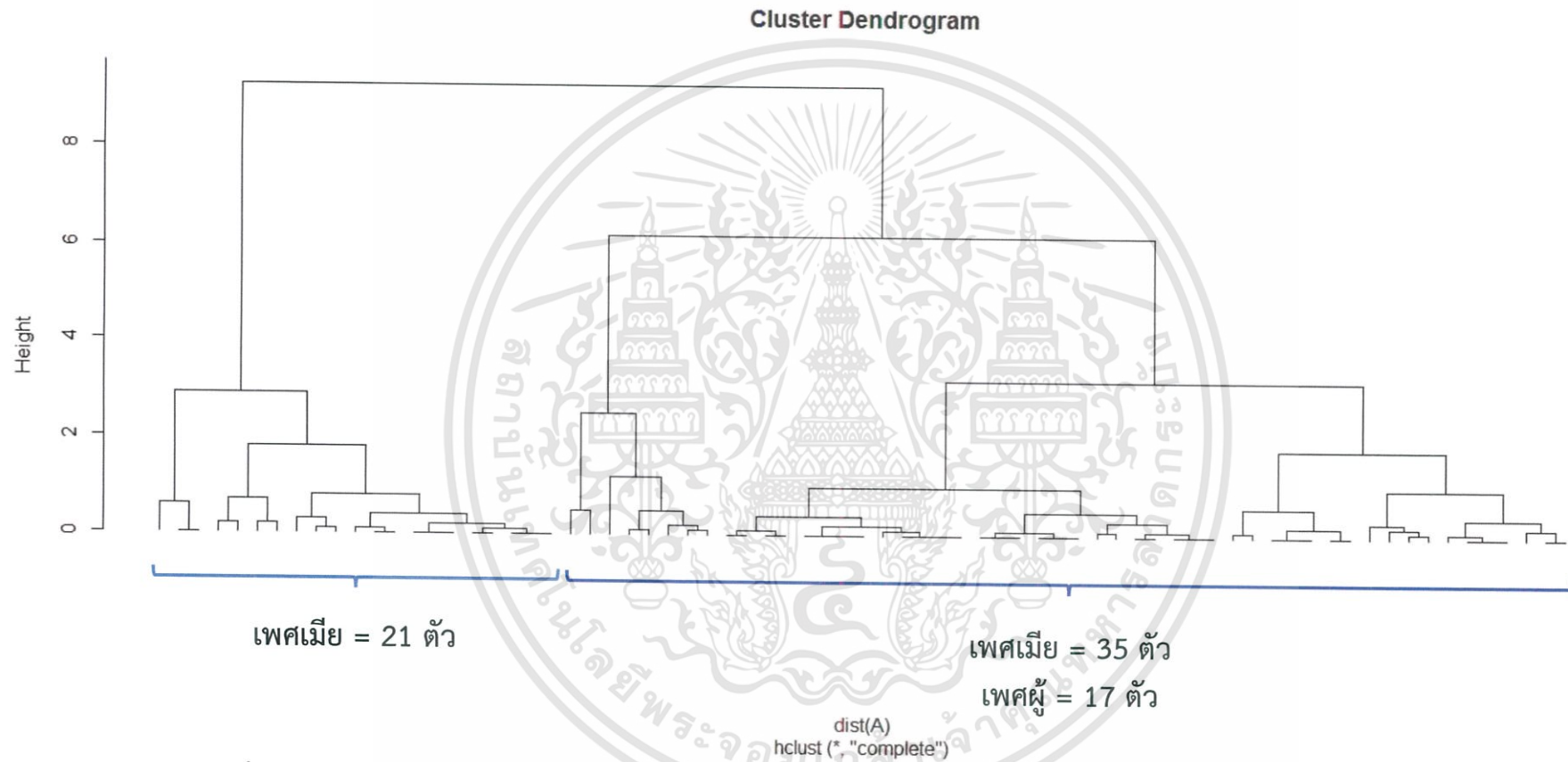
ตารางที่ 4.2 ค่าของน้ำหนักและค่าความยาวปีกในการระบุเพศด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา (วรรณิกา และคณะ, 2559)

น้ำหนัก (BW)	ความยาวปีก (MW)	แนวโน้มทางเพศ
> 23.85 กรัม	> 80.50 มิลลิเมตร	ผู้
	≤ 80.50 มิลลิเมตร	เมีย
≤ 23.85 กรัม	> 84.50 มิลลิเมตร	ผู้
	≤ 84.50 มิลลิเมตร	เมีย

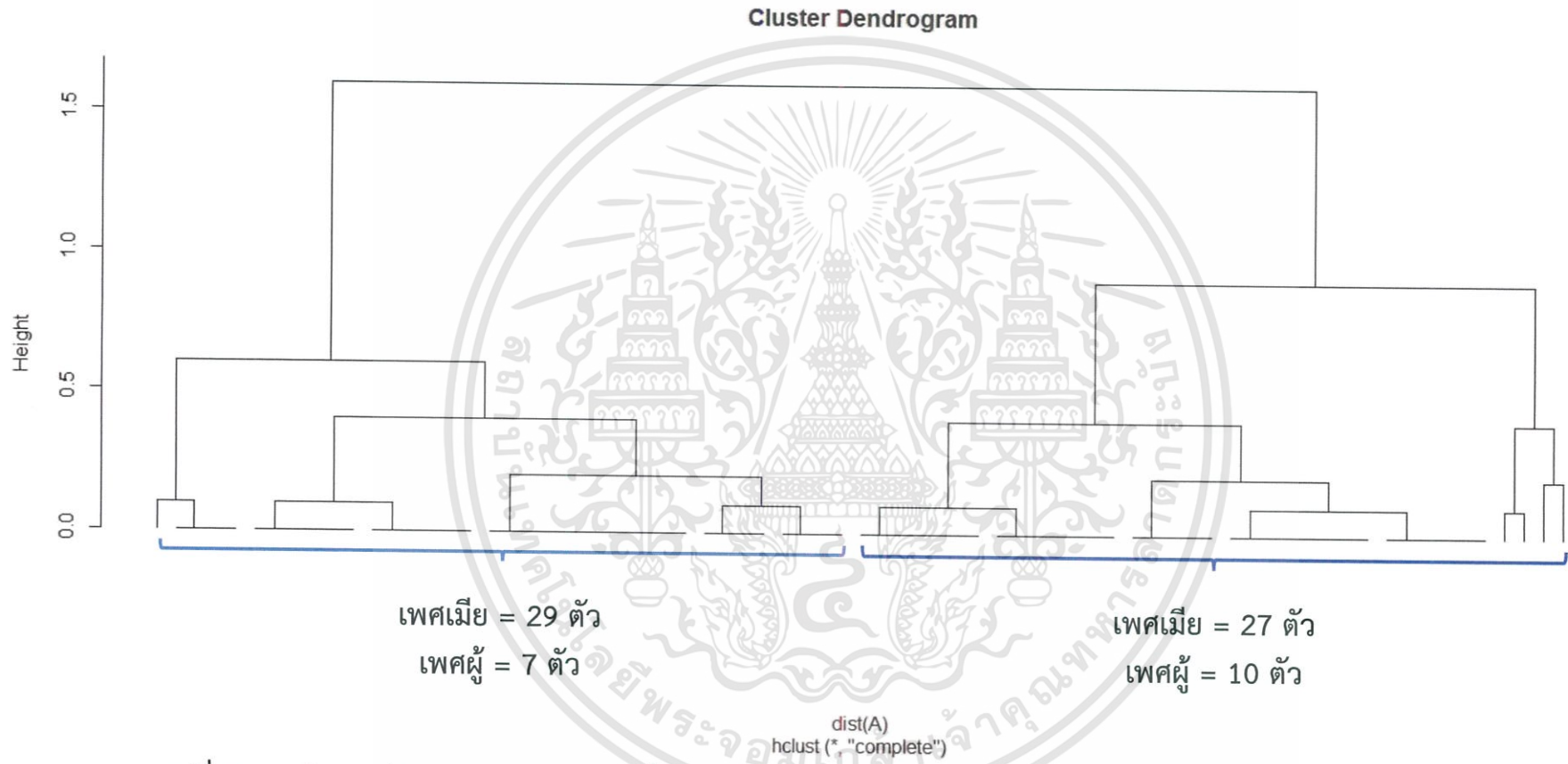
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.1 การวิเคราะห์ Cluster Dendrogram ที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม R x64 3.4.0 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเพศกับความยาวปีก



รูปที่ 4.2 การวิเคราะห์ Cluster Dendrogram ที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม R x64 3.4.0 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเพศกับน้ำหนัก



เพศเมีย = 29 ตัว  
 เพศผู้ = 7 ตัว

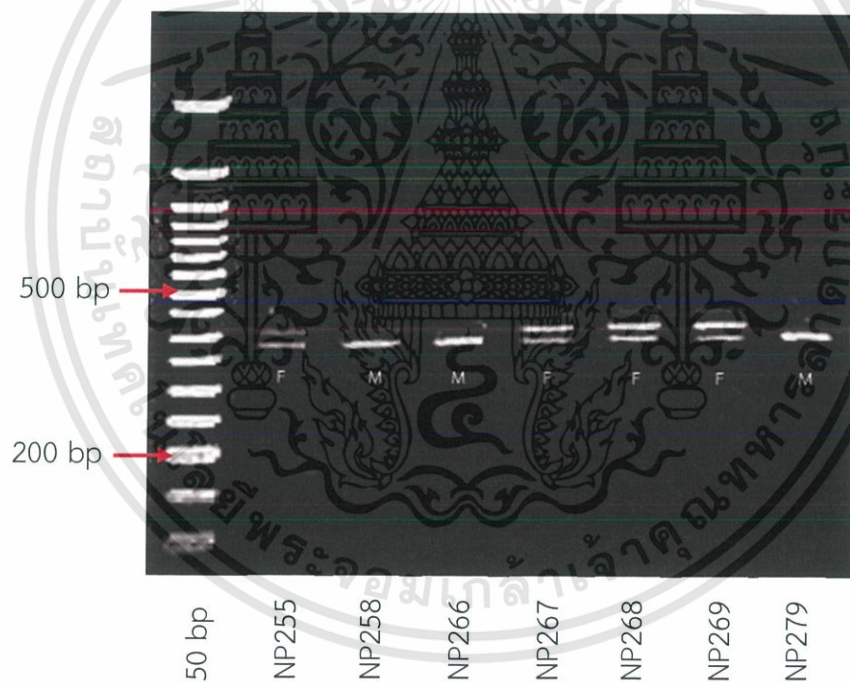
เพศเมีย = 27 ตัว  
 เพศผู้ = 10 ตัว

รูปที่ 4.3 การวิเคราะห์ Cluster Dendrogram ที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม R x64 3.4.0 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเพศกับความกว้างปาก



#### 4.3 ผลการระบุเพศนกด้วยเทคนิคระดับโมเลกุล

ในงานวิจัยนี้ทำการระบุเพศนก *A. orientalis* ได้จำนวน 73 ตัว เนื่องจากมี 1 ตัวที่นกหลุดไปขณะจับ และอีก 2 ตัว เป็นตัวอย่างที่เก็บด้วยกระดาษ FTA ซึ่งมีปริมาณเลือดน้อย จึงทำให้ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้โดยนำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ที่ตำแหน่งยีน *CHD* ด้วยไพรเมอร์ P2/P8 และนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์มาตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้เจลอะกาโรสความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่ปรากฏกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 50 คู่เบส ดังตัวอย่างในรูปที่ 4.5 แสดงตัวอย่างนกจำนวน 7 ตัวอย่าง สามารถทราบขนาดของแถบดีเอ็นเอตัวอย่างได้ โดยพบว่าเพศผู้จะแสดงแถบดีเอ็นเอ 1 แถบ คือ อัลลีล *CHD-Z* มีขนาดประมาณ 375 คู่เบส ได้แก่ตัวอย่าง NP258, NP266 และ NP279 และเพศเมียจะแสดงแถบดีเอ็นเอ 2 แถบ คือ อัลลีล *CHD-Z* มีขนาดประมาณ 375 คู่เบส และอัลลีล *CHD-W* มีขนาดประมาณ 400 คู่เบส ได้แก่ตัวอย่าง NP255, NP267, NP268 และ NP269 สอดคล้องกับงานวิจัยของ วิลาวลัย และคณะ (2558) ศึกษาการระบุเพศของนกพงในสกุล *Acrocephalus* ได้แก่ *A. orientalis* *A. bistrigiceps* *A. orinus* โดยใช้ไพรเมอร์ P2/P8 พบว่าอัลลีล *CHD-Z* มีขนาดประมาณ 370 คู่เบส และอัลลีล *CHD-W* มีขนาดประมาณ 390 คู่เบส สามารถระบุเป็นเพศผู้ 17 ตัว เพศเมีย 56 ตัว และไม่สามารถระบุเพศได้ 3 ตัว



รูปที่ 4.5 ผลการระบุเพศนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่นด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้เจลอะกาโรสความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 50 คู่เบส จำนวน 7 ตัวอย่าง กำหนดให้ M แทนเพศผู้ และ F แทนเพศเมีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.4 ผลการระบุเพศด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาเปรียบเทียบกับการระบุเพศด้วยเทคนิคระดับโมเลกุล

จากการระบุเพศนกฟงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่นด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาเปรียบเทียบกับการระบุเพศด้วยเทคนิคระดับโมเลกุล จำนวน 73 ตัว โดยจะพิจารณาน้ำหนักเป็นอันดับแรก ร่วมกับข้อมูลความยาวปีก ในกรณีที่น้ำหนักมากกว่า 23.85 กรัม ความยาวปีกมากกว่า 80.50 มิลลิเมตร จะระบุเป็นเพศผู้ ถ้าความยาวปีกน้อยกว่าหรือเท่ากับ 80.50 มิลลิเมตร จะระบุเป็นเพศเมีย และในกรณีที่น้ำหนักน้อยกว่าหรือเท่ากับ 23.85 กรัม ความยาวปีกมากกว่า 84.50 มิลลิเมตร จะระบุเป็นเพศผู้ ถ้าความยาวปีกน้อยกว่าหรือเท่ากับ 84.50 มิลลิเมตร จะระบุเป็นเพศเมีย ซึ่งค่าความผิดพลาดคิดเป็นร้อยละ 10.96 แสดงผลดังตารางที่ 4.3 จึงสอดคล้องกับงานวิจัยของ วรณิภา และคณะ (2559) ซึ่งค่าความผิดพลาดคิดเป็นร้อยละ 10.10

ตารางที่ 4.3 ผลการระบุเพศด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาเปรียบเทียบกับการระบุเพศด้วยเทคนิคระดับโมเลกุล

น้ำหนัก (BW)	ความยาวปีก (MW)	แนวโน้ม ทางเพศ	ผลการระบุเพศ		ค่าความ ผิดพลาด (ตัว)	ค่าความ ผิดพลาด (ร้อยละ)
			เพศผู้ (ตัว)	เพศเมีย (ตัว)		
>23.85 กรัม	> 80.50 มิลลิเมตร	ผู้	11	3	3	10.96
	≤ 80.50 มิลลิเมตร	เมีย	0	2	0	
≤23.85 กรัม	> 84.50 มิลลิเมตร	ผู้	2	1	1	
	≤ 84.50 มิลลิเมตร	เมีย	4	50	4	
รวม			17	56	8	

เมื่อทดสอบแบบจำลองสำหรับการระบุเพศโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเปรียบเทียบกับ การระบุเพศด้วยเทคนิคระดับโมเลกุล จากทั้งหมด 73 ตัวอย่าง พบว่า การใช้ช่วงลักษณะของความยาวปีกระบุเพศเพียงลักษณะเดียวให้ผลไม่สอดคล้องกับผลทางโมเลกุล 22 ตัว คิดเป็นค่าความผิดพลาดร้อยละ 30.14 เมื่อใช้ช่วงของน้ำหนักระบุเพศเพียงลักษณะเดียวให้ผลไม่สอดคล้องกับผลทางโมเลกุล 9 ตัว คิดเป็นค่าความผิดพลาดร้อยละ 15.07 แต่เมื่อใช้ช่วงของน้ำหนักควบคู่กับความยาวปีกให้ผลไม่สอดคล้องกับผลทางโมเลกุล 8 ตัว คิดเป็นค่าความผิดพลาดร้อยละ 10.96 แสดงดัง ตารางที่ 4.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 ค่าร้อยละการเปรียบเทียบระหว่างผลการระบุเพศด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ สอดคล้องกับผลการระบุเพศด้วยเทคนิคระดับโมเลกุล

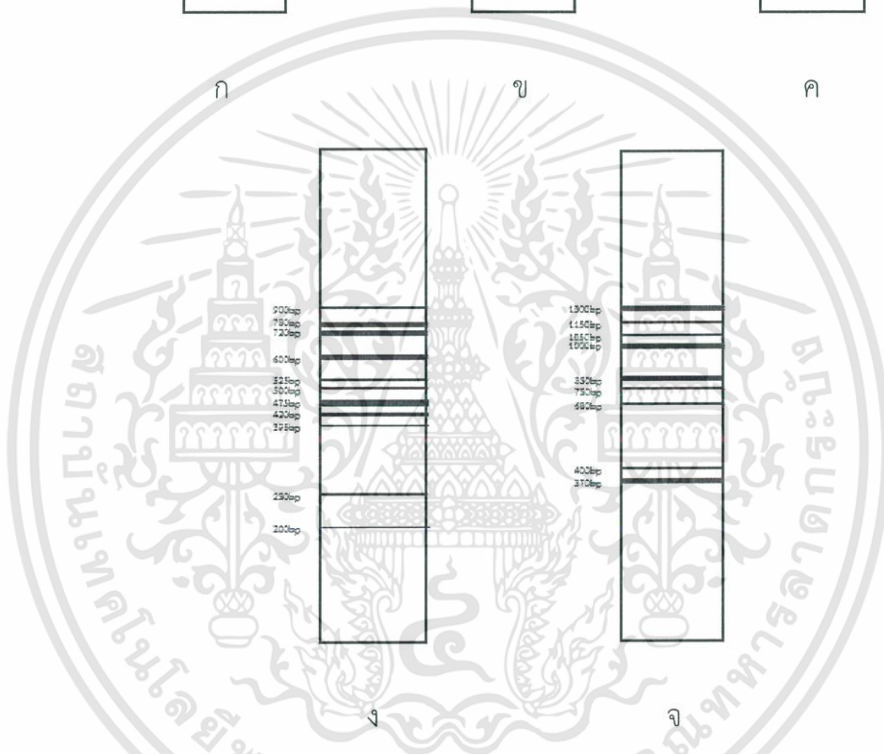
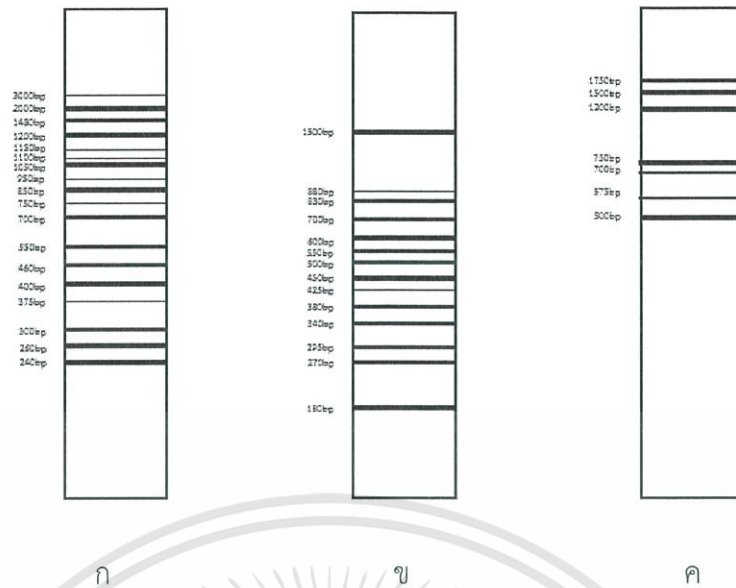
ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	จำนวน (ตัว)	สอดคล้องกับผลทางโมเลกุล (ตัว)	ไม่สอดคล้องกับผลทางโมเลกุล (ตัว)	ร้อยละความถูกต้อง	ร้อยละความผิดพลาด
ความยาวปีก	73	51	22	69.86	30.14
น้ำหนัก	73	62	11	84.93	15.07
ความยาวปีกควบคู่น้ำหนัก	73	65	8	89.04	10.96

เนื่องจากค่าในการระบุเพศด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยน้ำหนักสามารถกระทำได้ค่อนข้างยากจึงได้ทำการทดสอบหาค่าน้ำหนักที่เหมาะสมเพื่อให้การระบุเพศทางภาคสนามทำได้สะดวกขึ้น โดยใช้ค่าน้ำหนักที่ใกล้เคียงกับค่าเดิมพบว่า เมื่อเปลี่ยนแปลงค่าน้ำหนักจาก 23.85 กรัม ให้เป็น 23.80 กรัม หรือ 23.90 กรัม เมื่อได้ทำการทดสอบหาค่าน้ำหนักที่เหมาะสม พบว่าค่าน้ำหนักทั้ง 2 ยังคงให้ค่าความผิดพลาดตรงกับค่าความผิดพลาดเดิม ซึ่งให้ค่าความผิดพลาดของน้ำหนักทั้ง 23.80 และ 23.90 คิดเป็นร้อยละ 10.96

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.5 ผลการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายทางโมเลกุล inter Primer Binding Site (iPBS)

จากการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการคัดเลือกไพรเมอร์ของ วรณิภา และคณะ (2559) เรื่องการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายทางโมเลกุล inter Primer Binding Site โดยใช้ทั้งหมด 6 ไพรเมอร์ คือ 2074, 2242, 2251, 2252, 2253 และ 2402 ทำการศึกษาทั้งหมด 3 สถานที่ ได้แก่ แหลมตาเส็ง เกาะตาเรือ และทางเข้าประมงเชิงพาณิชย์ ให้ผลว่าไม่มีความสัมพันธ์กับสถานที่และช่วงเวลาการเก็บตัวอย่าง ในงานวิจัยนี้ทำการคัดเลือกมาทั้งหมด 5 ไพรเมอร์ โดยคัดเลือกจากไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอชัดเจนและหลากหลาย คือ ไพรเมอร์ 2242 ( $T_a = 57.0$  องศาเซลเซียส) 2251 ( $T_a = 53.2$  องศาเซลเซียส) 2252 ( $T_a = 51.6$  องศาเซลเซียส) 2253 ( $T_a = 51.0$  องศาเซลเซียส) 2402 ( $T_a = 50.0$  องศาเซลเซียส) และสุ่มตัวอย่างที่เก็บจากบริเวณเขตห้ามล่าสัตว์ป่าบึงบอระเพ็ด 30 ตัวอย่าง จาก 4 สถานที่ ได้แก่ แหลมตาเส็ง เกาะตาเรือ ซึ่งเป็นสถานที่เดียวกับงานวิจัยของวรณิภา และคณะ (2559) และสถานที่ใหม่ คือ หน้าวัดสโมสร ทำข้าวกำนันทรง นำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) กับทั้ง 5 ไพรเมอร์ที่เลือกไว้ตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยพบว่าแถบดีเอ็นเอของแต่ละตัวอย่างที่เกิดขึ้นจะมีความแตกต่างกันในบางตำแหน่ง ซึ่งแสดงถึงความหลากหลาย ดังรูปที่ 4.6 ก-จ แสดงตัวอย่างแบบจำลองแถบดีเอ็นเอของไพรเมอร์ 2242, 2251, 2252, 2253, 2402 ที่ใช้วิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายทางโมเลกุล iPBS



รูปที่ 4.6 แบบจำลองแถบดีเอ็นเอของไพรเมอร์ (ก) 2242 (ข) 2251 (ค) 2252 (ง) 2253 (จ) 2402 ที่ใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายทางโมเลกุล iPBS

นำแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏขึ้นทั้งหมดมาวิเคราะห์ผลโดยแปลผลแถบดีเอ็นเอด้วยการให้ค่าคะแนน เมื่อปรากฏแถบดีเอ็นเอขึ้นจะให้คะแนนเป็น 1 และหากไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอให้คะแนนเป็น 0 ซึ่งจะเรียกการให้คะแนนลักษณะนี้ว่า Binary และวิเคราะห์ผลหาจำนวน Polymorphic band และหาร้อยละของ Polymorphic band ได้ผลดังตารางที่ 4.5 โดยมีจำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 60 แถบมีขนาดระหว่าง 180 -3000 คู่เบส แบ่งเป็นชนิด Polymorphic band จำนวน 55 แถบ คิดเป็นร้อยละ 91.67 และ Monomorphic band จำนวน 5 แถบ คิดเป็นร้อยละ 8.33

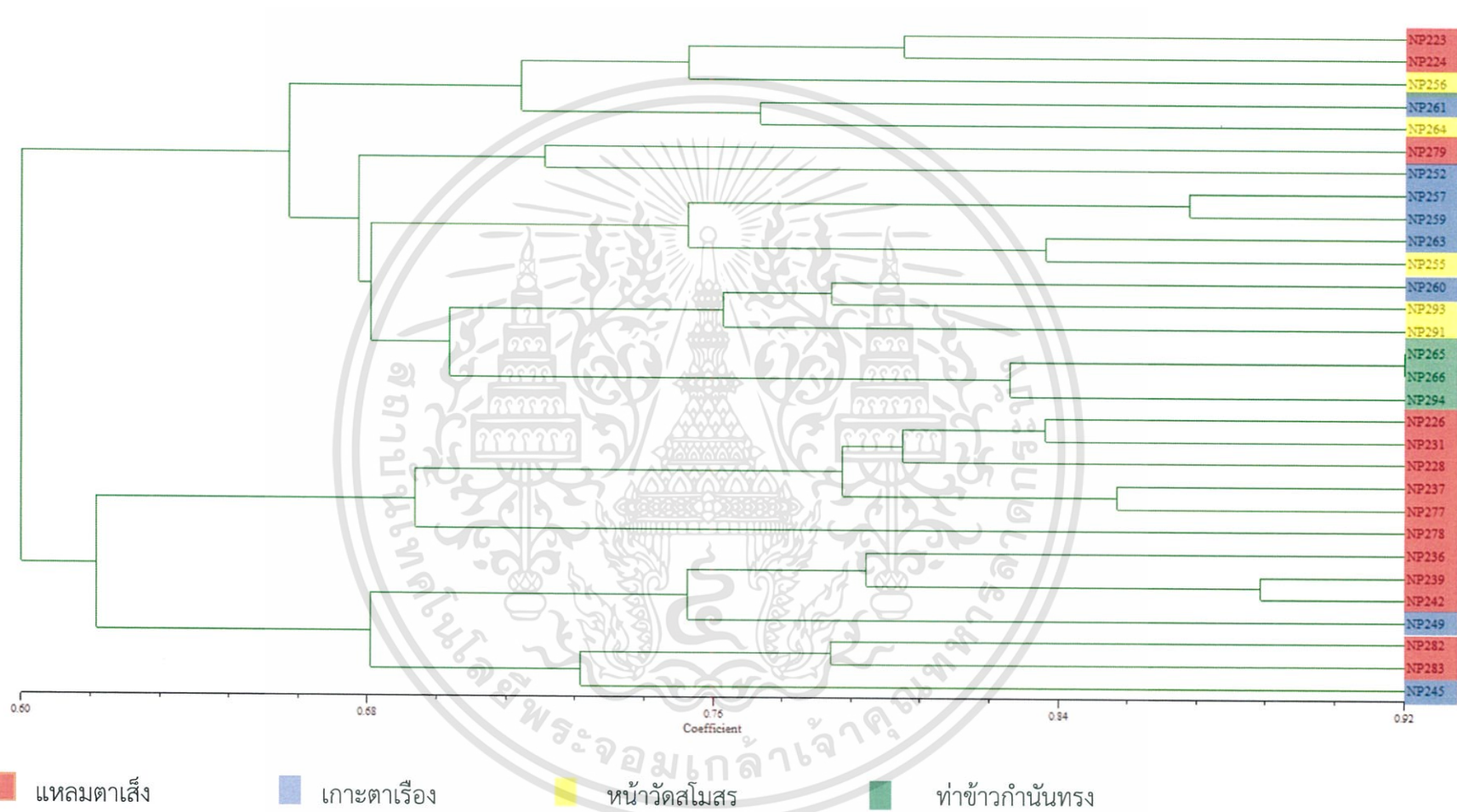
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 ชนิดไพรเมอร์ และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในนกฟงใหญ่ พันธุ์ญี่ปุ่นจำนวน 30 ตัวอย่าง ด้วยเครื่องหมายทางโมเลกุล iPBS

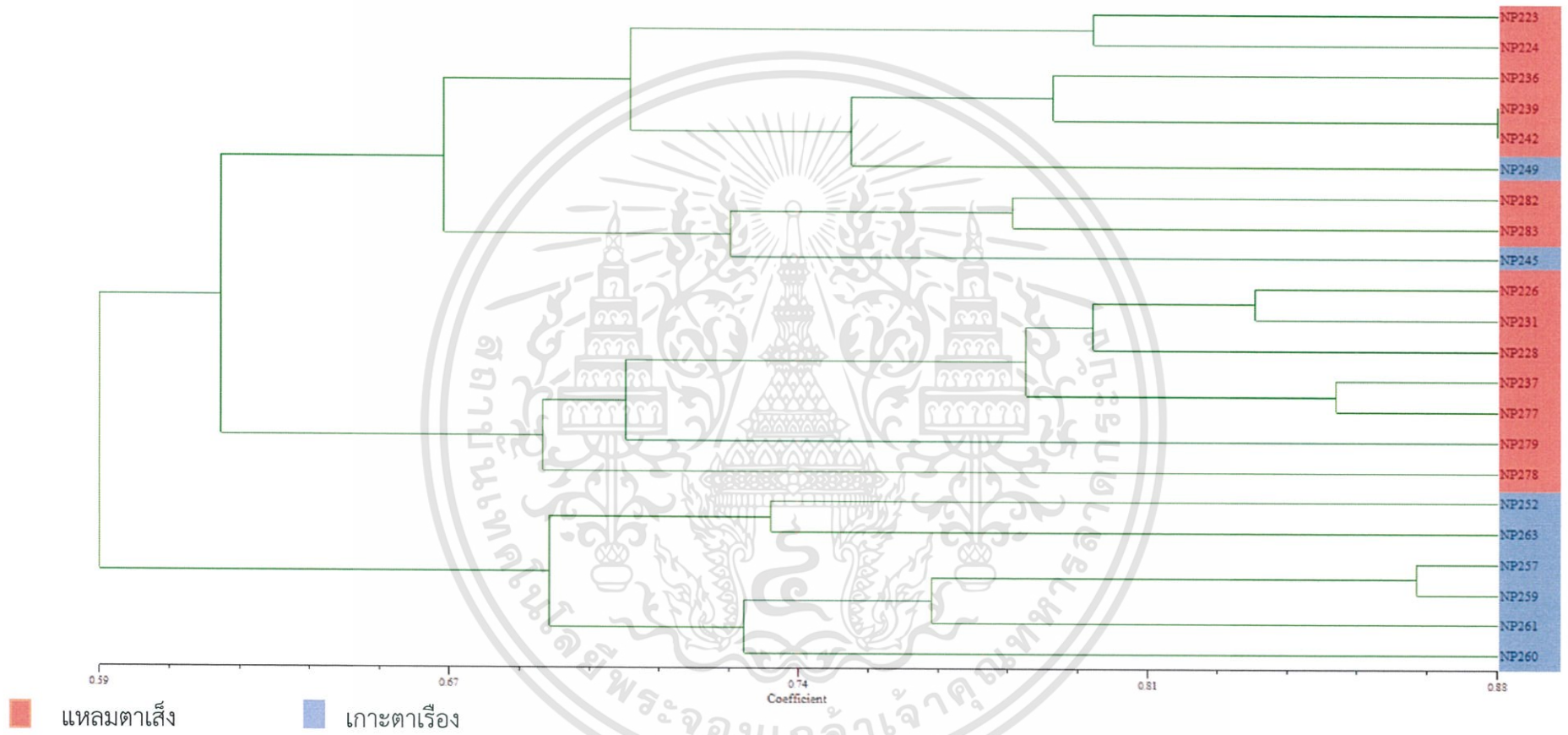
Primer	จำนวน แถบ ทั้งหมด	แถบ Monomorphic	แถบ Polymorphic	Monomorphism (ร้อยละ)	Polymorphism (ร้อยละ)
2242	18	1	17	5.56	94.44
2251	14	1	13	7.14	92.86
2252	7	0	7	0	100
2253	11	1	10	9.09	90.91
2402	10	2	8	20	80
รวม	60	5	55	8.33	91.67

จากการแปลผลแถบดีเอ็นเอโดยการให้คะแนนในลักษณะ Binary สามารถนำไปวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรม NTSYSpc 2.1X และสร้างเป็นแผนภูมิความสัมพันธ์ (Dendrogram) ซึ่งเลือกวิธีการจัดแบบ Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Average (UPGMA) พบว่าเมื่อเปรียบเทียบความสัมพันธ์จากการสุ่มตัวอย่างจำนวน 30 ตัวอย่าง ปรากฏค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์หรือความใกล้ชิดกัน (Similarity coefficient) อยู่ระหว่าง 0.60 - 0.92 โดยที่ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนเท่ากับ 0.60 สามารถแบ่งนกฟงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่นได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 กลุ่มตัวอย่างจากสถานที่เก็บบริเวณบนบก ได้แก่ ตัวอย่างจากหน้าวัดสโมสรมและท่าข้ามกำนันทรง กลุ่มที่ 2 กลุ่มตัวอย่างจากสถานที่เก็บบริเวณบึงหรือน้ำ ได้แก่ ตัวอย่างจากแหลมตาเส็งและเกาะตาเรือ จึงยกกลุ่มตัวอย่างที่ 2 จำนวน 22 ตัวอย่าง เนื่องจากเป็นกลุ่มตัวอย่างที่มีแนวโน้มในการเกาะกลุ่มกันมากที่สุดมาวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรม NTSYSpc 2.1X และสร้างเป็นแผนภูมิความสัมพันธ์ ซึ่งเลือกวิธีการจัดแบบ UPGMA อีกครั้งพบว่า ตัวอย่างสามารถแยกออกได้อย่างชัดเจนระหว่าง 2 สถานที่ คือ แหลมตาเส็ง และเกาะตาเรือ ตามสถานที่ ยกเว้น 2 ตัวอย่าง คือ NP245 และ NP249 ดังรูปที่ 4.8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.7 แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ (Dendrogram) ของนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่นจำนวน 30 ตัว ด้วยโปรแกรม NTSYSpc 2.1x เลือกรหัสจัดแบบ Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Average (UPGMA)



รูปที่ 4.8 แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ (Dendrogram) ของนกฟงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่นจำนวน 22 ตัว ด้วยโปรแกรม NTSYSpc 2.1x เลือกวิธีจัดแบบ Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Average (UPGMA)

## สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

### 5.1 สรุปผลการวิจัย

จากงานวิจัยของ วรณนิภา และคณะ (2559) ได้ทำการศึกษานกพงในสกุล *Acrocephalus* คือ นกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น (*Acrocephalus orientalis*) ซึ่งเป็นนกที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาเหมือนกันทั้งเพศผู้และเพศเมียในขณะอพยพมาประเทศไทย อีกทั้งระบุว่า ลักษณะทางสัณฐานวิทยาบางลักษณะสามารถระบุเพศได้โดยวิเคราะห์น้ำหนักควบคู่กับความยาวปีกในการระบุเพศ ซึ่งให้ค่าความผิดพลาดอยู่ที่ร้อยละ 10.10 และใช้เทคนิคทางโมเลกุลเพื่อทำการยืนยันผลความถูกต้องของการระบุเพศทางสัณฐานวิทยา โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR ที่บริเวณตำแหน่งของยีน *CHD* ด้วยไพรเมอร์ P2/P8 ( $T_m = 53$  องศาเซลเซียส) และนำไปตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส ผลคือเพศผู้พบแถบดีเอ็นเอ 1 แถบ มีขนาดประมาณ 375 คู่เบสของอัลลีล *CHD-Z* ส่วนเพศเมียพบแถบดีเอ็นเอ 2 แถบ มีขนาดประมาณ 375 คู่เบสของอัลลีล *CHD-Z* และขนาดประมาณ 400 คู่เบสของอัลลีล *CHD-W* โดยตัวอย่างนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่นมีทั้งหมด 76 ตัวอย่าง พบว่าสามารถระบุเพศได้ 73 ตัว คิดเป็นร้อยละ 96.05 แบ่งเป็นเพศผู้ 17 ตัว คิดเป็นร้อยละ 23.29 เพศเมีย 56 ตัว คิดเป็นร้อยละ 76.71 และไม่สามารถระบุเพศจนได้จำนวน 3 ตัวอย่าง เนื่องจากมี 1 ตัวที่ปีกหลุดไปขณะจับ และอีก 2 ตัวเป็นตัวอย่างที่เก็บด้วยกระดาษ FTA ซึ่งมีปริมาณเลือดน้อย จึงทำให้ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้โดยนำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ คิดเป็นร้อยละ 3.95 และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างการระบุเพศด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยากับการระบุเพศด้วยเทคนิคระดับโมเลกุลพบว่ายังคงให้ค่าความผิดพลาดอยู่ที่ร้อยละ 10.96

สำหรับการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่นจาก 4 สถานที่ คือ แหลมตาเส็ง เกาะตาเรือ หน้าวัดสโสมสร และท่าข้าวกำนันทรง จำนวนทั้งหมด 30 ตัวอย่าง ด้วยเครื่องหมายทางโมเลกุล iPBS โดยใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 5 ไพรเมอร์ คือ ไพรเมอร์ 2242, 2251, 2252, 2253 และ 2402 พบว่า ความหลากหลายทางพันธุกรรมมีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน (Similarity coefficient) ระหว่าง 0.60-0.92 ที่ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนเท่ากับ 0.60 สามารถแบ่งกลุ่มตัวอย่างได้ 2 กลุ่มอย่างชัดเจนระหว่างกลุ่มตัวอย่างที่เก็บจากบริเวณบนบก (หน้าวัดสโสมสร และท่าข้าวกำนันทรง) กับกลุ่มตัวอย่างที่เก็บบริเวณบึงหรือในน้ำ (แหลมตาเส็ง และเกาะตาเรือ) โดยมีความสัมพันธ์กับสถานที่เก็บตัวอย่าง

### 5.2 ข้อเสนอแนะ

สำหรับการระบุเพศนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา คือน้ำหนักควบคู่กับความยาวปีก พบว่ายังคงผิดพลาดที่ร้อยละ 10.96 คงเดิม แสดงให้เห็นว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่นำมาใช้นี้มีความน่าเชื่อถือ สามารถนำไปใช้ระบุเพศของนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่นภาคสนามได้เพื่อความสะดวก และรวดเร็ว ด้านการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่นด้วยเครื่องหมายทางโมเลกุล iPBS ควรเก็บตัวอย่างในแต่ละสถานที่ให้มีอัตราส่วนที่เหมาะสมเพื่อนำไปวิเคราะห์ข้อมูลในการยืนยันความถูกต้องของผลการวิจัย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## เอกสารอ้างอิง

- กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม. 2553. นกอพยพ. กรุงเทพมหานคร : กรมป่าไม้.
- เกชา ชีวاجر. 2552. การดักจับนกในธรรมชาติโดยตาข่ายพราง (Mist net). ศูนย์เฝ้าระวังและติดตามโรคจากสัตว์ป่า สัตว์ต่างถิ่น และสัตว์อพยพ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. 3-4.
- เกษรา คงกล้า, ญัฐกุล ถิ่นหัวเตย และธัญลักษณ์ มาลัยทัศน. 2557. “การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค iPBS และการระบุเพศของนกปรอทหัวโขน (*Pycnonotus jocosus*).” วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- เกรียงศักดิ์ ศรีบรรอด. 2551. การศึกษาชนิด และประชากรของนกบริเวณป่าชายเลนในภาคใต้ตอนบนของประเทศไทย. กรุงเทพมหานคร : กลุ่มงานวิจัยสัตว์ป่า สำนักอนุรักษ์สัตว์ป่า กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช.
- เจษฎา. 2559. นกในประเทศไทย. [Online]. เข้าถึงได้จาก : <http://pirun.ku.ac.th/~b5310302271/นกที่พบในประเทศไทย.html>.
- เฉลิมชาติ สมเกิด, ขวัญเรือน ดวงสะอาด, ตูลยวรรช สุทธิแพทย์ และณัฐวุฒิ สติตเมธี. 2548. เทคนิคที่ไม่ก่อให้เกิดอันตรายแก่ตัวสัตว์สำหรับการสกัดดีเอ็นเอและการตรวจแยกเพศในนก.
- ชนาธิป ธรรมการ. 2552. “การแยกเพศในนกสวยงาม.” *วารสารสัตวแพทย์ผู้ประกอบการบำบัดโรคสัตว์แห่งประเทศไทย*. 64-68.
- ชิตู สอนสา, ไกรรัตน์ เอี่ยมอำไพ และสมชาย นิ่มนวล. 2554. เทคนิคการจับนกด้วยท่อส่งตาข่าย (Cannon Net) ในประเทศไทย. ในผลงานวิจัย และรายงานความก้าวหน้างานวิจัย ประจำปี 2553. กลุ่มงานวิจัยสัตว์ป่า สำนักอนุรักษ์สัตว์ป่า กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช. กรุงเทพฯ. หน้า 113-123.
- ณิชภัทร ขอบอารมณ์, ไกรรัตน์ เอี่ยมอำไพ, สมชาย นิ่มนวล, ชิตู สอนสา และสุพัตรา โพธิ์เอี่ยม. 2556 การระบุเพศและความหลากหลายทางพันธุกรรมในนกสกุล *Charadrius* โดยใช้ยีน *CHD*. กลุ่มงานวิจัยสัตว์ป่า สำนักอนุรักษ์สัตว์ป่า กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช กรุงเทพมหานคร. 141-149.
- ธัญญการย์ ศรีวรรมาศ และธารินี ไชยวงศ์. 2554. “การตรวจหาเชื้อรา *Cryptococcus neoformans* จากมูลนก ภายในบริเวณมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี.” *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี*. 13(4) : 14-21.
- บุญส่ง เลชะกุล. 2550. *นกเมืองไทย*. ครั้งที่ 1. เขตจตุจักร กรุงเทพมหานคร : ด่านสุทธาการพิมพ์.
- มงคล ไชยภักดี และวัลยา ชนิดดาวงค์. 2549. “ความหลากหลายชนิดของนกในพื้นที่ชุ่มน้ำอ่าวไทยตอนในบริเวณเขตบางขุนเทียน กรุงเทพมหานคร.” กลุ่มงานวิจัยสัตว์ป่า สำนักอนุรักษ์สัตว์ป่า กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช. กรุงเทพฯ. 14-25.
- รุ่งโรจน์ จุกมงคล. 2549. *ดูนก*. ครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานคร : เจ.ฟิล์ม โพรเซส.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## เอกสารอ้างอิง(ต่อ)

- วรรณิภา วิศว์วิสุทธิ์, วิภาวดี กองสุข และวุฒิชัย พงศาปาน. 2559. “การระบุเพศและการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ นกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่นด้วยเทคนิคทางโมเลกุล.” วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- วิภารัตน์ ศิริพงษ์. 2558. “การระบุเพศและความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกในสกุลตีนเทียน.” วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- วิลาวัลย์ บัณฑิตพรรณ, สุภานัน สุขศิริ และอรณิข ดิลลิตวิเว. 2558. “การระบุเพศนกพงบางชนิด และการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น (*Acrocephalus orientalis*)” วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- สุภัตรา โพธิ์เอี่ยม ณิชภัทร ขอบอาภรณ์ ตฤณ เศรษฐ์ วีระพันธุ์ นาดสุตา พุทธิรักษ์ และอนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม. 2012. “การระบุเพศในนกแก้วบางชนิด”. *Thai journal of genet* 5 : 194–202.
- โองการ วณิชชีวะ และเฟื่องฟ้า สีสร้อย. 2557. “การสร้างรูปแบบดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องหมายเอสอาร์เอฟพีและไอพีบีเอสของไผ่รวกสยาม (*Thyrsostachys siamensis*)” วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนคร. 3(1) : 45-56.
- โอบาส ขอบเขตต์. 2541. *นกในบึงบอระเพ็ด*. กรุงเทพมหานคร : กองประสานการจัดการทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม สำนักงานนโยบายและแผนสิ่งแวดล้อม.
- โอบาส ขอบเขตต์. 2544. *นกในเมืองไทย เล่ม 5*. กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์สารคดี.
- Dorrestei, G.M. 1996. *Manual of psittacine birds*. United Kingdom : British small animal veterinary association.
- DuBiec, A. and Neubauer, M.Z. 2006. “Molecular technique for sex identification in birds.” *Biological letters*. 43 : 3-12.
- Morinhaa, F., Cabral, J.A. and Bastosa, E. 2012. “Molecular sexing of birds: a comparative review of polymerase chain reaction (PCR)-based methods” *Theriogenology*. 703–714.
- 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. and Tiwari, B. 1995. “Sex of the last wild spix’s macaw.” *Nature*. 375-454.
- Griffiths, R. and Korn, R.M. 1997. “A *CHD1* gene is Z chromosome linked in the chicken *Gallus domesticus*.” *Gene*. 197 : 225-229.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## เอกสารอ้างอิง(ต่อ)

Izabela, K., Dariusz, J. and Wojczulanis-Jakubas, K. 2013.

“Sex discrimination in the Savi's Warbler (*Locustella luscinioides*) using morphometric traits.” *Ornis fennica*. 90 : 203-210.

Chun-Llee, J., Li-Chin, T., Pei-Yi, H., Chia-Ling, C., Alex, H., Shih-Chien, C.,

Lih-Chiann, W., Jun-Tsong, L., Adrian, L. and Hsing-MeiHsieh. 2010. “A novel strategy for avian species and gender identification using the *CHD* gene.” *Molecular and cellular probes*. 27-31.

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” *The auk*. 115: 1074-1078.

Kalendar, R., Antonius, K., Smykal, P. and Schulman, A.H. 2010. “iPBS: a universal method for DNA fingerprinting and retrotransposon isolation.” *Theorem application genetic*. 121(8) : 1419-1430.

Lucky, O., Omoigui, M. F., Ishiyaku, B., Ousmane, B.S., Gowda and Timko, M. P. 2011.

“Application of fast technology for analysis (FTA) for sampling and recovery of deoxyribonucleic acid (DNA) for molecular characterization of cowpea breeding lines for *Striga* resistance” *African journal of biotechnology*. 10(85) : 19681-19986.

Nisbet, I.C.T. and Medway, L. 1972. “Dispersion, population ecology, and migration of eastern great reed warblers (*Acrocephalus orientalis*) wintering in Malaysia.” *Interdisciplinary biological sciences*. 114 : 451-495.

Nota, O. And Takenaka 1999. “DNA extraction from urine and sex identification of birds” *Molecular ecology*. 8 : 1237-1238.

[Online]. Available : <http://oknation.nationtv.tv/blog/plains-wanderer/2012/09/23/entry-1>  
(18 December 2017)

[Online]. Available : <http://birdsofthailand.org/bird/oriental-reed-warbler>  
(18 December 2017)

[Online]. Available : [http://lowernorthernbird.com/checklist.php?cat\\_id=34&c\\_id=483](http://lowernorthernbird.com/checklist.php?cat_id=34&c_id=483)  
(21 December 2017)

[Online]. Available : <http://www.capitolscientific.com/Whatman-WB100014-FTA-Bloodstain-Card-Pack-of-100>  
(13 June 2018)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## เอกสารอ้างอิง(ต่อ)

- [Online]. Available : [https://www.researchgate.net/figure/The-iPBS-scheme-For-iPBS-two-retrotransposons-must-be-in-opposite-orientation-and\\_fig1\\_45152062](https://www.researchgate.net/figure/The-iPBS-scheme-For-iPBS-two-retrotransposons-must-be-in-opposite-orientation-and_fig1_45152062)  
(13 June 2018)
- [Online]. Available : [https://www.en.wikipedia.org/wiki/File:Pair\\_of\\_mandarin\\_ducks.jpg](https://www.en.wikipedia.org/wiki/File:Pair_of_mandarin_ducks.jpg)  
(13 June 2018)
- [Online]. Available : <http://www.oknation.nationtv.tv/blog/nokkhhao-toziro>  
(22 June 2018)
- [Online]. Available : <http://wildlensinc.org/pining-field-puerto-rico/>  
(23 June 2018)
- [Online]. Available : <https://www.maintracgroup.com/products/mist-net>  
(23 June 2018)
- [Online]. Available : <http://www.doh.go.th:88/dohphetchabun/index.php>  
(23 June 2018)
- [Online]. Available : <https://www.nanagarden.com/product/168170>  
(23 June 2018)
- [Online]. Available : <https://www.fieldandcamping.com/pdetails.php?pdcode=00598>  
(23 June 2018)
- [Online]. Available : <https://www.uteeni.com/th/listings/1949738>  
(23 June 2018)
- [Online]. Available : <http://www.ecoanimalsthailand.com>  
(23 June 2018)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ก

ตารางภาคผนวกที่ ก-1 สถานที่เก็บตัวอย่าง วันที่เก็บตัวอย่าง รหัสที่ใช้ในการวิเคราะห์ รหัสห้วงขา ความยาวปีก ความยาวหัวปาก ความยาวปาก ความกว้างปาก ความยาวหน้าแข้ง ความยาวหาง น้ำหนัก และผลการระบุเพศของนกฟองใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่นจำนวนทั้งหมด 76 ตัว

สถานที่เก็บตัวอย่าง	วันที่	รหัสที่ใช้วิเคราะห์	รหัสห้วงขา	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา						น้ำหนัก (กรัม)	ผลการระบุเพศทางโมเลกุล	
				ความยาว (มิลลิเมตร)					หาง			
				ปีก	หัวปาก	ปาก	ปากกว้าง	หน้าแข้ง				
แหลมตาเส็ง	8 ธันวาคม 2560	NP219	3A21781	85	43.7	21.5	5.3	28.0	74	24.0	ผู้	
		NP220	3A21315	88	43.8	21.8	4.4	29.6	75	24.6	ผู้	
		NP221	3A08960	81	42.4	21.0	4.9	33.6	76	23.2	ผู้	
		NP222	3A21783	86	45.1	24.0	4.9	29.0	79	23.2		
		NP223	3A21782	83	44.2	25.3	4.6	28.9	75	23.6	เมีย	
		NP224	3A21784	79	45.1	23.5	4.9	27.4	76	20.9	เมีย	
		NP225	3A19525	86	45.2	23.7	4.8	28.6	75	24.6	ผู้	
		NP226	3A19167	88	45.1	23.4	4.9	28.7	75	25.8	เมีย	
		NP227										
		NP228	3A21787	79	43.0	23.9	4.6	28.8	70	21.7	เมีย	
		NP229	3A21792	78	43.1	22.3	4.6	25.9	65	21.0	เมีย	
		NP230	3A21789	88	49.0	23.0	5.1	28.8	76	25.3	ผู้	
		NP231	3A21788	83	46.4	24.3	5.0	27.8	76	25.5	ผู้	

หมายเหตุ                      คือ ไม่สามารถระบุได้

ภาคผนวก ก (ต่อ)

สถานที่เก็บตัวอย่าง	วันที่	รหัสที่ใช้วิเคราะห์	รหัสห้วงขา	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา						ผลการระบุเพศทางโมเลกุล	
				ความยาว (มิลลิเมตร)							น้ำหนัก (กรัม)
				ปีก	หัวปาก	ปาก	ปากกว้าง	หน้าแข้ง	หาง		
แหลมตาเส็ง	8 ธันวาคม 2560	NP232	3A21791	85	43.4	22.1	4.6	28.1	70	24.6	ผู้
		NP233	3A21790	85	43.5	22.4	4.8	29.1	70	25.4	ผู้
		NP234	3A21795	85	44.7	23.4	4.8	27.9	80	24.3	ผู้
		NP235	3A21794	83	43.6	23.9	4.7	26.4	81	22.5	เมีย
		NP236	3A21798	80	42.3	21.0	4.3	27.8	70	21.0	เมีย
		NP237	3A21799	83	42.4	22.5	4.7	28.2	74	21.9	ผู้
		NP238	3A21797	83	41.5	21.0	4.7	29.8	75	20.7	เมีย
		NP239	3A21796	80	41.1	19.5	4.4	26.1	80	22.2	เมีย
		NP240	3A21801	80	42.2	21.7	4.6	27.4	71	22.4	เมีย
		NP241	3A21800	84	45.3	25.2	5.3	32.5	75	25.7	เมีย
		NP242	3A21802	80	43.9	23.4	5.3	27.2	72	23.8	เมีย
เกาะตาเรือ	9 ธันวาคม 2560	NP243	3A21803	80	41.7	21.7	5.7	34.1	76	22.0	เมีย
		NP244	3A21804	81	41.2	20.3	5.0	28.1	79	23.7	เมีย
		NP245	3A21805	87	43.1	22.1	5.1	30.3	80	27.3	ผู้
		NP246	3A21807	83	44.7	25.7	4.9	29.5	78	26.3	

หมายเหตุ                      คือ ไม่สามารถระบุได้

ภาคผนวก ก (ต่อ)

สถานที่เก็บตัวอย่าง	วันที่	รหัสที่ใช้วิเคราะห์	รหัสห้องชา	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา							ผลการระบุเพศทางโมเลกุล
				ความยาว (มิลลิเมตร)						น้ำหนัก (กรัม)	
				ปีก	หัวปาก	ปาก	ปากกว้าง	หน้าแข้ง	หาง		
เกาะตาเรือง	9 ธันวาคม 2560	NP247	3A21810	78	40.3	20.6	4.9	27.2	71	22.6	เมีย
		NP248	3A21808	81	40.7	22.7	4.4	27.4	72	22.0	เมีย
		NP249	3A21813	76	41.7	22.4	5.8	26.6	70	22.3	เมีย
		NP250	3A21812	80	39.7	22.2	4.7	23.7	69	19.1	เมีย
		NP251	3A21814	78	41.7	21.3	4.2	29.4	73	21.1	เมีย
		NP252	3A21811	80	42.0	21.7	4.9	27.0	69	22.3	เมีย
หน้าวัดสโมสร	26 ธันวาคม 2560	NP253	3A21875	83	42.6	21.2	4.6	27.5	73	23.8	เมีย
		NP254	3A21876	83	44.5	19.8	4.3	28.5	72	23.3	เมีย
		NP255	3A21877	83	42.2	20.2	4.6	26.4	73	21.2	เมีย
		NP256	3A21878	77	42.0	20.9	4.5	27.6	75	22.0	เมีย
เกาะตาเรือง	8 มกราคม 2561	NP257	3A21909	79	42.2	20.3	4.4	27.0	72	21.9	เมีย
		NP258	3A21908	84	42.4	22.9	5.0	29.0	71	27.8	ผู้
		NP259	3A21913	79	42.6	24.0	4.8	28.0	71	20.7	เมีย
		NP260	3A21911	80	43.3	24.3	5.0	29.1	71	23.6	เมีย
		NP261	3A07340	79	41.7	22.5	5.1	28.0	69	19.8	เมีย

ภาคผนวก ก (ต่อ)

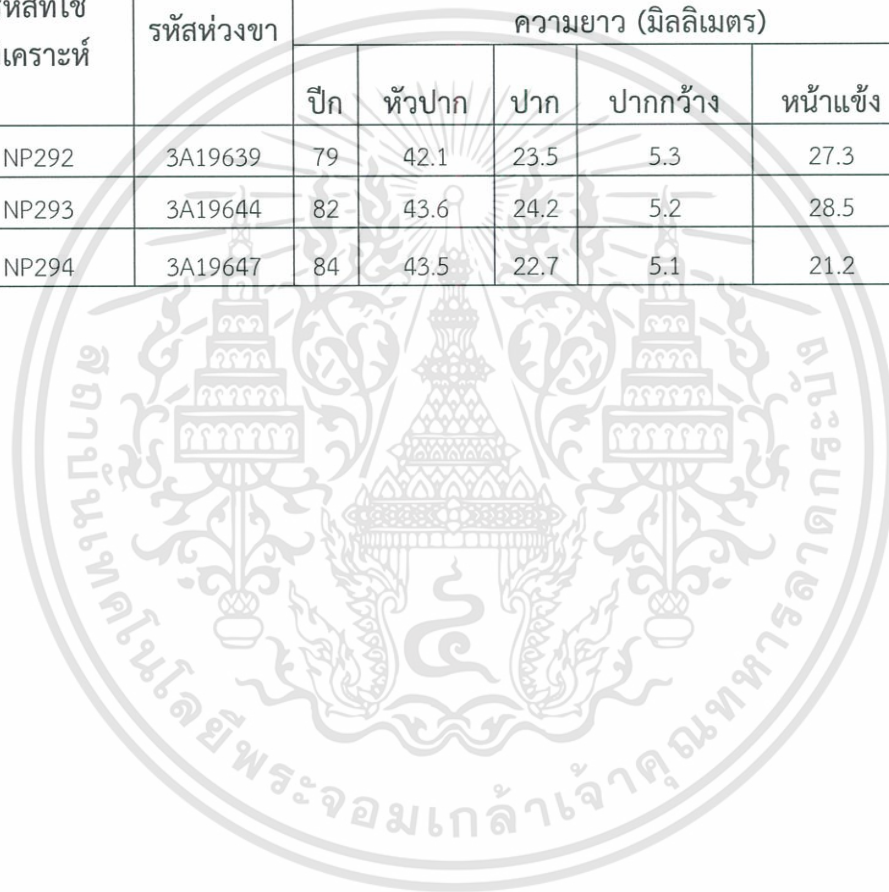
สถานที่เก็บ ตัวอย่าง	วันที่	รหัสที่ใช้ วิเคราะห์	รหัสห้วงขา	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา							ผลการ ระบุเพศ ทาง โมเลกุล
				ความยาว (มิลลิเมตร)						น้ำหนัก (กรัม)	
				ปีก	หัวปาก	ปาก	ปากกว้าง	หน้าแข้ง	หาง		
เกาะตาเรือง	8 มกราคม 2561	NP262	3A21912	82	40.8	23.7	5.2	28.2	67	21.6	เมีย
		NP263	3A21914	81	42.8	26.0	5.4	25.8	69	22.0	เมีย
หน้าวัดสโมสร	23 ม.ค. 61	NP264	3A21971	82	42.5	21.0	4.6	30.2	78	26.5	ผู้
ท่าข้าวกำนันทรง	24มกราคม 2561	NP265	3A21973	81	43.1	23.8	5.2	29.0	71	22.6	เมีย
		NP266	3A21972	82	43.5	22.4	5.2	27.7	71	22.6	ผู้
แหลมตาเล็ง	3 กุมภาพันธ์ 2561	NP267	3A21975	84	42.2	24.1	4.6	26.6	74	21.6	เมีย
		NP268	3A21976	80	41.9	23.3	4.3	27.5	68	21.9	เมีย
		NP269	3A21977	83	43.3	23.0	4.9	27.9	67	21.4	เมีย
		NP270	3A19384	83	41.1	23.9	5.2	29.0	71	20.3	เมีย
		NP271	3A10675	79	40.9	21.2	4.8	27.0	72	21.7	เมีย
		NP272	เป็นโรค	73	39.8	22.0	4.7	26.0	68	19.1	เมีย
		NP273	3A21798	79	41.5	24.2	4.7	28.5	75	20.8	เมีย
		NP274	3A16482	80	44.7	25.2	5.0	27.3	73	24.8	เมีย
		NP275	3A21904	77	41.4	24.2	4.5	26.1	68	19.6	เมีย
		NP276	3A21978	79	42.0	24.2	5.3	28.5	75	20.8	เมีย

ภาคผนวก ก (ต่อ)

สถานที่เก็บตัวอย่าง	วันที่	รหัสที่ใช้วิเคราะห์	รหัสห้วงขา	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา						ผลการระบุเพศทางโมเลกุล	
				ความยาว (มิลลิเมตร)							น้ำหนัก (กรัม)
				ปีก	หัวปาก	ปาก	ปากกว้าง	หน้าแข้ง	หาง		
แหลมตาเส็ง	3 กุมภาพันธ์ 2561	NP277	3A21980	86	42.4	24.9	4.6	28.2	79	23.1	เมีย
		NP278	3A21981	81	42.2	23.0	4.5	26.9	72	23.6	เมีย
		NP279	3A21979	88	43.2	21.7	4.9	28.6	75	22.1	ผู้
		NP280	3A21982	85	41.7	22.7	5.0	28.0	73	22.5	ผู้
		NP281	3A21983	80	41.0	24.3	4.5	26.1	71	20.1	เมีย
		NP282	3A21327	80	40.8	22.3	4.6	26.7	70	20.8	เมีย
		NP283	3A19622	80	43.3	23.0	4.3	27.5	71	18.5	เมีย
		NP284	3A21985	79	42.2	22.5	4.8	26.0	71	21.9	เมีย
		NP285	3A21986	76	42.5	23.6	5.2	26.7	66	22.5	เมีย
		NP286	3A21987	80	43.1	21.2	5.1	28.8	67	24.2	เมีย
หน้าวัดสโมสร	9 กุมภาพันธ์ 2561	NP287	3A19638	82	42.8	24.5	4.9	27.6	76	22.3	เมีย
		NP288	3A19637	87	44.0	24.0	5.2	29.6	76	24.8	เมีย
		NP289	3A19640	80	42.8	24.5	5.3	29.2	77	21.0	เมีย
		NP290	3A19641	82	42.9	24.7	5.6	27.9	70	20.9	เมีย
		NP291	3A19642	80	41.5	20.0	5.3	27.4	69	20.6	เมีย

ภาคผนวก ก (ต่อ)

สถานที่เก็บตัวอย่าง	วันที่	รหัสที่ใช้วิเคราะห์	รหัสห้วงขา	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา							ผลการระบุเพศทางโมเลกุล
				ความยาว (มิลลิเมตร)						น้ำหนัก (กรัม)	
				ปีก	หัวปาก	ปาก	ปากกว้าง	หน้าแข้ง	หาง		
หน้าวัดสโมสร	9 มกราคม 2561	NP292	3A19639	79	42.1	23.5	5.3	27.3	71	21.8	เมีย
		NP293	3A19644	82	43.6	24.2	5.2	28.5	72	22.4	ผู้
ท่าข้าวกำนันทรง	10 ม.ค. 61	NP294	3A19647	84	43.5	22.7	5.1	21.2	72	23.0	เมีย



## ภาคผนวก ก (ต่อ)

ตารางภาคผนวกที่ ก-2 ผลการระบุเพศของนกฟงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่นจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ตัวอย่าง	ห้วงขา	ความยาวปีก	เพศจากความยาวปีก	น้ำหนัก	เพศจากน้ำหนัก	เพศจากความยาวปีกควบคู่น้ำหนัก
NP219	3A21781	85	ผู้	24.0	ผู้	ผู้
NP220	3A21315	88	ผู้	24.6	ผู้	ผู้
NP221	3A08960	81	ผู้	23.2	เมีย	เมีย
NP222	3A21783	86	ผู้	23.2	เมีย	ผู้
NP223	3A21782	83	ผู้	23.6	เมีย	เมีย
NP224	3A21784	79	เมีย	20.9	เมีย	เมีย
NP225	3A19525	86	ผู้	24.6	ผู้	ผู้
NP226	3A19167	88	ผู้	25.8	ผู้	ผู้
NP227						
NP228	3A21787	79	เมีย	21.7	เมีย	เมีย
NP229	3A21792	78	เมีย	21.0	เมีย	เมีย
NP230	3A21789	88	ผู้	25.3	ผู้	ผู้
NP231	3A21788	83	ผู้	25.5	ผู้	ผู้
NP232	3A21791	85	ผู้	24.6	ผู้	ผู้
NP233	3A21790	85	ผู้	25.4	ผู้	ผู้
NP234	3A21795	85	ผู้	24.3	ผู้	ผู้
NP235	3A21794	83	ผู้	22.5	เมีย	เมีย
NP236	3A21798	80	เมีย	21.0	เมีย	เมีย
NP237	3A21799	83	ผู้	21.9	เมีย	เมีย
NP238	3A21797	83	ผู้	20.7	เมีย	เมีย
NP239	3A21796	80	เมีย	22.2	เมีย	เมีย
NP240	3A21801	80	เมีย	22.4	เมีย	เมีย
NP241	3A21800	84	ผู้	25.7	ผู้	ผู้
NP242	3A21802	80	เมีย	23.8	เมีย	เมีย
NP243	3A21803	80	เมีย	22.0	เมีย	เมีย
NP244	3A21804	81	ผู้	23.7	เมีย	เมีย
NP245	3A21805	87	ผู้	27.3	ผู้	ผู้
NP246	3A21807	83	ผู้	26.3	ผู้	เมีย

หมายเหตุ: XXXXXXXXXX คือ ไม่สามารถระบุได้

## ภาคผนวก ก (ต่อ)

ตัวอย่าง	ห้องชา	ความยาวปีก	เพศจากความยาวปีก	น้ำหนัก	เพศจากน้ำหนัก	เพศจากความยาวปีกควบคู่น้ำหนัก
NP247	3A21810	78	เมีย	22.6	เมีย	เมีย
NP248	3A21808	81	ผู้	22.0	เมีย	เมีย
NP249	3A21813	76	เมีย	22.3	เมีย	เมีย
NP250	3A21812	80	เมีย	19.1	เมีย	เมีย
NP251	3A21814	78	เมีย	21.1	เมีย	เมีย
NP252	3A21811	80	เมีย	22.3	เมีย	เมีย
NP253	3A21875	83	ผู้	23.8	เมีย	เมีย
NP254	3A21876	83	ผู้	23.3	เมีย	เมีย
NP255	3A21877	83	ผู้	21.2	เมีย	เมีย
NP256	3A21878	77	เมีย	22.0	เมีย	เมีย
NP257	3A21909	79	เมีย	21.9	เมีย	เมีย
NP258	3A21908	84	ผู้	27.8	ผู้	ผู้
NP259	3A21913	79	เมีย	20.7	เมีย	เมีย
NP260	3A21911	80	เมีย	23.6	เมีย	เมีย
NP261	3A07340	79	เมีย	19.8	เมีย	เมีย
NP262	3A21912	82	ผู้	21.6	เมีย	เมีย
NP263	3A21914	81	ผู้	22.0	เมีย	เมีย
NP264	3A21971	82	ผู้	26.5	ผู้	ผู้
NP265	3A21973	81	ผู้	22.6	เมีย	เมีย
NP266	3A21972	82	ผู้	22.6	เมีย	เมีย
NP267	3A21975	84	ผู้	21.6	เมีย	เมีย
NP268	3A21976	80	เมีย	21.9	เมีย	เมีย
NP269	3A21977	83	ผู้	21.4	เมีย	เมีย
NP270	3A19384	83	ผู้	20.3	เมีย	เมีย
NP271	3A10675	79	เมีย	21.7	เมีย	เมีย
NP272	เป็นโรค	73	เมีย	19.1	เมีย	เมีย
NP273	3A21798	79	เมีย	20.8	เมีย	เมีย
NP274	3A16482	80	เมีย	24.8	ผู้	เมีย
NP275	3A21904	77	เมีย	19.6	เมีย	เมีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ก (ต่อ)

ตัวอย่าง	ห้วงขา	ความยาวปีก	เพศจากความยาวปีก	น้ำหนัก	เพศจากน้ำหนัก	เพศจากความยาวปีกควบคู่น้ำหนัก
NP276	3A21978	79	เมีย	20.8	เมีย	เมีย
NP277	3A21980	86	ผู้	23.1	เมีย	ผู้
NP278	3A21981	81	ผู้	23.6	เมีย	เมีย
NP279	3A21979	88	ผู้	22.1	เมีย	ผู้
NP280	3A21982	85	ผู้	22.5	เมีย	ผู้
NP281	3A21983	80	เมีย	20.1	เมีย	เมีย
NP282	3A21327	80	เมีย	20.8	เมีย	เมีย
NP283	3A19622	80	เมีย	18.5	เมีย	เมีย
NP284	3A21985	79	เมีย	21.9	เมีย	เมีย
NP285	3A21986	76	เมีย	22.5	เมีย	เมีย
NP286	3A21987	80	เมีย	24.2	ผู้	เมีย
NP287	3A19638	82	ผู้	22.3	เมีย	เมีย
NP288	3A19637	87	ผู้	24.8	ผู้	ผู้
NP289	3A19640	80	เมีย	21.0	เมีย	เมีย
NP290	3A19641	82	ผู้	20.9	เมีย	เมีย
NP291	3A19642	80	เมีย	20.6	เมีย	เมีย
NP292	3A19639	79	เมีย	21.8	เมีย	เมีย
NP293	3A19644	82	ผู้	22.4	เมีย	เมีย
NP294	3A19647	84	ผู้	23.0	เมีย	เมีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ก (ต่อ)

ตารางภาคผนวกที่ ก-3 ผลการระบุเพศของนกฟงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่นโดยวิธีระดับโมเลกุล

ตัวอย่าง	ห้วงขา	ผลระบุเพศทางโมเลกุล
NP219	3A21781	ผู้
NP220	3A21315	ผู้
NP221	3A08960	ผู้
NP222	3A21783	
NP223	3A21782	เมีย
NP224	3A21784	เมีย
NP225	3A19525	ผู้
NP226	3A19167	เมีย
NP227		
NP228	3A21787	เมีย
NP229	3A21792	เมีย
NP230	3A21789	ผู้
NP231	3A21788	ผู้
NP232	3A21791	ผู้
NP233	3A21790	ผู้
NP234	3A21795	ผู้
NP235	3A21794	เมีย
NP236	3A21798	เมีย
NP237	3A21799	ผู้
NP238	3A21797	เมีย
NP239	3A21796	เมีย
NP240	3A21801	เมีย
NP241	3A21800	เมีย
NP242	3A21802	เมีย
NP243	3A21803	เมีย
NP244	3A21804	เมีย
NP245	3A21805	ผู้
NP246	3A21807	
NP247	3A21810	เมีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่ NP247 สำหรับการใช้งาน 3A21810 ษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้ไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 หมายถึง [redacted] คือไม่สามารถระบุได้ลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ก (ต่อ)

ตัวอย่าง	ท่วงขา	ผลระบุเพศทางโมเลกุล
NP248	3A21808	เมีย
NP249	3A21813	เมีย
NP250	3A21812	เมีย
NP251	3A21814	เมีย
NP252	3A21811	เมีย
NP253	3A21875	เมีย
NP254	3A21876	เมีย
NP255	3A21877	เมีย
NP256	3A21878	เมีย
NP257	3A21909	เมีย
NP258	3A21908	ผู้
NP259	3A21913	เมีย
NP260	3A21911	เมีย
NP261	3A07340	เมีย
NP262	3A21912	เมีย
NP263	3A21914	เมีย
NP264	3A21971	ผู้
NP265	3A21973	เมีย
NP266	3A21972	ผู้
NP267	3A21975	เมีย
NP268	3A21976	เมีย
NP269	3A21977	เมีย
NP270	3A19384	เมีย
NP271	3A10675	เมีย
NP272	เป็นโรค	เมีย
NP273	3A21798	เมีย
NP274	3A16482	เมีย
NP275	3A21904	เมีย
NP276	3A21978	เมีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่ NP276 สำหรับการใช้งาน 3A21978 ของท่านนั้น ไม่อนุญาตให้ไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ก (ต่อ)

ตัวอย่าง	ห่วงขา	ผลกระทบทางโมเลกุล
NP277	3A21980	เมื่อย
NP278	3A21981	เมื่อย
NP279	3A21979	ผู้
NP280	3A21982	ผู้
NP281	3A21983	เมื่อย
NP282	3A21327	เมื่อย
NP283	3A19622	เมื่อย
NP284	3A21985	เมื่อย
NP285	3A21986	เมื่อย
NP286	3A21987	เมื่อย
NP287	3A19638	เมื่อย
NP288	3A19637	เมื่อย
NP289	3A19640	เมื่อย
NP290	3A19641	เมื่อย
NP291	3A19642	เมื่อย
NP292	3A19639	เมื่อย
NP293	3A19644	ผู้
NP294	3A19647	เมื่อย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ก (ต่อ)

ตารางภาคผนวกที่ ก-4 ผลการเปรียบเทียบระหว่างการระบุเพศของนกฟงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่นทางสัตวศาสตร์  
กับการระบุเพศของนกฟงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่นด้วยวิธีระดับโมเลกุล

ตัวอย่าง	ห้วงขา	เพศจากความยาวปีกควบคู่หน้า	ผลเพศทางโมเลกุล	สรุป
NP219	3A21781	ผู้	ผู้	✓
NP220	3A21315	ผู้	ผู้	✓
NP221	3A08960	เมีย	ผู้	✗
NP222	3A21783	ผู้		
NP223	3A21782	เมีย	เมีย	✓
NP224	3A21784	เมีย	เมีย	✓
NP225	3A19525	ผู้	ผู้	✓
NP226	3A19167	ผู้	เมีย	✗
NP227				
NP228	3A21787	เมีย	เมีย	✓
NP229	3A21792	เมีย	เมีย	✓
NP230	3A21789	ผู้	ผู้	✓
NP231	3A21788	ผู้	ผู้	✓
NP232	3A21791	ผู้	ผู้	✓
NP233	3A21790	ผู้	ผู้	✓
NP234	3A21795	ผู้	ผู้	✓
NP235	3A21794	เมีย	เมีย	✓
NP236	3A21798	เมีย	เมีย	✓
NP237	3A21799	เมีย	ผู้	✗
NP238	3A21797	เมีย	เมีย	✓
NP239	3A21796	เมีย	เมีย	✓
NP240	3A21801	เมีย	เมีย	✓
NP241	3A21800	ผู้	เมีย	✗
NP242	3A21802	เมีย	เมีย	✓
NP243	3A21803	เมีย	เมีย	✓
NP244	3A21804	เมีย	เมีย	✓
NP245	3A21805	ผู้	ผู้	✓

เอกสารนี้เป็นเอกสารของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์เพื่อการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้ไปใช้ประโยชน์อื่นใด  
หมายเหตุ: [ ] คือ ไม่สามารถระบุได้

## ภาคผนวก ก (ต่อ)

ตัวอย่าง	ห้องขา	เพศจากความยาวปีกควบคู่หน้าหนัก	ผลเพศทางโมเลกุล	สรุป
NP246	3A21807	เมีย		
NP247	3A21810	เมีย	เมีย	✓
NP248	3A21808	เมีย	เมีย	✓
NP249	3A21813	เมีย	เมีย	✓
NP250	3A21812	เมีย	เมีย	✓
NP251	3A21814	เมีย	เมีย	✓
NP252	3A21811	เมีย	เมีย	✓
NP253	3A21875	เมีย	เมีย	✓
NP254	3A21876	เมีย	เมีย	✓
NP255	3A21877	เมีย	เมีย	✓
NP256	3A21878	เมีย	เมีย	✓
NP257	3A21909	เมีย	เมีย	✓
NP258	3A21908	ผู้	ผู้	✓
NP259	3A21913	เมีย	เมีย	✓
NP260	3A21911	เมีย	เมีย	✓
NP261	3A07340	เมีย	เมีย	✓
NP262	3A21912	เมีย	เมีย	✓
NP263	3A21914	เมีย	เมีย	✓
NP264	3A21971	ผู้	ผู้	✓
NP265	3A21973	เมีย	เมีย	✓
NP266	3A21972	เมีย	ผู้	✗
NP267	3A21975	เมีย	เมีย	✓
NP268	3A21976	เมีย	เมีย	✓
NP269	3A21977	เมีย	เมีย	✓
NP270	3A19384	เมีย	เมีย	✓
NP271	3A10675	เมีย	เมีย	✓
NP272	เป็นโรค	เมีย	เมีย	✓
NP273	3A21798	เมีย	เมีย	✓
NP274	3A16482	เมีย	เมีย	✓
NP275	3A21904	เมีย	เมีย	✓

หมายเหตุ                      คือ ไม่สามารถระบุได้

## ภาคผนวก ก (ต่อ)

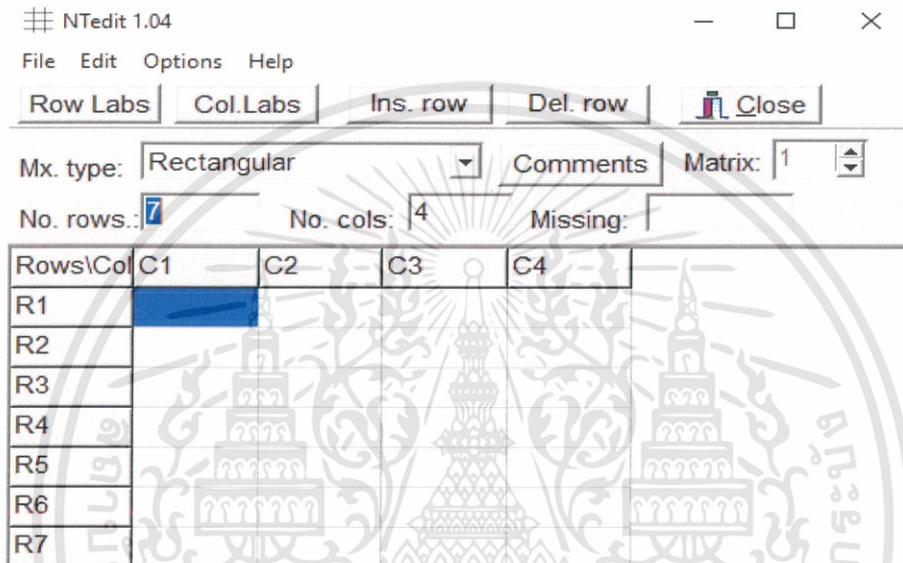
ตัวอย่าง	ห้วงขา	เพศจากความยาวปีกควบคู่หน้าหนัก	ผลเพศทางโมเลกุล	สรุป
NP276	3A21978	เมีย	เมีย	✓
NP277	3A21980	ผู้	เมีย	✗
NP278	3A21981	เมีย	เมีย	✓
NP279	3A21979	ผู้	ผู้	✓
NP280	3A21982	ผู้	ผู้	✓
NP281	3A21983	เมีย	เมีย	✓
NP282	3A21327	เมีย	เมีย	✓
NP283	3A19622	เมีย	เมีย	✓
NP284	3A21985	เมีย	เมีย	✓
NP285	3A21986	เมีย	เมีย	✓
NP286	3A21987	เมีย	เมีย	✓
NP287	3A19638	เมีย	เมีย	✓
NP288	3A19637	ผู้	เมีย	✗
NP289	3A19640	เมีย	เมีย	✓
NP290	3A19641	เมีย	เมีย	✓
NP291	3A19642	เมีย	เมีย	✓
NP292	3A19639	เมีย	เมีย	✓
NP293	3A19644	เมีย	ผู้	✗
NP294	3A19647	เมีย	เมีย	✓

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

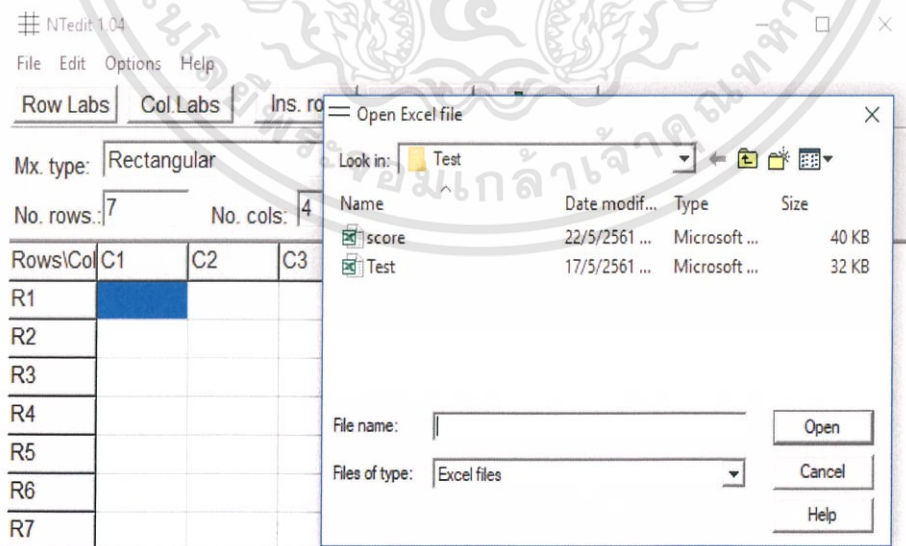
## ภาคผนวก ข วิธีการใช้โปรแกรม

การวิเคราะห์ผลความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยการสร้าง Tree แสดงความสัมพันธ์ของตัวอย่างนกฟงใหญ่ พันธุ์ญี่ปุ่น 30 ตัวอย่าง ของทั้ง 5 ไพรเมอร์ ด้วยโปรแกรม NTSYSpc 2.1X

### 1.เปิดโปรแกรม NTedit 1.04



### 2.กด File เลือก Import Exel เลือกไฟล์ .xls ที่พร้อมใช้งาน จากนั้นกด open




เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.โปรแกรมเปิดไฟล์งานที่สร้างจาก Microsoft Excel

NTedit 1.04

File Edit Options Help

Row Labs Col.Labs Ins. row Del. row 

Mx. type: Rectangular Comments Matrix: 1

No. rows: 30 No. cols: 60 Missing:

Rows/Col	1	2	3	4	5	6	7	8	9
NP223	1	1	1	1	1	1	1	0	0
NP224	1	1	1	1	1	1	1	0	1
NP226	0	1	0	1	1	1	1	0	1
NP228	0	1	1	1	1	0	1	0	1
NP231	0	0	0	1	1	0	1	0	1
NP236	1	1	1	1	1	0	1	1	1
NP237	0	0	0	1	1	0	1	0	1
NP239	0	1	1	1	1	0	1	0	1
NP242	0	1	1	1	1	0	1	0	1

### 4.กด File เลือก Save file as ใส่ชื่อไฟล์ที่ต้องการบันทึก บันทึกไฟล์เป็น .NTS แล้วกด Save

NTedit 1.04

File Edit Options Help

Row Labs Col.Labs Ins.

Mx. type: Rectangular

No. rows: 30 No. cols: 60

Rows/Col	1	2	3	4	5	6	7	8	9
NP223	1	1	1	1	1	1	1	0	0
NP224	1	1	1	1	1	1	1	0	1
NP226	0	1	0	1	1	1	1	0	1
NP228	0	1	1	1	1	0	1	0	1
NP231	0	0	0	1	1	0	1	0	1
NP236	1	1	1	1	1	0	1	1	1
NP237	0	0	0	1	1	0	1	0	1
NP239	0	1	1	1	1	0	1	0	1
NP242	0	1	1	1	1	0	1	0	1

Save data file as...

Save in: Test

Name	Date modif...	Type	Size
<input type="checkbox"/> score out1.NTS	22/5/2561 ...	NTS File	21 KB
<input type="checkbox"/> score out2.NTS	22/5/2561 ...	NTS File	5 KB
<input type="checkbox"/> Scoreedit.NTS	22/5/2561 ...	NTS File	5 KB
<input type="checkbox"/> Testedit out1.NTS	17/5/2561 ...	NTS File	21 KB
<input type="checkbox"/> Testedit out2.NTS	17/5/2561 ...	NTS File	3 KB
<input type="checkbox"/> Testedit.NTS	17/5/2561 ...	NTS File	2 KB

File name:

Save as type: NTSYS files

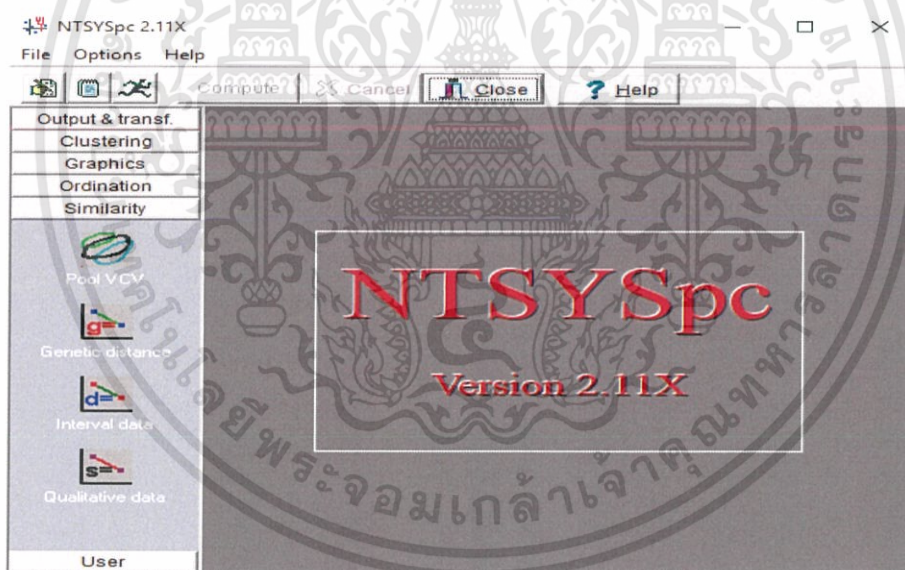
Save Cancel Help

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 5.เปิดโปรแกรม NTSYSpc2.1X

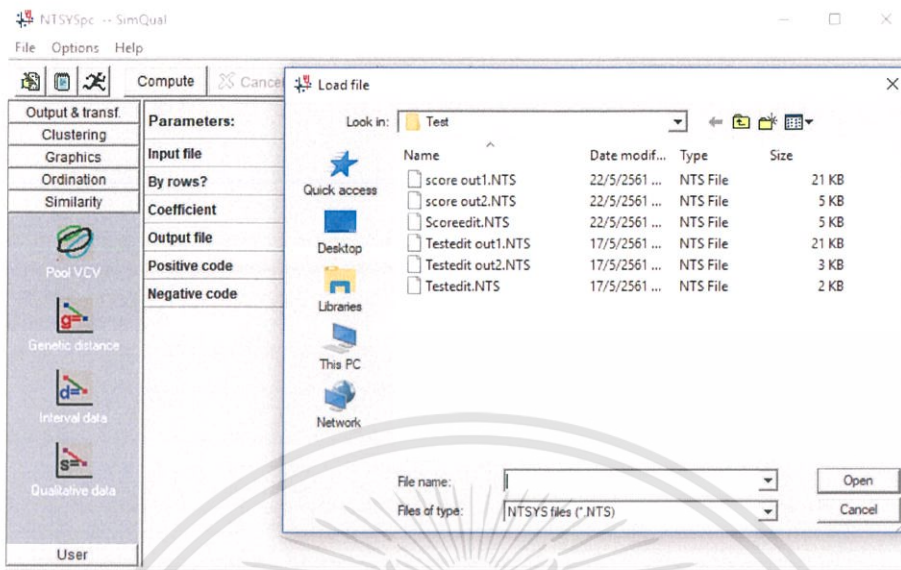


## 6.กต Similarity เลือก Qualitative data

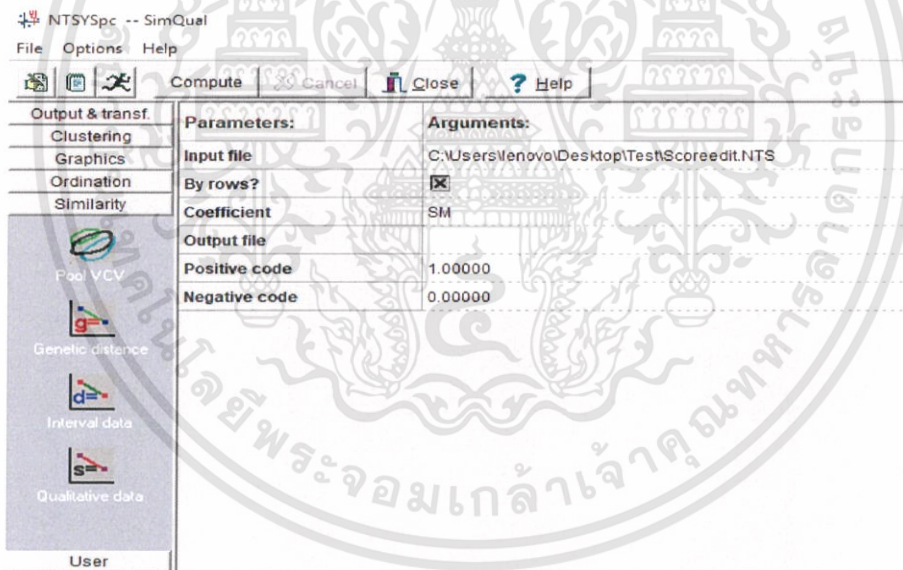


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7. กด input file เลือกไฟล์ .NTS ที่พร้อมใช้งาน กด open

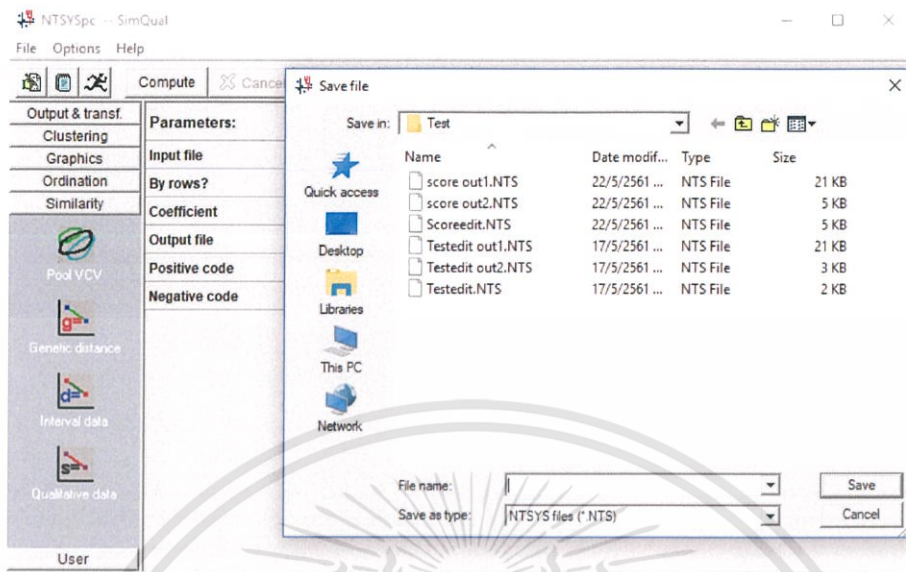


8. เลือก By row? คลิกให้ขึ้นเครื่องหมาย X

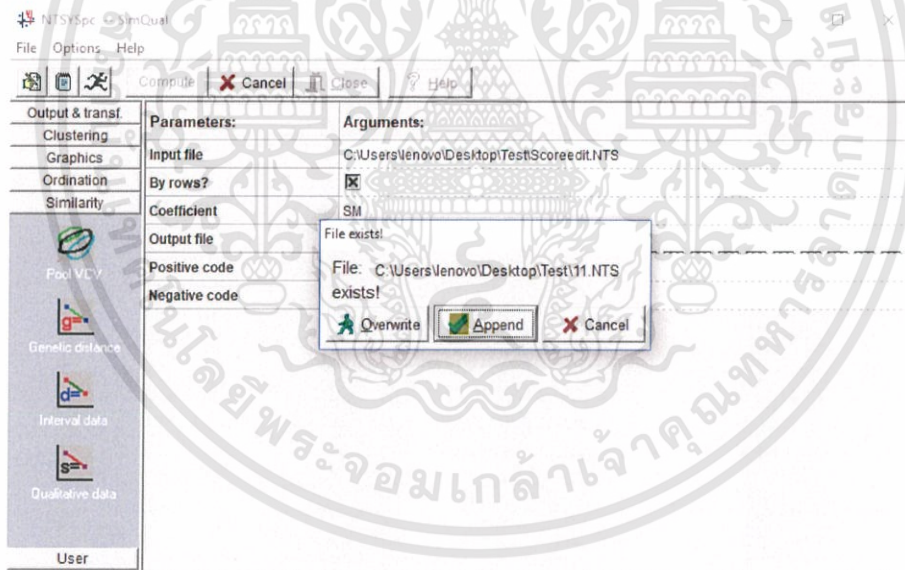


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

9.คลิก Output file ตั้งชื่อใหม่ กด Save

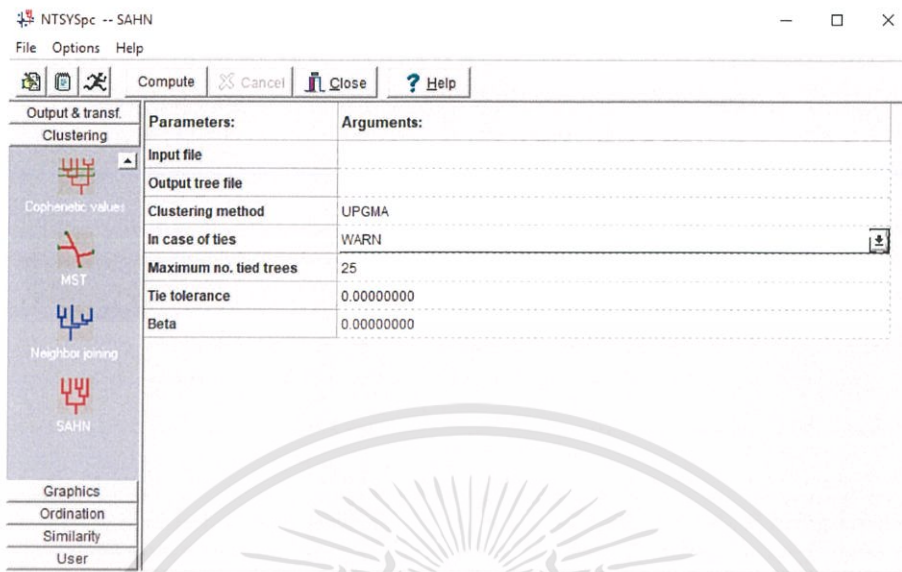


10.กด compute แล้วเลือก Append

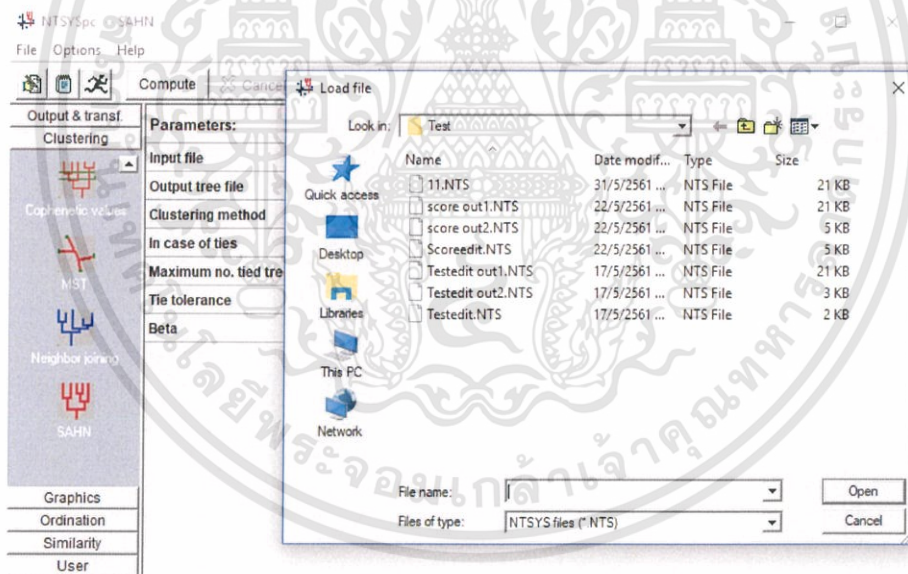


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 11.กต Clustering เลือก SAHN

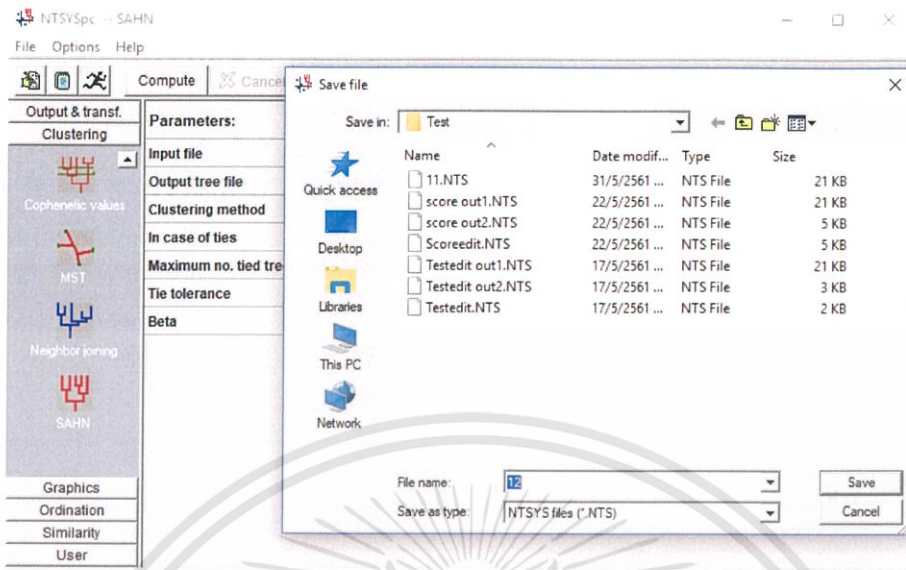


## 12.กต input file เลือกไฟล์ .NTS ที่ผ่านขั้นตอน Qualitative data กด open

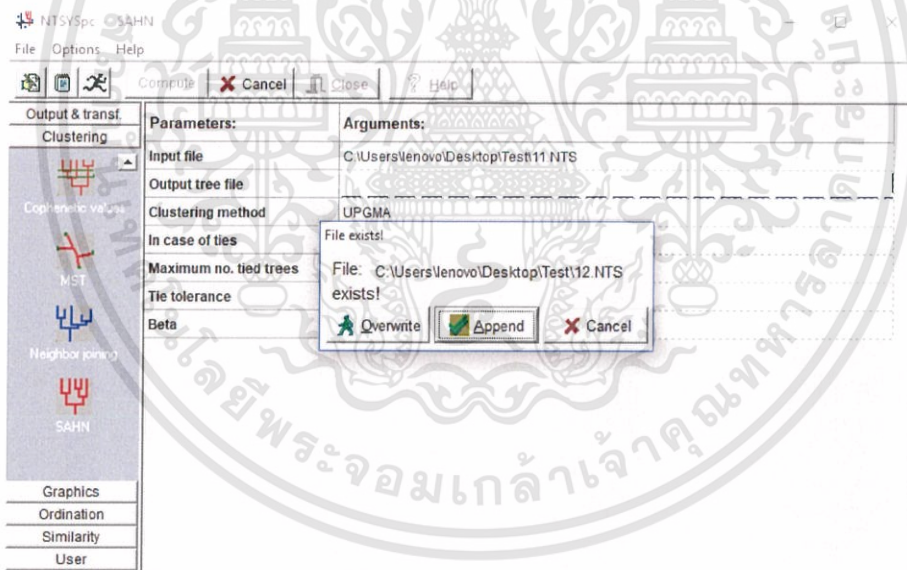


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

13. กด out put file ตั้งชื่อไฟล์ใหม่ .NTS กด save

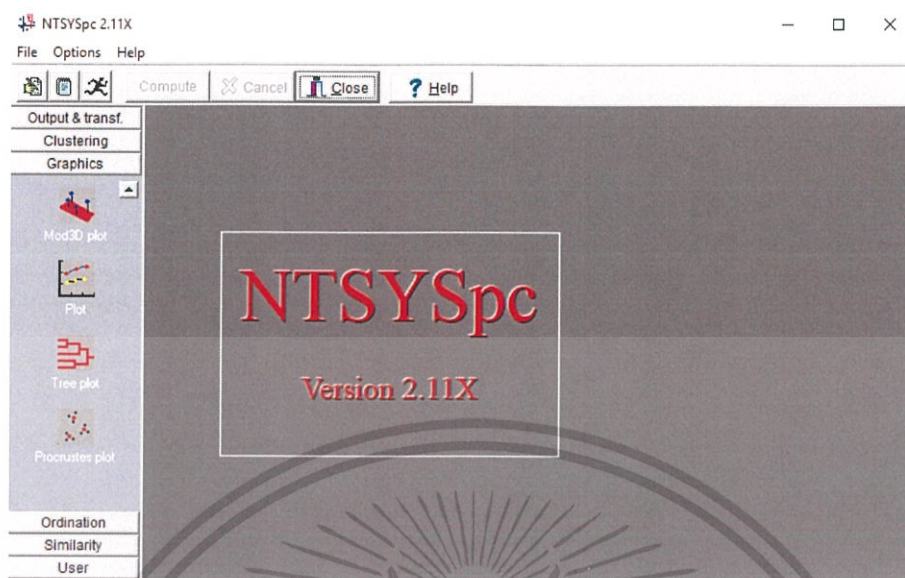


14. กด Compute จากนั้นกด Append

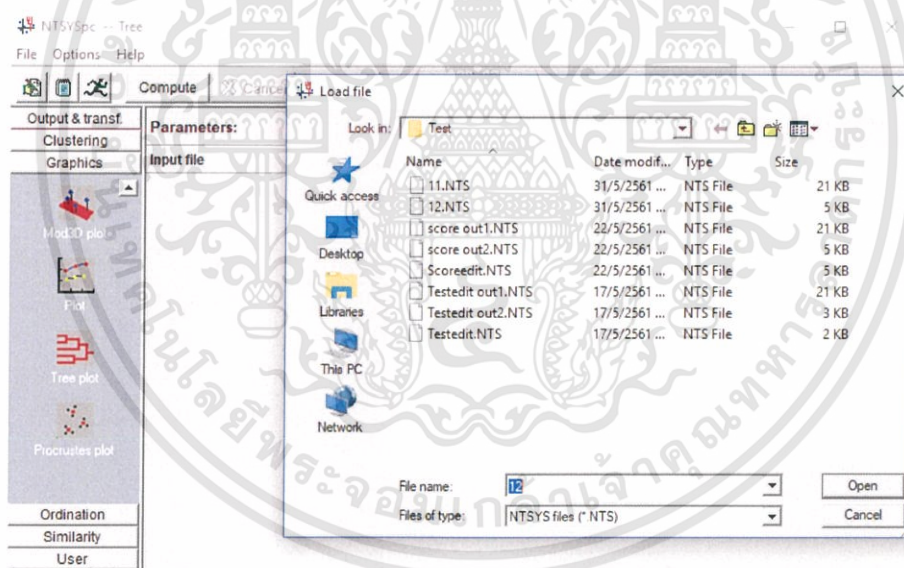


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 15. กด Graphic เลือก tree plot

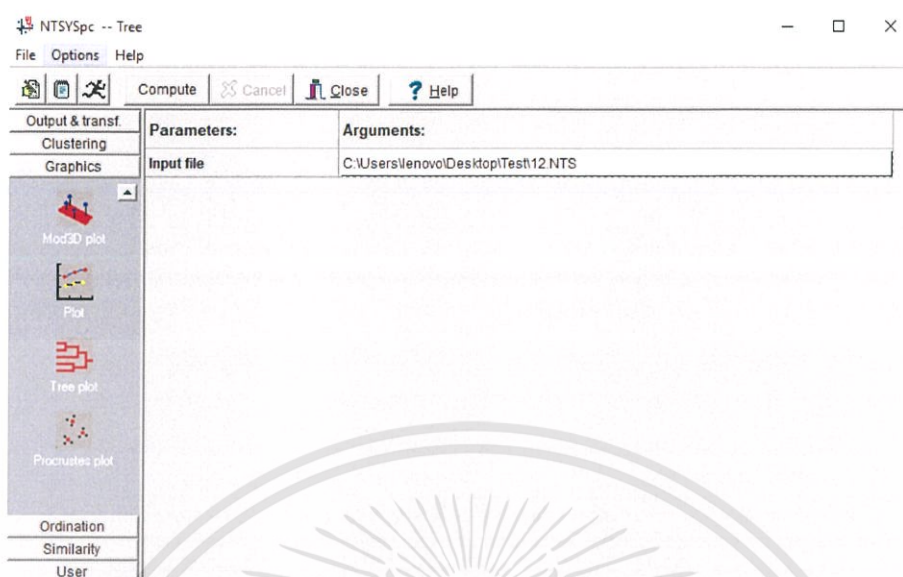


### 16. กด input file เลือกไฟล์ .NTS ที่ผ่านขั้นตอน SAHN แล้วกด open



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 17. กด Compute



## 18. โปรแกรมจะแสดงแผนภาพแสดงความสัมพันธ์ของตัวอย่างออกมาเป็น Tree



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ค

### 1. การเตรียมสารละลาย

#### 1.1 Stock 10X TBE Buffer ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

- เตรียม 0.025 โมลาร์ EDTA โดยชั่งสาร EDTA 9.305 กรัม
- เตรียม 1 โมลาร์ Boric acid โดยชั่งสาร Boric acid 61.83 กรัม
- เตรียม 0.89 โมลาร์ Tris base โดยชั่งสาร Tris base 108 กรัม

นำสารที่ชั่งมาละลายน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ 8.0 จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อโดยใช้เครื่องความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เมื่อนำมาใช้งานต้องเจือจางให้ได้ความเข้มข้นเป็น 1X TBE Buffer โดยดูด 10X TBE Buffer ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่นปริมาตร 450 มิลลิลิตร

#### 1.2 Stock 10 นาโนโมลาร์ TE Buffer ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

- เตรียม 0.1 โมลาร์ Tris-HCl โดยชั่งสาร Tris 121 กรัม
- เตรียม 0.01 โมลาร์ EDTA

นำสารที่ชั่งมารวมกันแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 100 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ 8.0 จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อโดยใช้เครื่องความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เมื่อนำมาใช้งานต้องเจือจางให้ได้ความเข้มข้นเป็น 0.1 นาโนโมลาร์ TE Buffer โดยดูด 10 นาโนโมลาร์ TE Buffer ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 40 มิลลิลิตร

### 2. การเตรียมสารในเทคนิค PCR

#### 2.1 การเตรียมไพรเมอร์ P2/P8 ความเข้มข้น 20 พิโคโมลต่อไมโครลิตร

-ดูด stockไพรเมอร์ P2/P8 ที่มีความเข้มข้น 100 พิโคโมลต่อไมโครลิตร ปริมาตร 4 ไมโครลิตร ผสมกับ DI water 16 ไมโครลิตร

#### 2.2 การเตรียม Deoxynucleotide Triphosphate (dNTPs)

-ดูด stock dATP, dGTP, dCTP, dTTP ที่มีความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1.25 ไมโครโมล ผสมกับ DI Water 95 ไมโครลิตร (ความเข้มข้นสุดท้าย 1.25 มิลลิโมลาร์)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ค (ต่อ)

### 3. การเตรียมสารในวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส

#### 3.1 การเตรียมอะกาโรสเจล (น้ำหนักต่อปริมาตร)

-หากต้องการเตรียมอะกาโรสเจลเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ชั่งผงอะกาโรส 0.2 กรัม ผสมกับ 1X TBE Buffer 20 มิลลิลิตร (สำหรับเจลเล็ก)

-หากต้องการเตรียมอะกาโรสเจลเข้มข้น 1เปอร์เซ็นต์ ชั่งผงอะกาโรส 0.4 กรัม ผสมกับ 1X TBE Buffer 40 มิลลิลิตร (สำหรับเจลใหญ่)

-หากต้องการเตรียมอะกาโรสเจลเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ชั่งผงอะกาโรส 0.4 กรัม ผสมกับ 1X TBE Buffer 20 มิลลิลิตร (สำหรับเจลเล็ก)

-หากต้องการเตรียมอะกาโรสเจลเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ชั่งผงอะกาโรส 0.8 กรัม ผสมกับ 1X TBE Buffer 40 มิลลิลิตร (สำหรับเจลใหญ่)

เมื่อเตรียมผงอะกาโรส และ 1X TBE Buffer ตามความเข้มข้นที่ต้องการแล้ว นำไปให้ความร้อนเพื่อให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เทใส่ถาดสำหรับเตรียมเจลที่มีหัว ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้เจลเกิดการแข็งตัว

#### 3.2 การเตรียม 3X Gel loading dye blue

- ดูด stock 6X Gel loading dye blue ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมกับ DI Water 200 ไมโครลิตร

### 4. การเตรียมเอธิเดียมโบรไมด์

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้