การบ่งชี้เพศและสายพันธุ์ย่อยของนกนางแอ่นบ้านในประเทศไทย

GENDER AND SUBSPECIES IDENTIFICATION OF BARN SWALLOW (*Hirundo rustica* Linnaeus) IN THAILAND

ธัญลักษณ์ มาลัยทัศน์
THANYALAK MALAITAD

วิทยานิพนธ์นี้สำหรับการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2560
KMITL-2017-SC-M-020-008

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

GENDER AND SUBSPECIES IDENTIFICATION OF BARN SWALLOW (*Hirundo rustica* Linnaeus) IN THAILAND

THANYALAK MALAITAD

A THESIS SUBMITTED IN FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY
DEPARTMENT OF BIOLOGY
FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
2017

KMITL-2017-SC-M-020-008

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

COPYRIGHT 2017
FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การบ่งชี้สายพันธุ์ย่อยและเพศของนกนางแอ่นบ้านในประเทศไทย
ชื่อนักศึกษา	นางสาวธัญลักษณ์ มาลัยทัศน์
รหัสนักศึกษา	58605046
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา	ชีววิทยา
พ.ศ.	2560
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม

บทคัดย่อ

นกนางแอ่นบ้าน (*Hirundo rustica*) เป็นนกที่พบได้ทั่วโลก อพยพมายังประเทศไทยในช่วงฤดูหนาว เพศผู้และเพศเมียมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่คล้ายคลึงกัน และสามารถแบ่งได้เป็น 6 สปีชีส์ย่อย ได้แก่ *Hirundo rustica rustica*, *H. r. gutturalis*, *H. r. tytleri*, *H. r. transitiva*, *H. r. savignii* และ *H. r. erythrogaster* โดยสปีชีส์ย่อยจะสัมพันธ์กับแหล่งที่อยู่หรือทวีปที่นกอาศัยในช่วงฤดูผสมพันธุ์ นอกจากนั้นยังมีรายงานว่าลักษณะสีขนบริเวณอกแตกต่างกันตามสปีชีส์ย่อยและเพศ ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อระบุเพศและสปีชีส์ย่อย และศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกนางแอ่นบ้านในประเทศไทยด้วยเทคนิคทางโมเลกุล โดยเก็บตัวอย่างเลือดและขนผลัดของนกจำนวน 300 ตัว ใน 3 ฤดูอพยพ (ปี 2558-2560) จากอำเภอปัว จังหวัดน่าน และถนนสีลม เขตบางรัก กรุงเทพมหานคร นำมาเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) ตำแหน่งยีน *Chromo-helicase-DNA-binding* (*CHD*) ด้วยไพรเมอร์ P2/P8 สามารถระบุเพศได้ 292 ตัว โดยแบ่งเป็นเพศผู้จำนวน 165 ตัว และเพศเมียจำนวน 127 ตัว คิดเป็นอัตราส่วนเพศผู้ต่อเพศเมียในฤดูอพยพ 1-3 คือ 2.41: 1, 1: 1.01 และ 1.41: 1 ตามลำดับ และพบว่าความยาวจุดแต้มขาวบนขนหางคู่นอกและความเว้าลึกของขนหางสัมพันธ์กับเพศ ซึ่งให้ความถูกต้องในการระบุเพศมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ และในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างนกนางแอ่นบ้านในฤดูอพยพที่ 1 ในตำแหน่งยีน *CHD-Z* พบว่า สามารถแบ่งนกนางแอ่นบ้านเป็น 2 กลุ่ม ส่วนการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในตำแหน่งยีน *Nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase subnit* (*ND2*) และ *Cytochome b* (*Cyt-b*) ของตัวอย่างฤดูอพยพที่ 2 และ 3 จำนวน 20 ตัวอย่าง นกนางแอ่นบ้านส่วนใหญ่ คือ จำนวน 14 ตัว มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับ *H. r. gutturalis* และ 2 ตัว มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับ *H. r. tytleri* แต่พบ 4 ตัวไม่มีความสัมพันธ์กับสปีชีส์ย่อยในฐานข้อมูล National center for biotechnology information (NCBI) จึงอาจกล่าวได้ว่ากลุ่มตัวอย่างนกนางแอ่นบ้านที่พบในประเทศไทยมีอย่างน้อย 2 สปีชีส์ย่อย สำหรับการศึกษาลักษณะสีขนบริเวณอกไม่พบความสัมพันธ์กับสปีชีส์ย่อย แต่มีแนวโน้มสัมพันธ์กับเพศ

คำสำคัญ: การระบุเพศ ความหลากหลายทางพันธุกรรม นกนางแอ่นบ้าน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thesis Title	Subspecies and Gender Identification of Barn Swallow (*Hirundo rustica* Linnaeus) in Thailand
Student Name	Thanyalak Malaitad
Student ID	58605046
Degree	Master of Science (Biotechnology)
Department	Biology
Year	2017
Thesis Advisor	Asst. Prof. Dr. Supattra Poeaim

Abstract

Barn Swallows (*Hirundo rustica*) can be found around the world and migrate to Thailand in winter. Males and females are similar in their morphology and they were divided into 6 subspecies which are *Hirundo rustica rustica, H. r. gutturalis, H. r. tytleri, H. r. transitiva, H. r. savignii and H. r. erythrogaster.* These subspecies can be found in their continent in which they live during the breeding season. Moreover, previous report found that different feather color could be found not only in each subspecies but also in different gender. The aims of this study were to identify gender, subspecies and estimate the genetic diversity of Barn Swallow in Thailand by molecular technique. Blood and molting feather samples, which amounted to 300 samples, were collected from Pua district, Nan and Silom road, Bangrak district, Bangkok during three seasonal migrations (2015-2017). Afterwards, *Chromo-helicase-DNA-binding* (*CHD*) region was amplified by Polymerase chain reaction (PCR) with P2/P8 primer. The results showed that 292 identified samples were 165 males and 127 females. A ratio of male to female during the first, second and third seasonal migrations was 2.41: 1, 1: 1.01 and 1.41: 1 respectively. We also found that white spot length on the outer tail and tail fork were related to their gender. They can identify gender of the bird more than 80 % correctly. The genetic diversity in *CHD-Z* region of the bird in the first seasonal migration was analyzed which could be divided into 2 groups. The genetic diversity in *Nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase subnit (ND2)* and *Cytochome b* (*Cyt-b*) regions of 20 samples of the second and the third seasonal migrations were analyzed. 14 samples out of the 20 sample were found to be related to *H. r. gutturalis* and 2 samples related to *H. r. tytleri.* However, other 4 samples were found to be unrelated to subspecies of National center for biotechnology information (NCBI) data. At least 2 subspecies of Barn Swallows were found in Thailand. The feather color study of the breast is not related to subspecies but it is possibly relate to gender.

Keywords: Gender identification, Genetic diversity, Barn Swallow

เอกสารนี้มีลิขสิทธิ์ ห้ามนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ในหัวข้อเรื่องการบ่งชี้สายพันธุ์ย่อยและเพศของนกนางแอ่นบ้านในประเทศไทย ประสบความสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี เนื่องจากได้รับความช่วยเหลือจากบุคคลที่มีพระคุณดังต่อไปนี้

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้กำลังใจ และทุ่มเททั้งกาย กำลังทรัพย์ รวมถึงตรวจวิทยานิพนธ์เล่มนี้ให้มีความสมบูรณ์มากขึ้น

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พนา โลหะทรัพย์ทวี ประธานกรรมการ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม อาจารย์บัณฑิตประจำสาขา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ประทีป ด้วงแค ผู้ทรงคุณวุฒิจากภายนอกสถาบัน ที่ร่วมพิจารณาในการแก้ไขวิทยานิพนธ์เล่มนี้

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ พรชัย หลายพสุ และรองศาสตราจารย์ สายชล สินสมบูรณ์ทอง ภาควิชาสถิติ คณะวิทยาศาตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้ความรู้ทางสถิติ จึงสามารถนำความรู้ที่ได้มาใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลงานวิจัย นำเสนอผลงานได้อย่างน่าเชื่อถือ

ขอขอบพระคุณ กลุ่มงานวิจัยสัตว์ป่า สำนักอนุรักษ์สัตว์ป่า กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเก็บตัวอย่างนกนางแอ่นบ้าน รวมถึงนายไกรรัตน์ เอี่ยมอำไพ และทีมงานจากสถานีวิจัยสัตว์ป่าบึงบอระเพ็ด ที่ให้ทั้งความรู้และคำแนะนำ ทำให้สามารถเข้าใจลักษณะสัณฐานวิทยา พฤติกรรมการดำรงชีวิตของนกนางแอ่นบ้าน และช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่าง

ขอขอบพระคุณ ทุนอุดหนุนการศึกษาในระดับบัณฑิตของคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังและการศึกษาวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากงบรายได้ของคณะวิทยาศาสตร์ ประจำปีงบประมาณ 2558-2560 และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการที่อำนวยความสะดวก ทั้งยังได้รับความช่วยเหลือของพี่ๆ เพื่อน ณ ห้องเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์ อาคารจุฬาภรณวลัยลักษณ์ 1 จึงสามารถทำงานวิจัยนี้ได้อย่างราบรื่น

สุดท้ายนี้ผู้จัดทำขอขอบพระคุณ บิดา มารดา และบุคคลในครอบครัวที่สนับสนุนและให้กำลังใจตลอดการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้ จนสามารถสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี หากวิทยานิพนธ์เล่มนี้ผิดพลาดประการใดผู้จัดทำขออภัยมา ณ ที่นี่ด้วย

นางสาว ธัญลักษณ์ มาลัยทัศน์
กันยายน 2560

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ข
กิตติกรรมประกาศ ..... ค
สารบัญ ..... ง
สารบัญตาราง ..... ฉ
สารบัญรูป ..... ช
บทที่ 1 บทนำ 1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย 1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย 2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย 3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 4
2.1 นกนางแอ่น 4
2.1.1 ลักษณะทั่วไปและพฤติกรรมของนกนางแอ่นบ้าน 4
2.1.2 สปีชีส์ย่อยของนกนางแอ่นบ้าน 6
2.2 การสำรวจประชากรนก 8
2.3 การระบุเพศนก 10
2.4 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่สัมพันธ์กับเพศนก 13
2.5 การศึกษาความหลากหลายของนกด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ 15
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย 18
3.1 อุปกรณ์ 18
3.2 สารเคมี 19
3.3 วิธีการ 20
3.3.1 การเก็บตัวอย่าง 20
3.3.2 การสกัดดีเอ็นเอ 22
3.3.2.1 การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเนื้อเยื่อ 22
3.3.2.2 การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือด 23
3.3.3 การทำให้กระดาษ FTA Card บริสุทธิ์ 23
3.3.4 การระบุเพศด้วยเทคนิคทางโมเลกุล 24
3.3.5 การวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางสัณฐานวิทยากับเพศ 25
3.3.6 การศึกษาความหลากหลายและระบุสปีชีส์ย่อยด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ 25

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

หน้า

บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล 27
4.1 ผลการเก็บตัวอย่างนกนางแอ่นบ้าน 27
4.2 ผลการระบุเพศด้วยเทคนิคทางโมเลกุล 29
4.2.1 สภาวะและไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการระบุเพศนกนางแอ่นบ้าน 29
4.2.2 การระบุเพศนกนางแอ่นบ้าน 31
4.3 ผลการระบุเพศด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา 33
4.3.1 ผลการวิเคราะห์ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่สัมพันธ์กับเพศ 33
4.3.2 ผลการระบุเพศนกนางแอ่นบ้านในภาคสนาม 37
4.4 ผลการศึกษาความหลากหลายและระบุสปีชีส์ย่อยด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ 39
4.4.1 การศึกษาความหลากหลายด้วยตำแหน่งยีน *CHD* 39
4.4.2 การศึกษาความหลากหลายและระบุสปีชีส์ย่อยด้วยตำแหน่งยีน *ND2* และ *cyt-b* 41
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 51
5.1 สรุปผลการวิจัย 51
5.2 ข้อเสนอแนะ 52
เอกสารอ้างอิง 53
ภาคผนวก 60
ภาคผนวก ก 61
ภาคผนวก ข 77
ภาคผนวก ค 78
ประวัติผู้เขียน 80
ผลงานทางวิชาการ 81

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

3.1 ชนิดและลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษา 19
3.2 จำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา 21
3.3 ขั้นตอน อุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตำแหน่งยีน *CHD* 24
3.4 ขั้นตอน อุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตำแหน่งยีน *ND2* และ *Cyt-b* 26
4.1 จำนวนตัวอย่างนกนางแอ่นบ้านที่จับได้ในแต่ละฤดูอพยพ 27
4.2 ผลการระบุเพศนกนางแอ่นบ้านด้วยเทคนิคทางโมเลกุล 32
4.3 รูปแบบการระบุเพศนกจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาของนกนางแอ่นบ้านด้วยโปรแกรม Rapid miner studio 35
4.4 ผลการทำนายเพศในภาคสนามด้วยลักษณะความยาวจุดแต้มขาวบนขนหางคู่นอกและความเว้าลึกของขนหาง 38
4.5 แสดงรหัส สปีชีส์ย่อย Accession number ค่า Identity และประเทศ ที่ใช้ในการศึกษานกนางแอ่นบ้าน จากฐานข้อมูล GenBank ใน NCBI เปรียบเทียบกับนกนางแอ่นบ้านรหัส BS95 43
4.6 เปอร์เซ็นต์การเกิด SNP และรูปแบบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แปรผันในตำแหน่งยีน *ND2* และ *Cyt-b* ของนกนางแอ่นบ้านสปีชีส์ย่อย *H. r. gutturalis* และ *H. r. tytleri* 47
ก-1 ตัวอย่างนกนางแอ่นบ้านฤดูอพยพที่ 2 ดักจับวันที่ 22-23 ธันวาคม 2558 61
ก-2 ตัวอย่างนกนางแอ่นบ้านฤดูอพยพที่ 2 ดักจับวันที่ 11 มกราคม 2559 69
ก-3 ตัวอย่างนกนางแอ่นบ้านฤดูอพยพที่ 3 ดักจับวันที่ 20-21 ธันวาคม 2559 71
ก-4 ตัวอย่างนกนางแอ่นบ้านฤดูอพยพที่ 3 ดักจับวันที่ 23 มกราคม 2560 75

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของนกนางแอ่นบ้านตัวเต็มวัย: (ก) สีของลำตัว (ข) หน้าผาก (ค) คอและท้อง (ง) สีขนหางและจุดแต้มขาวบนขนหาง	5
2.2	เขตภูมิศาสตร์ของนกนางแอ่นบ้านใน 6 สปีชีส์ย่อยที่พบทั่วโลก	7
2.3	อุปกรณ์ วิธี Mist net ที่ใช้ในการดักจับนกนางแอ่นบ้าน: (ก) การขึงตาข่ายกับแท่งสแตนเลส (ข) การตั้งตาข่าย (ค) การนำนกออกจากตาข่าย (ง) ถุงพักนก	9
2.4	ลักษณะของยีน *CHD* บนโครโมโซมเพศของนก (ก) นกเพศผู้ (ข) นกเพศเมีย	10
2.5	ความแตกต่างบริเวณอินทรอนของอัลลีล *CHD-Z* และอัลลีล *CHD-W* และการแปลผลเพศด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส: (ก) บริเวณอินทรอนของอัลลีล *CHD-Z* มีขนาดใหญ่กว่าอัลลีล *CHD-W* (ข) บริเวณอินทรอนของอัลลีล *CHD-W* มีขนาดใหญ่กว่าอัลลีล *CHD-Z*	12
3.1	การเก็บข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยาของนกนางแอ่นบ้าน: (ก) อุปกรณ์ที่ใช้ในการวัด (ข) การใส่รหัสห่วงขา (ค) การชั่งน้ำหนัก (ง) การวัดความยาวหาง (จ) การสังเกตความยาวและพื้นที่จุดแต้มขาวของขนหางคู่นอก (ฉ) การสังเกตสีขนบริเวณอก	21
3.2	วิธีการเก็บตัวอย่างนกนางแอ่นบ้าน: (ก) การดึงขนผลัด (ข) การเจาะเลือดที่โคนขา (ค) การใช้หลอด Capillary เก็บเลือด (ง) การซับหรือป้ายเลือดด้วยกระดาษ FTA	22
4.1	ลักษณะสีขนบริเวณอกนกนางแอ่นบ้าน ซึ่งแบ่งออกเป็น 5 ลักษณะ คือ (ก) อกส้มเข้ม (ข) อกส้มปานกลาง (ค) อกสีส้มอ่อนปลายส่วนล่างสีส้มเข้ม (ง) อกส้มอ่อน (จ) อกขาว	29
4.2	การเปรียบเทียบผลิตภัณฑ์ PCR ของนกนางแอ่นบ้าน (*Hirundo rustica*: BS19 และ BS29) และไก่ (*Gallus gallus*: C1 และ C2) ที่เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยไพรเมอร์ P2/P8, 1237L/1272H และ 2550F/2718R	30
4.3	แผนภาพ Decision tree ที่ใช้ในการจำแนกเพศจากความยาวจุดแต้มบนขนหางคู่นอกและความเว้าลึกของขนหาง (mm) เมื่อเทียบกับการระบุเพศทางโมเลกุล	36
4.4	แผนภูมิความสัมพันธ์ (Dendrogram) ของนกนางแอ่นบ้านจำนวน 5 ตัวอย่าง และนกในวงศ์ Passeriformes จำนวน 10 ตัวอย่างที่ศึกษาความสัมพันธ์ด้วยโปรแกรม Phylip เวอร์ชั่น 3.6	40
4.5	การเปรียบเทียบอุณหภูมิ Annealing จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในตำแหน่งยีน *ND2* และ *Cyt-b* ของนกนางแอ่นบ้าน (*Hirundo rustica*: BS30 และ BS31)	41
4.6	Phylogenetic tree ของนกนางแอ่นบ้านที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MEGA 6 ด้วยวิธี Maximun-likelihood โดยทำซ้ำ 1000 ครั้ง จากลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งยีน *ND2* และ *Cyt-b* เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล GenBank สำหรับหมายเลขในวงเล็บแสดงสีขนบริเวณอกได้แก่ (1) อกสีส้มเข้ม (2) อกส้มปานกลาง (3) อกสีส้มอ่อนปลายส่วนล่างสีส้มเข้ม (4) อกสีส้มอ่อน และ (5) อกสีขาว	45
4.7	แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งยีน *Cyt-b* ของนกนางแอ่นบ้าน โดยลูกศรชี้ตำแหน่งที่แตกต่างกัน	48

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.8 Phylogenetic tree ของนกนางแอ่นบ้านที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MEGA 6 จากลำดับนิวคลีโอไทด์ (ก) ตำแหน่งยีน *Cyt-b* และ (ข) ตำแหน่งยีน *ND2* เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์กับบฐานข้อมูล GenBank..... 49

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย

นกนางแอ่นบ้าน (Barn Swallow) มีชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Hirundo rustica* จัดอยู่ในอันดับ Passeriformes วงศ์ Hirundinidae เป็นนกอพยพมายังประเทศไทยช่วงฤดูหนาว อพยพมาทางภาคเหนือลงสู่ภาคใต้ (เดือนตุลาคม-เดือนเมษายน) โดยจะบินหากินอยู่บนท้องฟ้า และเกาะนอนในเวลากลางคืนตามสายไฟฟ้าหรือต้นไม้สูง ซึ่งแหล่งที่พบมาก คืออำเภอปัว จังหวัดน่าน อำเภอชุมแสง จังหวัดนครสวรรค์ ถนนสีลม เขตบางรัก กรุงเทพมหานคร และอำเภอเบตง จังหวัดยะลา โดยสุธี (2539) ได้กล่าวว่านกนางแอ่นบ้าน คือสัญลักษณ์แห่งฤดูหนาวของกรุงเทพมหานคร

นกนางแอ่นบ้าน (*H. rustica*) เป็นนกขนาดเล็ก (15 ซ.ม.) ลำตัวยาว ขาสั้น ปีกกว้าง หางเว้าลึก โดยขนหางคู่นอกสุดมีขนาดยาวมาก เมื่อบินจะเห็นจุดแต้มขาวทั้งด้านบนและด้านล่างของหาง สีของลำตัวและหัวมีสีน้ำเงินเข้ม หน้าผากและคอมีสีน้ำตาลเข้ม ลำตัวด้านล่างและใต้ปีกสีขาวจนถึงสีน้ำตาลเหลือง (โอภาส, 2545) อุปนิสัยของนกชนิดนี้เป็นนกที่ครองคู่เดียว (Kleven *et al.*, 2006) ดังนั้นจึงควรมีอัตราส่วนเพศที่เท่ากัน แต่บางรายงานกล่าวว่าอัตราส่วนเพศผู้มากกว่าเพศเมีย เนื่องจากลูกนกเพศผู้จะได้รับอาหารและการดูแลมากกว่าเพศเมีย อีกทั้งเพศผู้ยังมีความแข็งแรงมากกว่าเพศเมียในการบินอพยพ ดังนั้นอัตราการมีชีวิตรอดของเพศผู้จึงมีมากกว่าเพศเมีย (Boncoraglio *et al.*, 2008) ด้วยเหตุนี้จึงสนใจศึกษาอัตราส่วนเพศของนกนางแอ่นบ้าน แต่อย่างไรก็ตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาของนกนางแอ่นบ้านเป็นแบบ Sexually monomorphic คือลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเพศผู้และเพศเมียเหมือนกัน ซึ่งยากต่อการจำแนกเพศ แต่มีข้อมูลการจำแนกเพศของนกนางแอ่นบ้านที่สามารถศึกษาได้จากลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้ เช่น ความยาวของขนหางคู่นอก (Hermosell *et al.*, 2007) และความยาวของจุดแต้มขาวบนขนหางคู่นอก (Duijns *et al.*, 2011) หรือการคัดเลือกคู่ผสมพันธุ์ของเพศเมียที่จะเลือกผสมพันธุ์กับเพศผู้ที่พิจารณาสีขนบริเวณอก (Hasegawa *et al.*, 2010; Wilkins *et al.*, 2016) อย่างไรก็ตามการจำแนกด้วยวิธีนี้มีข้อจำกัดในการเก็บข้อมูลในภาคสนาม เนื่องจากขนหางมีความยาวไม่สมบูรณ์จากการได้รับบาดเจ็บในช่วงเวลาการอพยพ นกมีการผลัดขนหางและมีการแปรผันของสีขนขณะที่เก็บข้อมูล (Sarah, 2007)

ด้วยเหตุนี้จึงมีการใช้เทคนิคทางโมเลกุล คือ Polymerase Chain Reaction (PCR) มาใช้ในการระบุเพศนก โดยนิยมศึกษาบริเวณยีน *Chromo-helicase-DNA-binding* (*CHD*) ซึ่งพบบนโครโมโซมเพศของนกทุกสปีชีส์ (Griffiths and Korn, 1997) และใช้ Universal primer ที่เหมาะสมในการระบุเพศนก ได้แก่ P2/P8 (Griffiths *et al.*, 1998) 1237L/1272H (Kahn *et al.*, 1998) และ 2550F/2718R (Fridolfsson and Ellegren, 1999) ซึ่งวิเคราะห์ผลด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยอาศัยความแตกต่างบริเวณอินทรอนของยีน *CHD-Z* และ *CHD-W* ในการจำแนกเพศ (Kahn and Quinn, 1998) ทั้งนี้มีรายงานการใช้ Universal primer ในการระบุเพศนกหลากหลายชนิด เช่น นกเหยี่ยวนิ้วสั้น (Sacchi *et al.*, 2004) นกปากช้อนหน้าดำ (Cheng *et al.*, 2006) และนกคอกคาทีล (Cerit and Avanus, 2007) นกในวงศ์นกแก้ว ได้แก่ Sun conure (*Aratinga solstitialis*), Monk

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

parakeet (*Myiopsitta monachus*) และ Crimson-bellied conure (*Pyrrhura perlata*) (สุพัตรา และคณะ, 2555) นกในสกุลนกหัวโตทรายเล็ก (*Charadrius*) (ณิชาภัทร และคณะ, 2556) นกนางแอ่นแปซิฟิก (Hasegawa and Arai, 2017) และนกนางแอ่นบ้าน (Kleven *et al.*, 2006; Saino *et al.*, 2002; Guerrini *et al.*, 2014 และ Malaitad *et al.*, 2015) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้ Universal primer ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมตำแหน่งยีน *CHD* พร้อมทั้งศึกษาอัตราส่วนเพศและหาความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางสัณฐานวิทยากับเพศ เพื่อนำไปสู่การระบุเพศได้อย่างรวดเร็วในภาคสนาม

ในการศึกษาความสัมพันธ์ของลักษณะทางสัณฐานวิทยา เช่น สีขนบริเวณหาง หลัง และอกกับการบ่งชี้ในระดับสปีชีส์หรือสปีชีส์ย่อยนั้นมีรายงานของนิตยา (2539) อ้างถึง Dillon (1973) ศึกษานกติ๊ดใหญ่ (*Parus major*) ซึ่งเป็นกลุ่มประชากรที่อาศัยอยู่ต่างเขตภูมิศาสตร์จะมีลักษณะของสีขนที่ต่างกัน โดยพบการเปลี่ยนแปลงสีขนในพื้นที่ที่มีการผสมพันธุ์กันในรอยต่อของ 2 ทวีป และทำให้นกมีสีขนต่างไปจากเดิม สำหรับช่วงฤดูผสมพันธุ์ของนกนางแอ่นบ้านพบความความแตกต่างของสีขนบริเวณอกที่แตกต่างกันในแต่ละพื้นที่ (Turner, 2004) จึงสนใจศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสปีชีส์ย่อยกับสีบริเวณอกของนกนางแอ่นบ้าน แม้ฤดูอพยพจะมีความแปรผันของสีขนของนกแต่ลักษณะของสีที่เปลี่ยนแปลงนี้อาจมีผลมาจากลูกผสมจากการผสมระหว่างสปีชีส์ย่อยที่แตกต่างกัน ทั้งนี้งานวิจัยของ Dor *et al.* (2010) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ของนกในสกุล *Hirundo* จำนวน 14 สปีชีส์จากสถานที่ต่างๆทั่วโลก (ไม่มีตัวอย่างในประเทศไทย) โดยศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ในไมโทคอนเดรีย 6 ตำแหน่ง คือ *Nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase subnit (ND2), Cytochome C oxidase subunit I (COI), Cytochome C oxidase subunit II (COII), Cytochome b (Cyt-b), ATPases 6* และ *ATPases 8* และในนิวเคลียส 1 ตำแหน่ง คือ *b-fibrinnogen intron 7 (bfib-7)* โดยตำแหน่งยีน *ND2* และ *Cyt-b* สามารถแบ่งกลุ่มของนกในสกุลนี้ออกเป็น 4 กลุ่มใหญ่ คือ Barn Swallow, Pacific Swallow, Blue Swallow และ Pearl-breasted Swallow โดยในกลุ่ม Barn Swallow หรือนกนางแอ่นบ้าน ซึ่งมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายคลึงกันนั้น สามารถแบ่งออกเป็น 6 สปีชีส์ย่อยตามแหล่งที่มาทางภูมิศาสตร์ ได้แก่ *Hirundo rustica rustica, H. r. gutturalis, H. r. tytleri, H. r. transitiva, H. r. savignii* และ *H. r. erythrogaster* ทั้งนี้จากรายงานของตวงรัตน์ และสุมาลี (2541) ได้จำแนกนกนางแอ่นบ้านเป็น 3 สปีชีส์ย่อยตามภาคต่างๆที่พบ ได้แก่ *H. r. gutturalis* พบภาคเหนือ *H. r. tytleri* พบภาคกลางและภาคตะวันออกเฉียงใต้ และ *H. r. erythrogaster* พบทั่วทุกภาค แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาในระดับโมเลกุล ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาความหลากหลายเพื่อระบุสปีชีส์ย่อยของนกชนิดนี้ อีกทั้งยังสามารถทราบเส้นทางอพยพที่ชัดเจนขึ้นจากการระบุสปีชีส์ย่อย เพื่อการวางแผนป้องกันโรคจากนกอพยพซึ่งอาจเป็นพาหะนำโรคสู่ประเทศไทย

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 เพื่อบ่งชี้เพศของนกนางแอ่นบ้านจากตัวอย่างที่สุ่มเก็บในประเทศไทยและหาความความสัมพันธ์ระหว่างเพศกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา

1.2.2 เพื่อศึกษาความหลากหลายและบ่งชี้สายพันธุ์ย่อยของนกนางแอ่นบ้านที่สุ่มเก็บในประเทศไทย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

ศึกษาเฉพาะนกนางแอ่นบ้านที่เก็บตัวอย่างจากอำเภอปัว จังหวัดน่าน และถนนสีลม เขตบางรัก กรุงเทพมหานคร ใน 3 ฤดูอพยพ แบ่งเป็น ฤดูอพยพที่ 1 (ม.ค. ปี 2558) ฤดูอพยพที่ 2 (ธ.ค. ปี 2558 และ ม.ค. ปี 2559) และฤดูอพยพที่ 3 (ธ.ค. ปี 2559 และ ม.ค. ปี 2560) ภายใต้การดูแลของสถานีวิจัยสัตว์ป่าบึงบอระเพ็ด กลุ่มงานวิจัยสัตว์ป่า สำนักงานอนุรักษ์สัตว์ป่า กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพันธุ์พืช โดยศึกษาอัตราส่วนเพศเฉพาะตำแหน่งยีน *CHD* และศึกษาความหลากหลายจากตำแหน่งยีน *CHD* พร้อมทั้งบ่งชี้สายพันธุ์ย่อยของนกนางแอ่นบ้านจากการศึกษาความสัมพันธ์ของนกนางแอ่นบ้านด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งยีน *ND2* และ *Cyt-b*

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ทราบลักษณะทางสัณฐานวิทยาในการนำมาใช้ระบุเพศนกนางแอ่นบ้านในภาคสนาม

1.4.2 ทราบอัตราส่วนเพศของนกนางแอ่นบ้านที่อพยพมายังประเทศไทย

1.4.3 ระบุสปีชีส์ย่อยจากการศึกษาความหลากหลายของนกนางแอ่นบ้านที่อพยพมาในประเทศไทย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 นกนางแอ่น

นกนางแอ่น (Swallow) เป็นสัตว์ป่าคุ้มครองตามพระราชบัญญัติสงวนและคุ้มครองสัตว์ป่า ปี 2535 โดยจัดอยู่ในอันดับนกเกาะคอน Passeriformes วงศ์ Hirundinidae แบ่งออกเป็น 2 วงศ์ย่อย คือ วงศ์ย่อยนกนางแอ่นแม่น้ำ (River Martins) หรือ Pseudochelidoninae เป็นนกขนาดกลาง มีขนสีดำ ตาสีแดง ปากอวบกว้างสีส้มแดง หางเหลี่ยม โครงสร้างต่างจากนกนางแอ่นชนิดอื่น ได้แก่ นกนางแอ่นแม่น้ำแอฟริกา (*Pseudochelidon eurystomina*) และนกเจ้าฟ้าหญิงสิรินธร หรือนกตาพอง (*Pseudochelidon sirintarae*) ซึ่งคาดว่าสูญพันธุ์แล้วจากประเทศไทย และวงศ์ย่อยนกนางแอ่น (Martins and Swallows) หรือ Subfamily Hirundininae ทั่วโลกพบ 13 สกุล แต่ประเทศไทยพบเพียง 5 สกุล คือ สกุลนกนางแอ่นลาย (*Cecropis* sp.) สกุลนกนางแอ่นทราย (*Riporia* sp.) สกุลนกนางแอ่นผาสีคล้ำ (*Ptyonoprogne* sp.) สกุลนกนางแอ่นมาร์ติน (*Delichon* sp.) และสกุลนกนางแอ่นบ้าน (*Hirundo* sp.) (Humphrey and Bain, 1990)

2.1.1 ลักษณะทั่วไปและพฤติกรรมของนกนางแอ่นบ้าน

นกนางแอ่นบ้าน (Barn Swallow: *Hirundo rustica*) เป็นนกอพยพมายังประเทศไทยในช่วงฤดูหนาว และบางส่วนเป็นนกประจำถิ่น (สมิทธิ์, 2547) ซึ่งงานวิจัยของโอภาส (2542) อ้างถึง Hodgson (1836) กล่าวว่านกชนิดนี้มีลักษณะใกล้เคียงกับนกในอันดับ Apodiformes วงศ์ Apodidae เช่น นกแอ่นบ้าน (House Swift) นกแอ่นกินรัง (German's Swiftlet) และนกแอ่นตาล (Asian Palm Swift) เป็นต้น โดยนกเหล่านี้เป็นนกประจำถิ่น แต่มีสกุลที่ต่างกับนกนางแอ่นบ้าน (Barn Swallow) ที่เป็นนกอพยพ ลักษณะทั่วไปของนกนางแอ่นบ้าน เป็นนกลำตัวเพรียวเล็ก ขนาดประมาณ 14-15 เซนติเมตร ปากมีสีดำ นกตัวเต็มวัยมีลำตัวด้านบนและแถบคาดอกสีน้ำเงินเหลือบดำ (รูปที่ 2.1ก) หน้าผาก (รูปที่ 2.1ข) และคอสีน้ำตาลแดง ลำตัวด้านล่างสีขาว (รูปที่ 2.1ค) ขาและหางมีสีดำ แต่บางรายงานกล่าวว่าลำตัวด้านล่างมีสีส้มอ่อนถึงส้มเข้ม (รุ่งโรจน์, 2553) หางเป็นแฉกเว้าลึก เมื่อแผ่หางออกจะมีจุดแต้มขาวบนขนหางแต่ละเส้นและลักษณะของจุดแต้มขาวมีลักษณะรีโดยขนหางคู่นอกยาวที่สุด (รูปที่ 2.1ง)

Boncoraglio *et al.* (2008) กล่าวถึงพฤติกรรมการเลี้ยงดูลูกของนกนางแอ่นบ้าน โดยลูกนกเพศผู้จะได้รับอาหารและการดูแลจากพ่อแม่มากกว่าลูกนกเพศเมีย เนื่องจากลูกนกเพศผู้จะมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่โดนเด่น คือ มีลักษณะต่างๆที่สมบูรณ์ ทำให้ได้รับการเลี้ยงดูเป็นพิเศษจากพ่อแม่นก หรือนกนางแอ่นบ้านบางคู่มีจำนวนลูกนกเพศผู้ในรังน้อยกว่าลูกนกเพศเมีย จึงทำให้พ่อแม่นกดูแลลูกนกเพศผู้มากกว่าลูกนกเพศเมีย ด้วยเหตุนี้จึงทำให้เพศผู้มีขนาดใหญ่กว่าเพศเมีย ทั้งยังทำให้อัตราการรอดชีวิตของเพศผู้มากกว่าเพศเมีย เพราะลักษณะทั่วไปของสิ่งมีชีวิตที่มีขนาดใหญ่กว่าจะแข็งแรงและมีพละกำลังมากกว่าสิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก ทำให้มีอัตราการรอดชีวิตในการอพยพได้มากกว่าเพศเมีย จึงกล่าวได้ว่าเพศผู้มีอัตราส่วนมากกว่าเพศเมีย แต่มีงานวิจัยของ Saino *et al.*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(1999) กล่าวถึงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของลูกนกเพศเมียที่มีความสมบูรณ์เช่นเดียวกับลูกนกเพศผู้ จะได้รับการเลี้ยงดูพิเศษจากพ่อแม่นกเช่นกัน

รูปที่ 2.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของนกนางแอ่นบ้านตัวเต็มวัย: (ก) สีของลำตัว (ข) หน้าผาก (ค) คอ และท้อง (ง) สีขนหางและจุดแต้มขาวบนขนหาง
(ที่มา: รูปถ่ายโดย อรณิช ดีสิทธิเวช, 2558)

สำหรับลักษณะนิสัยทั่วไปของนกนางแอ่นบ้าน มักจะอยู่รวมกันเป็นฝูงและบินบนท้องฟ้าตามพื้นที่โล่ง พบตั้งแต่พื้นที่ราบถึงความสูง 2,000 เมตร จากระดับน้ำทะเล บินโฉบเพื่อจับแมลงกิน ซึ่งช่วยลดจำนวนแมลงหรือยุงได้เป็นอย่างดี ตอนเย็นจะรวมกลุ่มกันตามต้นไม้ ชายคาบ้านเรือน หรือสายไฟเพื่อพักนอน (สมิทธิ์, 2547) นกนางแอ่นบ้านจะทำรังเกือบตลอดทั้งปี ตามสิ่งก่อสร้างหรือหน้าผา โดยใช้ส่วนประกอบหลักเป็นดินโคลนผสมกับวัสดุอื่นๆ เช่น ขนนก ใบหญ้า หรืออุจจาระของนก ซึ่งรังจะมีลักษณะคล้ายถ้วย (รุ่งโรจน์, 2542) นกนางแอ่นบ้านจะผสมพันธุ์กันอย่างน้อยปีละ 2 ครั้ง และช่วยกันทำรัง พร้อมทั้งช่วยกันฟักไข่และเลี้ยงดูลูกในรังจนกว่าลูกนกจะบินออกจากรังได้ นกชนิดนี้มีนิสัยครองคู่เดียวและจะจับคู่กันไปตลอดชีวิต ถ้าหากตัวใดตายก่อน ตัวที่ยังมีชีวิตอยู่ก็จะไปจับคู่ใหม่ และครองคู่กันไปตลอดชีวิต ดังนั้นนกนางแอ่นบ้านน่าจะมีอัตราส่วนของเพศผู้ต่อเพศเมียใกล้เคียงกัน (Kleven *et al.*, 2006) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Saino *et al.* (2002) ที่พบว่า ลักษณะทางสัณฐานวิทยา การวางไข่ และลำดับการฟักไข่ของลูกนกไม่มีความสัมพันธ์กับอัตราส่วนของเพศลูกนก แต่พบว่า เพศผู้และเพศเมียจะแบ่งกันเลี้ยงลูกในอัตราส่วนที่เท่ากัน ทั้งนี้จำนวนของลูกนกจะขึ้นอยู่กับขนาดของรังที่เพศผู้และเพศเมียใช้ฟักไข่ และสำหรับเพศเมียที่มีอายุมากขึ้นจะมีจำนวนลูกนกที่น้อยลงในการเลี้ยงดู

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

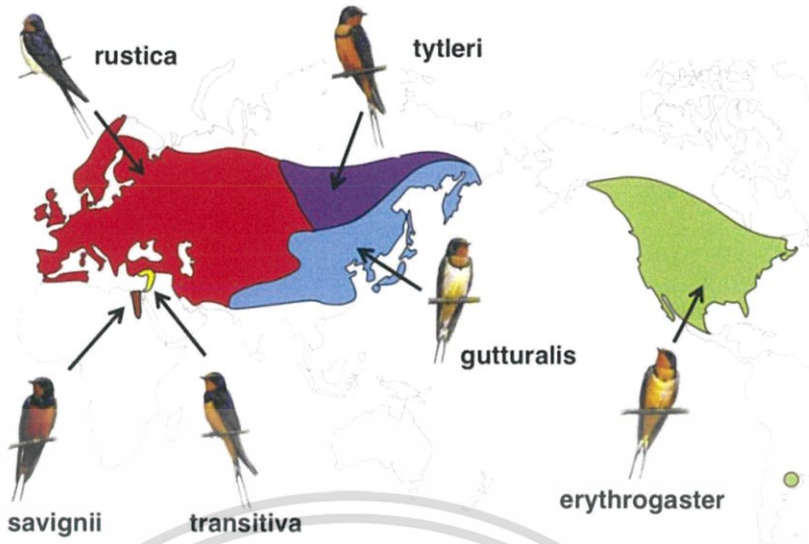
นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการผสมพันธุ์ของนกนางแอ่นบ้าน (*H. r. gutturalis*) โดยเก็บตัวอย่างจากคู่ผสมพันธุ์จำนวน 18 คู่ ในตอนใต้ของประเทศจีน พบการผสมพันธุ์ในพื้นที่เขตร้อนช่วงเดือนเมษายนถึงเดือนกรกฎาคม ใน 1 รังจะประกอบไปด้วยลูกนกประมาณ 2-5 ตัว และพ่อแม่นกมักจะมีน้ำหนักตัวที่น้อย อีกทั้งการฟักไข่ยังขึ้นกับอุณหภูมิอีกด้วย (Pagani-Nunez *et al*., 2016) สำหรับนกนางแอ่นบ้านในประเทศไทยพบการทำรังวางไข่ที่จังหวัดน่าน โดยตวงรัตน์ และสุมาลี (2541) รายงานว่าบริเวณอำเภอปัว จังหวัดน่าน มีสภาพอากาศหนาวจึงมีความเหมาะสมต่อการทำรังวางไข่ของนกนางแอ่นบ้าน ซึ่งจากการดักจับนกนางแอ่นบ้านตั้งแต่ปี 2537-2541 ได้จำนวน 2,553 ตัว ไม่สามารถระบุเพศได้จำนวน 59 ตัว และพบนกตัวเต็มวัยเพศผู้ 899 ตัว เพศเมียตัวเต็มวัย 476 ตัว โดยมีอัตราส่วนเพศผู้ต่อเพศเมียเป็น 1.89: 1 แต่เมื่อพิจาณานกวัยเด็กจำนวน 1,119 ตัว รวมด้วยจะพบอัตราส่วนเพศผู้ต่อเมียใกล้เคียง 1: 1 โดยสอดคล้องกับงานวิจัยของ Ding *et al*. (2017) ที่ศึกษานกในอันดับ Passeriformes คือ นกกระจิบหญ้าท้องเหลือง (*Prinia flaviventris*) ทางตะวันตกฉียงใต้ของประเทศจีน โดยเก็บตัวอย่างจากรังในช่วงฤดูผสมพันธ์ ได้ลูกนกจำนวน 132 ตัว และคู่ผสมพันธุ์ 31 คู่ รวมจำนวน 194 ตัว เมื่อตรวจสอบการระบุเพศด้วยเทคนิคทางโมเลกุล พบว่าอัตราส่วนเพศผู้ต่อเพศเมียใกล้เคียง 1: 1

2.1.2 สปีชีส์ย่อยของนกนางแอ่นบ้าน

สปีชีส์ย่อย หมายถึงกลุ่มประชากรที่มีลักษณะสำคัญเหมือนกัน กลุ่มประชากรนี้จะครอบครองที่อยู่อาศัยแตกต่างกันไป จึงทำให้เกิดสปีชีส์ย่อยตามเขตภูมิศาสตร์ (Geographical subspecies) หรือสปีชีส์ย่อยทางนิเวศวิทยา (Ecological subspecies)

สำหรับนกนางแอ่นบ้านจัดอยู่ในสกุล *Hirundo* เป็นสกุลที่มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยาน้อยมากและมีการแบ่งแยกสปีชีส์ย่อยตามเขตภูมิศาสตร์ โดยจากรายงานของ Tuner (2004) ได้ศึกษาความหลากหลายในสปีชีส์ย่อยของนกนางแอ่นบ้าน (*Hirundo rustica*) ซึ่งทั่วโลกมีทั้งหมด 6 สปีชีส์ย่อย โดยแบ่งตามทวีปที่พบ คือ *Hirundo rustica rustica* อาศัยในทวีปยุโรป ทวีปแอฟริกา และทวีปเอเชียตะวันตก *H. r. gutturalis* พบบริเวณตอนใต้และตะวันออกของทวีปเอเชีย *H. r. tytleri* พบบริเวณตะวันตกเฉียงเหนือของทวีปเอเชีย *H. r. transitiva* พบบริเวณตะวันออกของทะเลเมดิเตอร์เรเนียน *H. r. savignii* พบได้ทั่วไปตามแม่น้ำไนล์ในประเทศอียิปต์ และ *H. r. erythrogaster* พบบริเวณอเมริกาเหนือ ประเทศอาร์เจนตินา ดังรูปที่ 2.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.2 เขตภูมิศาสตร์ของนกนางแอ่นบ้านใน 6 สปีชีส์ย่อยที่พบทั่วโลก
(ที่มา: https://sites.google.com/site/wilkinsbioresearch/_/rsrc/1467139577867
/studysystem/Barn%20Swallow%20Range%20%2B%20Sampling2.tif?
height=300&width=400)

ส่วนงานวิจัยของ Dickinson and Dekker (2001) สามารถแบ่งนกนางแอ่นบ้านตามแหล่งที่พบ และลักษณะทางสัณฐานวิทยา ในทวีปเอเชียมี 3 สปีชีย์ย่อย ได้แก่ *Hirundo rustica rustica* พบในประเทศรัสเซียตะวันตกและทวีปยุโรป *H. r. gutturalis* พบในประเทศรัสเซียตะวันออก ประเทศจีน ประเทศเกาหลี และประเทศญี่ปุ่น และ *H. r. tytleri* พบในประเทศมองโกเลียและทะเลสาบไบคาลของประเทศรัสเซีย สำหรับในประเทศไทยได้มีรายงานจากดวงรัตน์ และสุมาลี (2541) รายงานว่าพบนกนางแอ่นบ้าน (*H. rustica*) เพียง 3 สปีชีส์ย่อยเท่านั้น โดยแบ่งตามแหล่งที่พบเช่นกัน คือ *Hirundo rustica tytleri* พบในภาคกลางและภาคตะวันออกเฉียงใต้ *H. r. gutturalis* พบในภาคเหนือ และ *H. r. erythrogaster* พบทั่วทุกภาค ซึ่งการระบุสปีชีส์ย่อยตามแหล่งที่พบอาจเกิดความสับสนในการระบุบางสปีชีส์ย่อยที่สามารถพบทั่วทุกพื้นที่ หรือในช่วงการอพยพอาจมีการผลัดขนทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสี ดังนั้นจึงสนใจศึกษาการระบุสปีชีส์ย่อยจากลำดับนิวคลีโอไทด์ เพื่อให้จำแนกสปีชีส์ย่อยของนกนางแอ่นบ้านได้อย่างถูกต้องและชัดเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 การสำรวจประชากรนก

หน่วยงานของกรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช สำรวจประชากรนกด้วยการดักจับและติดห่วงขา (Leg ringing) เปรียบเสมือนเป็นบัตรประชาชนของนก ซึ่งเป็นการระบุเส้นทางการอพยพในแนวเส้นตรง คือ ติดห่วงขาจากแหล่งใด และพบอีกครั้งจากแหล่งใด นอกจากนี้ยังมีการติดธงสี (Leg flag) เพื่อบ่งบอกว่านกได้บินอพยพผ่านประเทศนั้นๆ โดยประเทศไทยจะมีสัญลักษณ์ธงสี คือ สีเขียวและสีดำ จากงานวิจัยของสมชาย และคณะ (2554) ศึกษาเส้นทางการอพยพของนกชายเลน โดยพบนกที่ติดธงสีจากประเทศไทยอพยพไปยังต่างประเทศ จำนวน 6 ประเทศ ได้แก่ ประเทศออสเตรเลีย ประเทศจีน ประเทศอินโดนีเซีย ประเทศเกาหลี ประเทศมาเลเซีย และประเทศสิงคโปร์ ประกอบด้วย 12 สปีชีส์ จำนวนทั้งหมด 110 ตัว และในประเทศไทยยังพบนกอพยพที่ติดธงสีจากต่างประเทศจำนวน 9 ประเทศ ได้แก่ ประเทศออสเตรเลีย ประเทศจีน ประเทศฮ่องกง ประเทศอินโดนีเซีย ประเทศญี่ปุ่น ประเทศมาเลเซีย ประเทศรัสเซีย ประเทศสิงคโปร์ และประเทศไต้หวัน ประกอบด้วย 13 สปีชีส์ จำนวนทั้งหมด 60 ตัว ดังนั้นการติดห่วงขาและธงสีสามารถติดตามเส้นทางการอพยพ ประชากร และเฝ้าระวังโรคอุบัติใหม่ หรือโรคอุบัติซ้ำ แต่จากรายงานของตวงรัตน์ (2554) ที่ศึกษานกตามธรรมชาติกับความเสี่ยงต่อการเป็นพาหะนำโรคไข้หวัดนก จากนก 117 สปีชีส์ รวมถึงนกนางแอ่นบ้านในพื้นที่ต่างๆ ทั่วประเทศไทย จำนวน 4,076 ตัวอย่าง แต่ยังไม่พบเชื้อไข้หวัดนก (H5N1)

สำหรับนกนางแอ่นบ้านจัดอยู่ในกลุ่มนกบกที่เป็นนกอพยพย้ายถิ่นในช่วงฤดูหนาว โดยเป็นนกที่ตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิได้อย่างรวดเร็ว เมื่ออุณหภูมิลดต่ำลงจะเริ่มอพยพทันที ดังนั้นนกกลุ่มนี้จึงเปรียบเหมือนสัญลักษณ์แห่งฤดูกาลอพยพ โดยจากรายงานของกรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืชกล่าวว่า นกนางแอ่นบ้านจะทำรังวางไข่ในทวีปอเมริกาเหนือ ทวีปยุโรป และทวีปเอเชีย เมื่อถึงฤดูหนาวจะอพยพมายังทวีปอเมริกาใต้ ทวีปแอฟริกา ทวีปเอเชียตอนใต้ และบางส่วนของทวีปออสเตรเลีย เพื่อหนีสภาพอากาศหนาว และหาแหล่งอาหารเพื่อการอยู่รอด โดยนกนางแอ่นบ้านบินอพยพจากทางทิศเหนือสู่ทิศใต้ของประเทศไทย เกาะนอนพักตามสายไฟฟ้า บริเวณอำเภอปัว จังหวัดน่าน ถนนสีลม เขตบางรัก กรุงเทพมหานคร และอำเภอเบตง จังหวัดยะลา เป็นต้น ทางกรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืชจึงได้ทำการดักกับนกนางแอ่นบ้านและติดห่วงขา ทำให้ทราบข้อมูลประชากร นิเวศวิทยา และเส้นทางการอพยพในแนวตรง ซึ่งเป็นเส้นทางที่ยังไม่ชัดเจน เพราะนกอาจบินนอกเส้นทางการอพยพได้ เนื่องจากสภาพภูมิศาสตร์ และสภาพแวดล้อมเป็นตัวกำหนดเส้นทางการอพยพของนก (Cotton, 2003)

นกนางแอ่นบ้านจัดเป็นสัตว์ป่าคุ้มครอง ดังนั้นการดักจับนกเพื่อเก็บตัวอย่างมาศึกษา จึงต้องคำนึงถึงความปลอดภัยของนก ให้นกได้รับบาดเจ็บน้อยที่สุด สำหรับอุปกรณ์ในการดักจับนกอพยพมีหลายประเภท ได้แก่ ตาข่ายดักนก ตาข่ายเวหา สวิง กรง กับดัก แห ข่ายดักปลา และท่อยิงตาข่ายจับสัตว์ เป็นต้น ในการสุ่มจับนกนางแอ่นบ้านจะใช้อุปกรณ์ตาข่ายดักนก (Mist net) ซึ่งเป็นวิธีจับนกขนาดเล็กถึงขนาดกลาง โดยวิธีนี้เป็นวิธีที่เกิดอันตรายกับสัตว์ปีกได้น้อย เนื่องจากตาข่ายทำมาจากเส้นใยไนลอน หรือโพลีเอสเตอร์ แม้ว่ามีรายงานกล่าวถึงการบาดเจ็บที่เกิดขึ้นกับปีกของนกเมื่อใช้วิธีการดักจับนี้ แต่พบความเสี่ยงในการเกิดอันตรายเพียง 0.61 เปอร์เซ็นต์ (Spotswood *et al.*, 2011) แต่อัตราการตายของนกนางแอ่นบ้านส่วนใหญ่เกิดจากการอพยพย้ายถิ่นฐานในระยะทางไกล และการเผชิญกับสภาพอากาศที่ไม่เหมาะสมในบริเวณที่พักอาศัยในช่วงฤดูอพยพ อีกทั้งมีการแย่งแก่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหารและแหล่งที่อยู่อาศัย ตามรายงานของตวงรัตน์ และสุมาลี (2541) อ้างถึง Turner and Rose (1989) พบว่า นกนางแอ่นบ้านในช่วงฤดูอพยพจะมีอัตราการตายถึง 70 เปอร์เซ็นต์

ส่วนการติดตั้งตาข่ายดักนกนางแอ่นบ้าน ทำโดยขึงตาข่ายติดกับแท่งสแตนเลส แล้วใช้เชือกไนลอนผูกแท่งสแตนเลสกับเสาหรือต้นไม้ ดังรูปที่ 2.3ก เพื่อขวางบริเวณที่นกบินผ่านเป็นประจำ ดังรูปที่ 2.3ข เมื่อนกติดตาข่ายต้องรีบนำนกออกจากตาข่าย ดังรูปที่ 2.3ค โดยมีการใช้วิธี Body pluck คือ วิธีนำนกออกจากตาข่ายจากการจับลำตัวนกออก และ Feet first คือ วิธีนำนกออกจากตาข่ายโดยนำเท้านกออกก่อนอันดับแรก และจึงนำส่วนอื่นๆออก (Ralph *et al.*, 1993) ซึ่งต้องอาศัยความชำนาญ และคำนึงถึงความปลอดภัยของนกมากที่สุด โดยทั่วไปมักใช้วิธี Body pluck แต่หากลำตัวของนกติดตาข่ายแน่นและหลายส่วนจนเกินไป ให้เลือกใช้วิธี Feet first (Smith *et al.*, 1997) หลังจากนั้นนำนกพักในถุงผ้า ดังรูปที่ 2.3ง ทั้งนี้ในงานวิจัยนี้จะเก็บตัวอย่างเลือด และขนของนกนางแอ่นบ้านที่ติดห่วงขา โดยการติดห่วงขาจะเป็นประโยชน์ในการศึกษาข้อมูลด้านประชากร และนิเวศวิทยาต่อไป

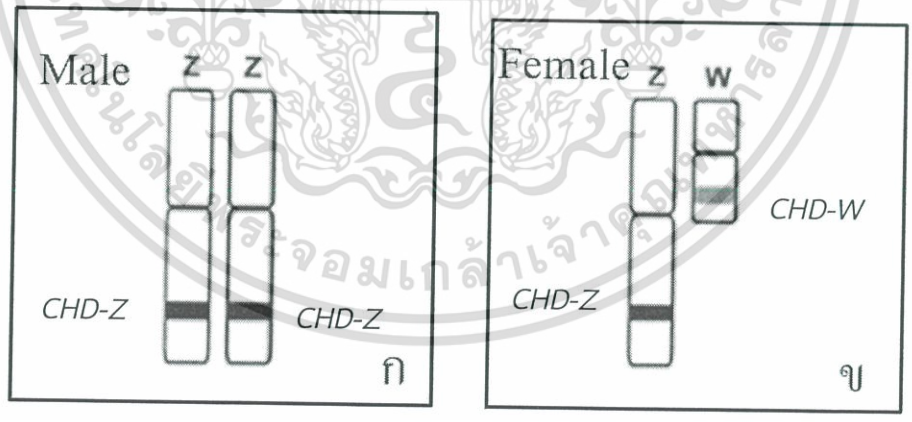
รูปที่ 2.3 อุปกรณ์ วิธี Mist net ที่ใช้ในการดักจับนกนางแอ่นบ้าน: (ก) การขึงตาข่ายกับแท่งสแตนเลส (ข) การตั้งตาข่าย (ค) การนำนกออกจากตาข่าย (ง) ถุงพักนก
(ที่มา: รูปถ่ายโดย วรรณิภา วิศว์วิสุทธิ์, 2559)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 การระบุเพศนก

ปัจจุบันการระบุเพศนกอาศัยการสังเกตและความชำนาญในการระบุเพศ นกที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกันชัดเจนระหว่างเพศผู้และเพศเมีย (Sexually dimorphic) จะสามารถระบุเพศได้ถูกต้องและแม่นยำมากกว่านกที่ไม่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาไม่ชัดเจนระหว่างเพศผู้และเพศเมีย (Sexually monomorphic) (Ellegren, 1996; Griffiths *et al.*, 1996) ดังนั้นจึงมีวิธีที่ใช้ในการระบุเพศนกจำพวก Sexually monomorphic หลายวิธี เช่น การคลำอวัยวะ (Bone, 1988) ซึ่งโดยส่วนใหญ่นกเพศเมียมีอุ้งเชิงกรานที่ขยายมากกว่าเพศผู้ ที่เป็นเช่นนี้เพราะเพศเมียมีสรีระที่ใช้วางไข่ การสังเกตพฤติกรรม เช่น การฟังเสียงร้องและการเกี้ยวพาราสี เป็นต้น โดยวิธีดังกล่าวต้องอาศัยผู้ที่มีความชำนาญและประสบการณ์สูง นอกจากนี้อายุนกยังมีผลต่อการแยกเพศด้วย (ธนากร, 2546) จึงมีการพัฒนาวิธีการระบุเพศโดยการใช้กล้องส่องดูอวัยวะภายใน (Richner, 1989) หรือการตรวจสอบระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนหรือแอนโดรเจน แต่วิธีนี้มีความยุ่งยากในการแปลผลเพราะระดับฮอร์โมนมีการแปรผันได้ง่าย (Hirschenhauser *et al.*, 1999)

การจัดเรียงคาริโอไทด์ (Karyotype) (Hatzofe and Getreide, 1990) หรือวิเคราะห์โครโมโซม เนื่องจากลักษณะของโครโมโซมเพศในนกเพศเมียและเพศผู้มีโครโมโซมที่แตกต่างกัน (Heterogametic sex) คือ นกเพศเมียมีโครโมโซม W และโครโมโซม Z ส่วนนกเพศผู้มีโครโมโซมเพศที่เหมือนกัน (Homogametic sex) คือ โครโมโซม Z และการค้นพบยีน *Chromo-helicase-DNA-binding* (*CHD*) (Griffiths and Tiwari, 1995) ซึ่งเป็นยีนที่อยู่บนโครโมโซมของเพศนก ถ้ายีน *CHD* อยู่บนโครโมโซม Z เรียกว่าอัลลีล *CHD-Z* และบนโครโมโซม W เรียกว่าอัลลีล *CHD-W* (Griffiths, 2000) ดังนั้นนกเพศเมียจะมีอัลลีล *CHD-W* และอัลลีล *CHD-Z* อย่างละ 1 อัลลีล ส่วนนกเพศผู้จะมีอัลลีล *CHD-Z* จำนวน 2 อัลลีล ดังรูปที่ 2.4ก และ 2.4ข



รูปที่ 2.4 ลักษณะของยีน *CHD* บนโครโมโซมเพศของนก (ก) นกเพศผู้ (ข) นกเพศเมีย (ที่มา: Morinha *et al.*, 2012)

ปี 1995 มีรายงานการใช้ไพรเมอร์ P2/P3 (Griffiths and Tiwari, 1995) ในการระบุเพศนกครั้งแรก แต่เป็นการเพิ่มขนาดดีเอ็นเอบริเวณเอกซอน และพบความแตกต่างของขนาดดีเอ็นเอประมาณ 60-110 คู่เบส ต่อมามีการพัฒนา Universal primer ได้แก่ ไพรเมอร์ P2/P8 (Griffiths *et al.*, 1998) ไพรเมอร์ 1237L/1272H (Kahn *et al.*, 1998) และไพรเมอร์ 2550F/2718R (Fridolfsson and Ellegren, 1999) ที่สามารถใช้ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม

เอกสารนี้มีลิขสิทธิ์ ใช้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในตำแหน่งยีน *CHD* เพื่อระบุเพศนก เมื่อแปลผลด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสพบว่า หากปรากฏ 2 แถบ ของอัลลีล *CHD-Z* และอัลลีล *CHD-W* จะแปลผลว่าเป็นเพศเมีย แต่ถ้าปรากฏเพียง 1 แถบ ของอัลลีล *CHD-Z* แปลผลเป็นเพศผู้ ซึ่งอาศัยความแตกต่างบริเวณอินทรอนของอัลลีล *CHD-W* และอัลลีล *CHD-Z* ในการระบุเพศ

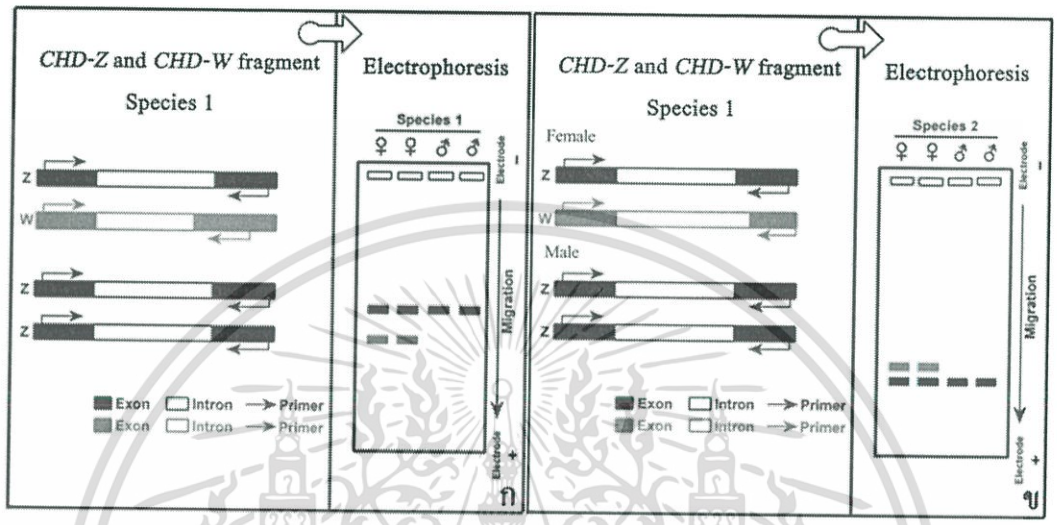
นกบางสปีชีส์จะพบขนาดอินทรอนของอัลลีล *CHD-Z* ใหญ่กว่าอัลลีล *CHD-W* (Griffiths *et al*., 1998) เมื่อแปลผลด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสจะพบอัลลีล *CHD-Z* ปรากฏอยู่ด้านบนอัลลีล *CHD-W* ดังรูปที่ 2.5ก ดังเช่นรายงานของณิชาภัทร และคณะ (2556) ได้ระบุเพศนกในสกุลหัวโตทรายเล็ก (*Charadrius* spp.) พบว่า เมื่อใช้ไพรเมอร์ 2550F/2718R เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม และวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส นกเพศผู้เกิดชิ้นดีเอ็นเอ 1 แถบ ที่มีขนาดประมาณ 650 คู่เบส ส่วนนกเพศเมียเกิดชิ้นดีเอ็นเอ 2 แถบ ที่มีขนาดประมาณ 650 และ 450 คู่เบส หรืองานวิจัยของ Cheng *et al*. (2006) ระบุเพศนกปากช้อนหน้าดำ (*Platalea minor*) โดยนำซากของนก 26 ตัว ที่ทราบเพศแล้วมายืนยันผลการระบุเพศด้วยเทคนิคทางโมเลกุล จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยไพรเมอร์ 2550F/2718R เมื่อแปลผลด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส และเทียบขนาดแถบดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน พบอัลลีล *CHD-W* ขนาด 450 คู่เบส และอัลลีล *CHD-Z* ขนาด 600 คู่เบส

สำหรับนกบางสปีชีส์จะพบขนาดของอินทรอนของอัลลีล *CHD-W* ขนาดใหญ่กว่าอัลลีล *CHD-Z* เมื่อแปลผลด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสจะพบอัลลีล *CHD-W* ปรากฏอยู่ด้านบนอัลลีล *CHD-Z* (Jensen *et al*., 2003) ดังรูปที่ 2.5ข เช่น การระบุเพศนกกินหอยปากแดง (*Eurasian oystercatcher*) ใช้คู่ไพรเมอร์ P2/P8 ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม โดยเมื่อแปลผลด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสพบว่า เพศผู้ปรากฏ 1 แถบ ของอัลลีล *CHD-Z* ที่มีขนาด 380 คู่เบส และเพศเมียปรากฏ 2 แถบ ของอัลลีล *CHD-W* และอัลลีล *CHD-Z* ที่มีขนาด 400 และ 380 คู่เบส ตามลำดับ (Watson *et al*., 2004) และการระบุเพศเหยี่ยวนิ้วสั้น (*Circaetus gallicus*) โดยใช้คู่ไพรเมอร์ P2/P8 เมื่อวิเคราะห์ผลด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส สามารถแยกความแตกต่างของอัลลีล *CHD-W* และอัลลีล *CHD-Z* ได้ 9 คู่เบส โดยอัลลีล *CHD-W* มีขนาด 387 คู่เบส และอัลลีล *CHD-Z* มีขนาด 378 คู่เบส ทำให้ทราบว่าวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสไม่สามารถระบุเพศนกที่พบความแตกต่างน้อยระหว่างอัลลีล *CHD-Z* และอัลลีล *CHD-W* เพราะปรากฏ 1 แถบทั้งเพศผู้และเพศเมีย จึงมีการใช้เทคนิค Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) ซึ่งต้องใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hae*II ที่มีความจำเพาะกับอัลลีล *CHD-Z* ทำให้เพศผู้เกิดชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 2 แถบ (303 และ 75 คู่เบส) และเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Asp*700I ที่มีความจำเพาะกับอัลลีล *CHD-W* ทำให้เพศเมียปรากฏชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 3 แถบ (303, 75 และ 387 คู่เบส) (Sacchi *et al*., 2004)

นอกจากนี้สามารถแก้ปัญหาขนาดใกล้เคียงกันของอัลลีล *CHD-W* และอัลลีล *CHD-Z* จากการใช้ไพรเมอร์ P2/P8 โดยการออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่ออัลลีล *CHD-W* (W-specific primer) ดังเช่นการระบุเพศแร้งเทาหลังขาว (*Gyp bengalensis*) จำนวน 46 ตัวอย่าง ด้วยไพรเมอร์ P2/P8 ที่พบอัลลีล *CHD-Z* ขนาด 383 คู่เบส และอัลลีล *CHD-W* ขนาด 389 คู่เบส ซึ่งแตกต่างกันเพียง 6 คู่เบส อาจทำให้แปลผลด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสผิดพลาดได้ ดังนั้นจึงใช้เทคนิค W-specific PCR ซึ่งใช้ P2 เป็น Forward primer และใช้ W-specific เป็น Reverse primer พบว่า เพศเมียเกิด 1 แถบ ของอัลลีล *CHD-W* ขนาด 263 คู่เบส แต่เพศผู้ไม่ปรากฏแถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (Ghorpade *et al*., 2012) แม้ว่าคู่ไพรเมอร์ P2/P8 จะให้ขนาดของอัลลีล *CHD-Z* และ *CHD-W* มีความแตกต่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กันน้อย แต่สามารถระบุเพศนกได้หลายสปีชีส์ (Cerit and Avanus, 2007) อีกทั้งพบการใช้ไพรเมอร์ P2/P8 ในการระบุเพศลูกนกนางแอ่นบ้าน ซึ่งใช้อุณหภูมิ Annealing อยู่ในช่วง 48-50 องศาเซลเซียส ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมและแปลผลด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้อะกาโรสเจล 3 เปอร์เซ็นต์ พบอัลลีล *CHD-Z* ขนาด 350 คู่เบส และอัลลีล *CHD-W* ขนาด 400 คู่เบส (Saino *et al.*, 2002; Malaitad *et al.*, 2015)



รูปที่ 2.5 ความแตกต่างบริเวณอินทรอนของอัลลีล *CHD-Z* และอัลลีล *CHD-W* และการแปลผลเพศด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส: (ก) บริเวณอินทรอนของอัลลีล *CHD-Z* มีขนาดใหญ่กว่าอัลลีล *CHD-W* (ข) บริเวณอินทรอนของอัลลีล *CHD-W* มีขนาดใหญ่กว่าอัลลีล *CHD-Z*
(ที่มา: Morinha *et al.*, 2012)

สำหรับไพรเมอร์ที่นิยมนำมาใช้ในการระบุเพศนก ดังเช่นงานวิจัยของ Wang *et al.* (2007) ศึกษาการระบุเพศนกจากตัวอย่าง 80 สายพันธุ์ ครอบคลุม 19 วงศ์ โดยใช้ไพรเมอร์ 2 คู่ คือ ไพรเมอร์ 2550F/2718R และไพรเมอร์ 1237L/1273H ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมตำแหน่งยีน *CHD* พบว่าไพรเมอร์ 2550F/2718R สามารถระบุเพศนกได้จำนวน 59 สายพันธุ์ คิดเป็น 73.75 เปอร์เซ็นต์ และไม่สามารถระบุเพศนกได้ 26.25 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่นกในวงศ์ Cracidae, Caprimulgidae, Musophagidae Pycnonotidae และ Accipitridae เป็นต้น สำหรับไพรเมอร์ 1237L/1273H สามารถระบุเพศนกได้ 63 สายพันธุ์ คิดเป็น 78.75 เปอร์เซ็นต์ และไม่สามารถระบุเพศนกได้ 21.25 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ นกในวงศ์ Ciconidae, Timaliiae และ Muscicapidae และยังมีรายงานการใช้ไพรเมอร์ 1237L/1273H ในวงศ์ Passeriformes โดยระบุเพศนกนางแอ่นบ้านจาก 6 พื้นที่ได้แก่ ประเทศสเปน เกาะไอร์แลนด์ ประเทศอิตาลี ประเทศเยอรมนี ประเทศไซปรัส และประเทศรัสเซีย โดยอัลลีล *CHD-Z* มีขนาด 200 คู่เบส และอัลลีล *CHD-W* มีขนาด 240 คู่เบส (Guerrini *et al.*, 2014) และใช้ไพรเมอร์ 2550F/2718R ในนกนางแอ่นแปซิฟิก โดยมีสภาวะในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่แตกต่างกัน (Hasegawa and Arai, 2017) จะเห็นได้ว่าไพรเมอร์ทั้ง 3 คู่ สามารถใช้ในการระบุเพศนกได้แตกต่างกัน แต่ไม่สามารถนำมาใช้ในการระบุเพศนกกระจอกเทศ (*Struthio camelus*) จึงมีการพัฒนาคู่ไพรเมอร์เพื่อใช้ในการระบุเพศนกกระจอกเทศ (Malago Jr

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

et al., 2002) ข้อดีของการระบุเพศนกด้วยเทคนิค PCR คือ ประหยัดค่าใช้จ่าย ให้ผลการระบุเพศแม่นยำและง่ายต่อการวิเคราะห์ผลและสามารถประยุกต์ใช้กับนกได้หลายสปีชีส์

นอกจากนี้มีการระบุเพศด้วยเทคนิคอื่นๆ โดย Weissmann *et al.* (2013) ได้ศึกษาการระบุเพศไข่ไก่ที่ได้รับการผสมพันธุ์แล้วด้วยการตรวจสอบระดับฮอร์โมน ได้แก่ Estradiol, Estrone sulfate และ Testosterone ใน Allantoic fluid เพื่อให้มีความเหมาะสมในการระบุเพศไข่ไก่ในระดับอุตสาหกรรมพบว่า ระดับ Estrone sulfate ในวันที่ 10 ของเอ็มบริโอไข่ไก่เพศเมียจะมีค่าสูงกว่าเพศผู้ โดยเพศเมียมีค่า 0.677 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และเพศผู้มีค่า 0.193 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

การระบุเพศด้วยเทคนิค Real time PCR ซึ่งเป็นการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม โดยจะแสดงผลออกมาเป็นลักษณะเส้นโค้ง (Curve) ตามค่าอุณหภูมิการคลายเกลียวดีเอ็นเอ (Melting temperature) ของยีนแต่ละชนิด โดยงานวิจัยของ Faux *et al.* (2014) ได้ศึกษาการระบุเพศนกทะเลทางมหาสมุทรตอนใต้จากตัวอย่างเนื้อเยื่อ 7 สกุล และจากอุจจาระ 6 สกุล เปรียบเทียบกับนกแพนกวินอเดลี (*Pygoscelis adeliae*) ที่ทราบเพศแล้วพบว่า นกเพศผู้จะปรากฏ 1 curve ของอัล-ลีล *CHD-Z* ส่วนเพศเมียปรากฏ 2 curve ของอัลลีล *CHD-Z* และอัลลีล *CHD-W*

การระบุเพศด้วยเทคนิค Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR spectroscopy) โดยใช้รังสีอินฟาเรด ดังงานวิจัยของ Steiner *et al.* (2016) ศึกษาการระบุเพศนกพิราบ (*Columba livia*) โดยใช้เนื้อเยื่อบริเวณปลอกขน ฉายด้วยแสงอินฟาเรดเพื่อให้ตัวอย่างดูดกลืนแสง แล้วสังเกตหมู่ฟังก์ชัน (Functional group) ที่เป็นองค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ amide I และ amide II จากค่าการดูดกลืนแสงพบว่า เพศผู้มีปริมาณ amide มากกว่าเพศเมีย โดยทดสอบกับนกพิราบที่ทราบเพศแล้วจำนวน 17 ตัว พบว่า สามารถระบุเพศได้อย่างถูกต้องจำนวน 16 ตัว และระบุเพศไม่ได้จำนวน 1 ตัว แม้ว่าเทคนิคการระบุเพศนกด้วยระดับฮอร์โมน เทคนิค Real time PCR และเทคนิค FT-IR spectroscopy จะสามารถตรวจสอบได้อย่างรวดเร็ว แต่อาจมีการผิดพลาดหากไม่มีตัวเปรียบเทียบที่ทราบเพศแล้วเป็นตัวอ้างอิง ซึ่งไม่สามารถแปลผลครอบคลุมในนกต่างสปีชีส์ย่อยได้ อีกทั้งยังมีค่าใช้จ่ายสูงอีกด้วย

2.4 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่สัมพันธ์กับเพศนก

นกที่มีลักษณะแบบ Sexually monomorphic การระบุเพศด้วยเทคนิคทางโมเลกุลหรือเทคนิคต่างๆ จะมีความแม่นยำ แต่เทคนิคเหล่านี้ไม่สามารถใช้ระบุเพศในภาคสนามได้ ดังนั้นจึงมีงานวิจัยที่ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางสัณฐานวิทยากับเพศในนกชนิดต่างๆ โดยการระบุเพศของนกในอันดับเดียวกับนกนางแอ่นบ้าน ได้แก่ *Acrocephalus schoenobaenus* ทางตอนเหนือของประเทศโปแลนด์ จำนวน 273 ตัว โดยใช้สมการ Discriminant function ซึ่งเป็นการวิเคราะห์จัดจำแนกกลุ่มตามวิธีการทางสถิติ ซึ่งพบว่า เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างความยาวปีกกับความยาวปากและความสัมพันธ์ระหว่างความยาวปีกกับความยาวหางจะให้ความถูกต้องในการระบุเพศเท่ากับ 82 และ 83 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับการระบุเพศด้วยเทคนิคทางโมเลกุล แต่สมการ Discriminant function ในการระบุเพศอาจให้ผลถูกต้องกับนกวัยเด็กที่พบบริเวณตอนเหนือหรือตอนกลางของทวีปยุโรปเท่านั้น (Wojczulanis-Jakubas and Jakubas, 2011) ต่อมามีการระบุเพศของนกตั๊กแตน (*Locustella naevia*) โดยเก็บตัวอย่างจากประเทศโปแลนด์จำนวน 224 ตัว ประกอบไปด้วยนกวัยเด็กจำนวน 161 ตัว และตัวเต็มวัยจำนวน 64 ตัว เมื่อวิเคราะห์การระบุเพศจากสมการ Discriminant function พบว่า ความยาวปีก ความยาวปาก ความยาวหัวถึงปาก และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความยาวของกรงเล็บ สามารถใช้ระบุเพศนกในภาคสนามได้จริงและให้ผลถูกต้อง 91 เปอร์เซ็นต์ แต่หากเลือกพิจารณาแค่ความยาวปีกหรือความยาวปากจะมีความถูกต้องถึง 94 เปอร์เซ็นต์ (Kulaszewicz *et al*., 2013) อย่างไรก็ตาม การระบุเพศด้วยสมการ Discriminant function ยังไม่เหมาะสมกับการประยุกต์ใช้ในภาคสนาม เนื่องจากต้องมีการคำนวณทำให้ล่าช้าในการระบุเพศ

ส่วนการระบุเพศของนกนางแอ่นบ้านจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา ดังงานวิจัยของ Hermosell *et al*. (2007) สังเกตลักษณะทางสัณฐานวิทยาหลายลักษณะที่สามารถระบุเพศนกชนิดนี้ ได้แก่ ความยาวของกระดูกอก ความยาวหน้าแข้ง ความยาวของขนหางคู่นอก ความยาวของขนหางคู่ใน และความยาวปีก โดยศึกษานกนางแอ่นบ้านจากประทศสเปนและประเทศเดนมาร์กพบว่าในแต่ละกลุ่มตัวอย่างที่ศึกษาในแต่ละพื้นที่มีจำนวนเพศผู้มากกว่าเพศเมียและเพศผู้มีความยาวกระดูกและขนหางมากกว่าเพศเมีย โดยเมื่อใช้ลักษณะความยาวกระดูกหน้าอก ความยาวขนหางคู่นอกและความยาวของขนหางคู่ในแทนค่าในสมการ Discriminant function พบว่าเมื่อ D > 0 ระบุเป็นเพศผู้ และ D < 0 ระบุเป็นเพศเมีย ซึ่งสามารถนำสมการ Discriminant function นี้ไปใช้ในการระบุเพศนกนางแอ่นบ้านทั้งสองประเทศได้ถูกต้องมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้ยังมีงานวิจัยของ Møller *et al*. (2011) ที่ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเพศกับความยาวปีกและหางของนกนางแอ่นบ้านจากทวีปแอฟริกาใต้ในช่วงฤดูอพยพพบว่า นกนางแอ่นบ้านเพศผู้จะมีความยาวปีกและหางมากกว่าเพศเมียเช่นกัน อีกทั้งงานวิจัยของ Dor *et al*. (2011) ศึกษาความยาวขนหางคู่นอกของนกนางแอ่นบ้านจำนวน 2 สปีชีส์ย่อย ได้แก่ *Hirundo rustica rustica* จากประเทศอิสราเอลและประเทศสหรัฐอเมริกา และ *H. r. transitiva* จากประเทศอิสราเอล พบค่าความยาวขนหางคู่นอกของ *H. r. rustica* มากกว่าความยาวขนหางคู่นอกของ *H. r. transitiva* เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างความยาวหางคู่นอกกับเพศพบว่า ทั้ง 2 สปีชีส์ย่อยมีความยาวหางคู่นอกของเพศผู้มากกว่าเพศเมีย อย่างไรก็ตามการระบุเพศด้วยความยาวปีกหรือความยาวหางอาจมีข้อผิดพลาดในการระบุเพศเกิดขึ้นได้หากนกมีการผลัดขนหรือขนไม่สมบูรณ์จากการได้รับบาดเจ็บโดยเฉพาะในช่วงฤดูอพยพ

จึงมีการสังเกตพื้นที่จุดแต้มขาวจากขนหางแต่ละเส้นโดยวัดความกว้างและความยาวของขนหางทั้งหมดเพื่อบอกข้อแตกต่างระหว่างเพศผู้และเพศเมีย และพบแตกต่างเพียงเล็กน้อยระหว่างนกตัวเต็มวัยกับนกวัยเด็ก (Kose and Møller, 1999) แต่วิธีนี้ค่อนข้างจะใช้เวลานานในการศึกษา และนกอาจเกิดความเครียดได้ ในงานวิจัยของ Duijns *et al*. (2011) ที่ศึกษาเพศของนกนางแอ่นบ้านสปีชีส์ย่อย *H. r. rustica* จากประเทศแซมเบีย ทวีปแอฟริกา โดยสังเกตเฉพาะความยาวของขนหางคู่นอก ความเว้าลึกของขนหาง และความยาวจุดแต้มขาวของขนหางคู่นอกสุดพบว่า เพศผู้จะมีความยาวของลักษณะต่างๆ มากกว่าเพศเมีย โดยกำหนดเป็นช่วงดังนี้ ความเว้าลึกของขนหาง หากน้อยกว่า 51 มิลลิเมตร ระบุเป็นเพศเมีย และมากกว่า 58 มิลลิเมตร ระบุเป็นเพศผู้ ความยาวของขนหางคู่นอก หากน้อยกว่า 93 มิลลิเมตร ระบุเป็นเพศเมียและมากกว่า 112 มิลลิเมตร ระบุเป็นเพศผู้ และความยาวจุดแต้มขาวบนขนหางคู่นอกสุด หากน้อยกว่า 17.50 มิลลิเมตร ระบุเป็นเพศเมีย และมากกว่า 29.50 มิลลิเมตร ระบุเป็นเพศผู้ ซึ่งงานวิจัยดังกล่าวทำให้สามารถระบุเพศนกได้ถูกต้องมากขึ้น แต่ยังไม่สามารถระบุเพศนกนางแอ่นบ้านที่มีค่าความยาวอยู่ในช่วงระหว่างข้อมูลข้างต้นได้ เช่น ความเว้าลึกของขนหางระหว่าง 51-58 มิลลิเมตร ความยาวของขนหางคู่นอกระหว่าง 93-112 มิลลิเมตร และความยาวจุดแต้มขาวบนขนหางคู่นอกสุดระหว่าง 17.50-29.50 มิลลิเมตร

นอกจากนี้ Dor *et al*. (2011) ยังศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสีขนบริเวณอกกับเพศในนกนางแอ่นบ้าน (*H. r. transitiva*) จากประเทศอิสราเอล โดยพบสีขนบริเวณอกของเพศผู้มีสีส้มเข้มกว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพศเมีย ส่วนงานวิจัยของ Hasegawa *et al.* (2010) สังเกตสีขนบริเวณคอและจุดแต้มขาวบนขนหางของนกนางแอ่นบ้าน (*H. r. gutturalis*) จากประเทศญี่ปุ่น โดยเพศผู้จะมีสีขนบริเวณคอที่เข้ม และมีขนาดของจุดแต้มขาวที่ใหญ่ และรายงาน Wilkins *et al.* (2016) พบนกนางแอ่นบ้าน (*H. r. rustica*) จากทวีปยุโรป และนกนางแอ่นบ้าน (*H. r. transitiva*) จากทวีปเอเชียตะวันออกกลาง เพศเมียจะเลือกคู่ผสมพันธุ์ โดยพิจารณาจากความยาวของขนหางคู่นอกกับสีขนบริเวณอกของเพศผู้ ดังนั้นสีขนอาจมีความสัมพันธ์ในการจำแนกเพศนกนางแอ่นบ้าน แต่อาจเกิดการผิดพลาดในการสังเกตได้เนื่องจากนกมีการผลัดขนในฤดูอพยพ (Sarah, 2007)

2.5 การศึกษาความหลากหลายของนกด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์

การศึกษาหาความสัมพันธ์ในระดับสปีชีส์หรือสปีชีส์ย่อยของสิ่งมีชีวิตสามารถศึกษาทั้งลำดับนิวคลีโอไทด์ในไมโทคอนเดรียและนิวเคลียส โดยจากรายงานของวรกมล (2535) ที่กล่าวถึงความสำคัญของตำแหน่งยีนในไมโทคอนเดรียว่าเป็น Control region ที่มีความหลากหลายสูงและมีการกลายพันธุ์มากกว่าดีเอ็นเอจากนิวเคลียส และสามารถตรวจสอบความสัมพันธ์ในสิ่งมีชีวิตรุ่นก่อนได้ เพราะดีเอ็นเอจากไมโทคอนเดรียสามารถถ่ายทอดจากแม่สู่ลูกได้ อีกทั้งยังเหมาะกับการวิเคราะห์ตัวอย่างของสิ่งมีชีวิตที่มีปริมาณน้อย ด้วยเหตุนี้จึงมีงานวิจัยต่างๆเลือกศึกษาความหลากหลายจากลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยยีนในตำแหน่งไมโทคอนเดรีย ดังงานวิจัยของ Hebert *et al.* (2004) ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของนกในทวีปอเมริกาเหนือ 260 สปีชีส์ และใช้ยีน *Cytochome C oxidase (COI)* ในไมโทคอนเดรียในการจำแนกพบว่า ตำแหน่งยีนดังกล่าวสามารถแยกความแตกต่างของนกทุกสปีชีส์ได้ และสามารถใช้เป็นรหัสประจำตัว (Barcode) ของแต่ละสปีชีส์ โดยนกนางแอ่น (Swallow) ก็เป็นหนึ่งในจำนวนนกที่นำมาศึกษา อีกทั้งยังมีงานวิจัยของ Malaitad *et al.* (2016) ที่ศึกษานกนางแอ่นบ้านในประเทศไทยจากจังหวัดน่าน และกรุงเทพมหานคร จำนวน 15 ตัว โดยใช้ตำแหน่ง *Nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase subnit (ND2)* ในการระบุสปีชีส์ย่อยของนกนางแอ่นบ้าน เปรียบเทียบกับตัวอย่างจากฐานข้อมูล GenBank ทั้งหมด 5 สปีชีส์ย่อย ได้แก่ *Hirundo rustica rustica, H. r. gutturalis, H. r. transitiva, H .r. savignii* และ *H. r. erythrogaster* โดยสปีชีส์ย่อย *H. r. tytleri* ไม่ได้นำมาวิเคราะห์พบว่า นกนางแอ่นบ้านจำนวน 14 ตัวอย่าง (NBS20, NBS07, NBS24, NBS51, NBS101, NBS110, NBS115, NBS119, BS66, BS81, BS82, BS85, BS86 และ BS90) ระบุเป็นสปีชีส์ย่อย *H. r. gutturalis* และพบ 1 ตัวอย่าง (BS76) ตัวอย่างระบุว่าเป็น *H. r. erythrogaster* ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่ามีนกนางแอ่นบ้านอย่างน้อย 2 สปีชีส์ย่อยที่อพยพมายังประเทศไทย แต่ทั้งนี้ควรศึกษาหลากหลายตำแหน่งเพื่อให้ผลชัดเจน เช่น ในงานวิจัยดังต่อไปนี้

Ericson *et al.* (2003) ศึกษาความสัมพันธ์ของนกในวงศ์ Passeriformes จำนวน 48 ชนิด ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งดีเอ็นเอในนิวเครียส คือ *c-myc* กับดีเอ็นเอในไมโทรคอนเดรีย คือ *Cyt-b* สามารถจัดกลุ่มนกวงศ์นี้ได้ 4 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ได้แก่ Sunbird, Flowerpecker olive warbler, Accentor, Weavers, Blackbirds, Finches, Wagtails และ Sparrows กลุ่มที่ 2 ได้แก่ Long-tailed tit, Babbler, Old world warbler, Parrotbill, White-eye, Bulbul, Swallow, Lasrk กลุ่มที่ 3 ได้แก่ Nuthatch, Gnatcatchher และ Wrens กลุ่มที่ 4 ได้แก่ Starlings, Mockingbird, Dipper, European robin และ Flycatcher โดยตัวอย่างของนกนางแอ่นบ้านจัดอยู่ในกลุ่มที่ 2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Sheldon *et al.* (2005) ศึกษาความสัมพันธ์ของนกวงศ์ Hirundininae ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งดีเอ็นเอในนิวเคลียส คือ *B-fibrinogen intron 7* (*Bfib7*) จำนวน 47 สปีชีส์ และลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรีย คือ *Cyt-b* จำนวน 74 สปีชีส์ และ *Nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase subnit (ND2)* จำนวน 61 สปีชีส์ โดยสามารถแบ่งในวงศ์ Hirundininae ของนกนางแอ่น ออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ทำรังจากโคลน ได้แก่ สกุล *Hirundo* มีลำตัวสีน้ำเงินเหลือบดำ หน้าผากและคอหอยส้มน้ำตาล และสกุล *Ptyonoprogne* มีลำตัวน้ำตาลแกมดำ คอและอกสีอ่อนกว่าเล็กน้อย กลุ่มที่ 2 Core Martins ได้แก่ สกุล *Riporia* เป็นชนิดที่จะอยู่รวมกลุ่มกับนกนางแอ่นบ้าน ซึ่งลักษณะที่แตกต่างคือ มีแถบคาดอกสีจาง และมีขีดตรงกลางแถบ และสกุล *Phedina* ลำตัวสีเทา อกเป็นลายดำขาวลักษณะคล้ายลายเสือ กลุ่มที่ 3 Basal Relicts ได้แก่ สกุล *Cheramoeca* ลำตัวสีขาวดำ มีกระหม่อมและแถบคาดตาสีเทา สกุล *Pseudhirundo* ลำตัวสีน้ำเงิน ท้องและคอหอยสีขาว และกระหม่อมสีน้ำตาล และสกุล *Psalldoprocne* ลำตัวหัวและท้องสีเทาถึงดำสนิททั้งตัว

Zink *et al.* (2006) ศึกษาความหลากหลายในตำแหน่งยีน *ND2* ของนกนางแอ่นกลุ่มที่ 1 ซึ่งเป็นนกนางแอ่นบ้าน (*Hirundo rustica*) พบการกระจายตัวของกลุ่มประชากรอย่างกว้างขวาง ได้แก่ ทวีปยุโรป ทวีปเอเชีย ทวีปอเมริกา และทะเลสาบไบคาล ประเทศรัสเซีย โดยมีพันธุกรรมที่คงที่ในแต่ละพื้นที่ แต่เมื่อสภาพแวดล้อมเปลี่ยนไปมีการตั้งถิ่นฐานของมนุษย์จึงเกิดการเปลี่ยนพฤติกรรมในการดำรงชีวิต ทำให้เกิดความแปรผันทางพันธุกรรมเพื่อการปรับตัวให้เหมาะสมกับสภาพแวดล้อม จึงมีการศึกษาความหลากหลายของนกนางแอ่นบ้านในแต่ละพื้นที่ ได้แก่ นกนางนางแอ่นบ้านจำนวน 74 ตัวอย่าง โดยศึกษาในฤดูผสมพันธ์ของทวีปยูเรเซีย 13 พื้นที่ และทวีปอเมริกาเหนือ 6 พื้นที่ และในฤดูอพยพของประเทศแอฟริกาใต้และประเทศสิงคโปร์พบว่า สามารถใช้ตำแหน่งยีน *ND2* แบ่งนกนางนางแอ่นบ้านในพื้นที่ต่างๆ ได้ 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ทวีปยุโรป กลุ่มที่ 2 ทวีปเอเชีย และกลุ่มที่ 3 ทวีปอเมริกาเหนือและทะเลสาบไบคาลของประเทศรัสเซีย

Dor *et al.* (2010) ได้รวบรวมตัวอย่างนกนางแอ่นบ้านจำนวน 29 ตัวอย่าง ประกอบด้วย 14 สปีชีส์ จากพื้นที่ต่างๆ ทั่วโลก โดยครอบคลุมทั้ง 6 สปีชีส์ย่อยที่แบ่งแยกตามทวีปที่พบ จากนั้นนำมาศึกษาความสัมพันธ์ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ใน 6 ตำแหน่งในไมโทคอนเดรีย และ 1 ตำแหน่งในนิวเคลียสพบว่า ตำแหน่งยีน *ND2* และ *Cyt-b* สามารถแบ่งนกนางแอ่นบ้านออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ Asia-American มีลักษณะแถบคาดอกไม่ชัดเจนและแคบ ได้แก่ *Hirundo rustica gutturalis* จากทวีปเอเชียตะวันออก และ *H. r. erythrogaster* จากทวีปอเมริกา ซึ่งมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้เคียงกันมากกับ *H. r. tytleri* จากทวีปเอเชียตะวันตกเฉียงเหนือ และ European-Middle Eastern มีลักษณะแถบคาดอกเข้ม โดยจะกว้างและชัดเจน ได้แก่ *H. r. rustica* จากทวีปยุโรปและทวีปเอเชียกลาง *H. r. savignii* และ *H. r. transitiva* จากทวีปเอเชียตะวันออกกลาง ต่อมามีงานวิจัยของ Dor *et al.* (2011) ได้ศึกษาความหลากหลายระหว่าง *H. r. rustica* เป็นกลุ่มประจำถิ่นในประเทศอิสราเอล กับ *H. r. transitiva* ที่เป็นกลุ่มอพยพมายังประเทศอิสราเอล เมื่อศึกษาด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งยีน *ND2* และ *Cyt-b* พบความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่าง *H. r. rustica* และ *H. r. transitiva*

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสีขนกับสปีชีส์ย่อย มีรายงานจากนิตยา (2539) อ้างถึง Dillon (1983) ศึกษาในนกติ๊ดใหญ่ (*Parus major*) มีแหล่งที่อยู่อาศัยกระจายทั่วเขตยูเรเซีย พบว่า จำนวน 29 สปีชีส์ย่อย สามารถแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ ได้แก่ เมเจอร์ (หลังเขียว หางและ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ท้องเหลือง) ไมเนอร์ (หลังและหางสีเขียวแต่มีท้องขาว) และซิเนอเรียส (หลังและหางสีเทา) โดยพบประชากรทั้ง 2 กลุ่ม ผสมพันธุ์กันในเขตที่มีพื้นที่ติดต่อกัน เช่น กลุ่มเมเจอร์ที่ครอบครองเขตในยุโรปจนถึงสภาพโซเวียตแถบทะเลโอคอตสก์ มีการผสมข้ามสปีชีส์ย่อยในกลุ่มซิเนอเรียส ครอบครองที่อยู่อาศัยในเอเชีย และเกาะซุนดา ทำให้ได้ลูกผสมที่มีลักษณะของสีขนบริเวณหลัง และอกที่เปลี่ยนแปลง คือ มีสีขนบนหลังผสมกันระหว่างสีเขียวและเทา ส่วนสีขนบริเวณอกมีสีขาวและเหลือง

สำหรับนกนางแอ่นบ้านพบการผสมข้ามสปีชีส์ย่อยจากรายงาน Scordato *et al*. (2017) กล่าวว่านกนางแอ่นบ้าน 3 สปีชีส์ย่อย ได้แก่ *H. r. rustica*, *H. r. tytleri* และ *H. r. gutturalis* ผสมพันธุ์ข้ามสปีส์ย่อยในเขตที่มีพื้นที่ติดต่อกัน ทำให้ลูกผสมมีลักษณะของสีขนบริเวณอกและความยาวปีกที่เปลี่ยนแปลง ทั้งนี้ยังมีการศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างเพศโดยใช้ตำแหน่งยีน *ND2* ดังงานวิจัยของ Guerrini *et al*. (2014) ศึกษาในนกนางแอ่นบ้าน (*H. r. rustica*) ทั้งหมด 186 ตัว ใน 6 ประเทศได้แก่ ประเทศสเปน ประเทศอิตาลี ประเทศเยอรมนี ประเทศไซปรัส ประเทศรัสเซีย และเกาะไอร์แลนด์พบว่า ตำแหน่งยีน *ND2* ไม่สามารถแยกความแตกต่างของเพศผู้และเพศเมีย เนื่องจากพบค่าความต่างทางพันธุกรรม (F_{st}) ในกลุ่มเพศเมียเท่ากับ -18.449 และในกลุ่มเพศผู้มีค่า F_{st} เท่ากับ -13.178 นอกจากนี้ยังมีการแสดงค่าความต่างทางพันธุกรรมในลักษณะอื่นๆ ซึ่งใกล้เคียงกันในระหว่างเพศผู้กับเพศเมีย แต่พบว่า สามารถใช้ตำแหน่งยีน *ND2* ในการแยกนกนางแอ่นบ้านจากประเทศรัสเซียออกจากนางแอ่นบ้านในประเทศอื่นๆ ได้ ทั้งนี้ยังสามารถใช้เทคนิค Microsatellites ในการวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างเพศผู้และเพศเมียได้ โดยพบว่า ค่าเฉลี่ยของกลุ่มเพศเมียจะมีค่า F_{st} เท่ากับ 0.022 ซึ่งมากกว่ากลุ่มเพศผู้ที่มีค่าเฉลี่ย F_{st} เท่ากับ 0.017 สำหรับความต่างทางพันธุกรรมระหว่างนกนางแอ่นบ้านเพศผู้และเพศเมียอธิบายได้จากพฤติกรรมของเพศเมียที่จะอาศัยในแหล่งที่อยู่เดิมที่เคยอยู่ ส่วนเพศผู้เมื่อเป็นนกตัวเต็มวัยจะมีการอพยพย้ายถิ่นฐาน ทำให้การดำรงชีวิตของเพศผู้และเพศเมียต่างกันเนื่องจากอาศัยอยู่ในแหล่งที่อยู่ที่มีสภาพแวดล้อมต่างกัน ดังนั้นจึงทำให้พันธุกรรมของเพศผู้และเพศเมียแตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์

3.1.1 Autoclave
3.1.2 Balance
3.1.3 Beaker 100 ml
3.1.4 Capillary tube
3.1.5 Centrifuge
3.1.6 Cooling box
3.1.7 Dot grid (mm^2)
3.1.8 Electrophoresis system
3.1.9 Fast Technology Analysis Card (FTA card)
3.1.10 Forceps
3.1.11 Gel documentation
3.1.12 Heat box
3.1.13 Micro centrifuge tube 0.2 and 1.5 ml
3.1.14 Micropipette
3.1.15 Micropipette tip
3.1.16 Microwave
3.1.17 Neddle size 26
3.1.18 PCR thermal cycler
3.1.19 Plate (90x15 mm)
3.1.20 Poucher (2mm)
3.1.21 Ruler (mm)
3.1.22 Scalpel
3.1.23 Spectrophotometer (Eppendorf bio photometer)
3.1.24 Spin down
3.1.25 Vortex
3.1.26 Water bath

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 สารเคมี

3.2.1 10X Standard *Taq* reaction buffer

3.2.2 2X *Taq* master mix

3.2.3 50 bp DNA ladder,100 bp DNA ladder and 1 bp DNA ladder

3.2.4 6X gel loading dye blue

3.2.5 Absolute ethanol และ ethanol 70%

3.2.6 Agarose

3.2.7 Boric acid

3.2.8 Deoxynucleotide Triphosphate (dNTPs)

3.2.9 Dionized water (DI water)

3.2.10 Ethidium bromide

3.2.11 Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)

3.2.12 FTA purification reagent

3.2.13 GF-1 Ambiclean kit (PCR&Gel)

3.2.14 GF-1 Blood kit

3.2.15 GF-1 Tissue kit

3.2.16 Magnesium Chloride ($MgCl_2$)

3.2.17 Nuclease free water

3.2.18 Primer ดังแสดงตารางที่ 3.1

3.2.19 Proteinase K

3.2.20 RNase A

3.2.21 *Taq* DNA polymerase

3.2.22 Tris-HCl

ตารางที่ 3.1 ชนิดและลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษา

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'->3')	ที่มา
P2	TCTGCATCGCTAAATCCTTT	Griffiths *et al.*, 1998
P8	CTCCCAAGGATGAGRAAYTG	
2550F	GTTACTGATTCGTCTACGAGA	Fridolfsson and Ellegren, 1999
2718R	ATTGAAATGATCCAGTGCTTG	
1272H	TCCAGAATATCTTCTGCTCC	Kahn *et al.*, 1998
1237L	GAGAAACTGTGCAAAACAG	
ProgND5F	CACTCTGGCCTAATCAAGTCCTAC	Dor *et al.*, 2010
ProgCBR	GGCAGTCTTCAATCTTTGGC	
METB	CGAAAATGATGGTTTAACCCCTTCC	Dor *et al.*, 2010
TRPC	CGGACTTTAGCAGAAACTAAGAG	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 วิธีการ

3.3.1 การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างนกนางแอ่นบ้านจากอำเภอปัว จังหวัดน่าน และถนนสีลม เขตบางรัก กรุงเทพมหานคร ภายใต้การดูแลของสถานีวิจัยสัตว์ป่าบึงบอระเพ็ด กลุ่มงานวิจัยสัตว์ป่า สำนักงานอนุรักษ์สัตว์ป่า กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพันธุ์พืช ด้วยวิธีการใช้ตาข่าย (Mist net) โดยในการดักจับนกจะขึงตาข่าย เมื่อนกบินติดตาข่ายจะแกะนกออกจากตาข่ายและวัดลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั้ง 11 ลักษณะ ได้แก่ น้ำหนัก ความยาวปาก ความยาวหัวถึงปาก ความยาวปีก ความยาวหน้าแข้ง ความยาวขนหางคู่นอก ความยาวขนหางคู่ใน ความเว้าลึกของขนหาง สีขนบริเวณอก ความยาวและพื้นที่ของจุดแต้มขาวบนขนหางคู่นอก โดยมีอุปกรณ์สำหรับศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (รูปที่ 3.1ก) นำนกที่จับได้มาติดห่วงขาเพื่อระบุตัวตน (รูปที่ 3.1ข) ชั่งน้ำหนัก มีหน่วยเป็นกรัม (รูปที่ 3.1ค) วัดความยาวขนหางคู่นอกและขนหางสั้น (รูปที่ 3.1ง) ความเว้าลึกของขนหาง ความยาวและพื้นที่ของจุดแต้มขาว (รูปที่ 3.1จ) สีขนบริเวณอก (รูปที่ 3.1ฉ) โดยการวัดความยาวมีหน่วยเป็นมิลลิเมตรและพื้นที่มีหน่วยเป็นตารางมิลลิเมตร หลังจากนั้นเก็บเนื้อเยื่อเพื่อนำไปสกัดดีเอ็นเอ โดยดึงเนื้อเยื่อขนผลัด (รูปที่ 3.2ก) บรรจุใส่หลอด Micro centrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องหรือด้วยวิธีการเจาะเส้นเลือดบริเวณขานกด้วยเข็มเบอร์ 26 (รูปที่ 3.2ข) แล้วใช้หลอด Capillary เก็บเลือดใส่ Micro centrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร (รูปที่ 3.2ค) แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ยังมีการใช้กระดาษ FTA card ซับหรือป้ายหยดเลือด (รูปที่ 3.2ง) นำใส่หลอด Micro centrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร (รูปที่ 3.2ง) เก็บไว้อุณหภูมิห้องและป้องกันความชื้นเพื่อนำไปใช้ในการสกัดดีเอ็นเอต่อไป

โดยการดักจับนกเพื่อใช้เป็นตัวอย่างในการศึกษาครั้งนี้แบ่งเป็น 3 ฤดูอพยพ ดังแสดงในตารางที่ 3.2 ได้แก่ ฤดูอพยพที่ 1 ดักจับในวันที่ 26 มกราคม 2558 บริเวณถนนสีลม เขตบางรัก กรุงเทพมหานคร จำนวนทั้งหมด 61 ตัวอย่าง ฤดูอพยพที่ 2 ดักจับในวันที่ 22-23 ธันวาคม 2558 ที่อำเภอปัว จังหวัดน่าน จำนวน 120 ตัวอย่าง และในวันที่ 11 มกราคม 2559 ดักจับที่ถนนสีลม เขตบางรัก กรุงเทพมหานคร จำนวน 30 ตัวอย่าง รวมจำนวน 150 ตัวอย่าง นอกจากนี้ยังสามารถเก็บข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยา ได้แก่ น้ำหนัก ความยาวปาก ความหัวถึงปาก ความยาวปีก ความยาวหน้าแข้ง ความยาวขนหางคู่นอก ความยาวขนหางคู่ใน ความเว้าลึกของขนหาง ความยาวและพื้นที่ของจุดแต้มขาวบนขนหางคู่นอก เก็บข้อมูลได้จำนวน 147 ตัวอย่าง สำหรับสีขนบริเวณอกเก็บข้อมูลได้จำนวน 146 ตัวอย่าง ฤดูอพยพที่ 3 ดักจับในวันที่ 20-21 ธันวาคม 2559 ที่อำเภอปัว จังหวัดน่าน จำนวน 72 ตัวอย่าง และดักจับในวันที่ 23 มกราคม 2560 ที่ถนนสีลม เขตบางรัก กรุงเทพมหานคร จำนวน 17 ตัวอย่าง รวมจำนวน 89 ตัวอย่าง และได้เก็บข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงบางลักษณะ ได้แก่ ความยาวของขนหางคู่นอก ความยาวของขนหางคู่ใน ความยาวของจุดแต้มขาวบนขนหางคู่นอก และความเว้าลึกของขนหาง ซึ่งได้จำนวน 87 ตัวอย่าง ส่วนสีขนบริเวณอกเก็บข้อมูลได้จำนวน 84 ตัวอย่าง ดังแสดงข้อมูลในตารางที่ ก-1, ก-2, ก-3, และ ก-4

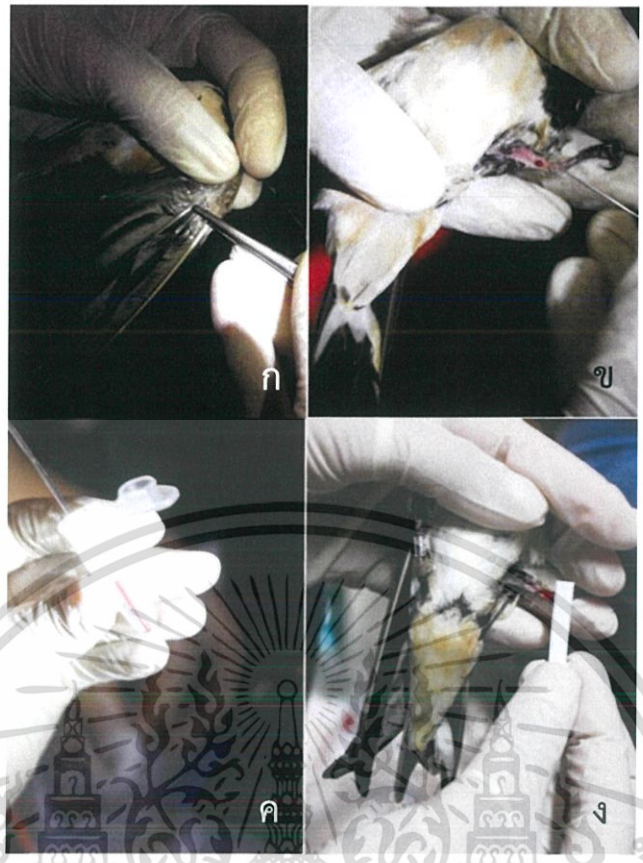
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.2 จำนวนตัวอย่างนกนางแอ่นบ้านที่ใช้ในการศึกษา

ฤดูอพยพ	สถานที่	วันที่เก็บตัวอย่าง	จำนวน (ตัว)		
			จำนวนตัวอย่างนกนางแอ่นบ้าน	ตัวอย่างที่มีการสังเกตลักษณะสัณฐานวิทยาอื่นๆ	ตัวอย่างที่มีกาสังเกตสีขนบริเวณอก
1	กรุงเทพมหานคร	26 ม.ค. 2558	61	-	-
2	จังหวัดน่าน	22-23 ธ.ค. 2558	120	117	117
	กรุงเทพมหานคร	11 ม.ค. 2559	30	30	29
3	จังหวัดน่าน	20-21 ธ.ค. 2559	72	70	67
	กรุงเทพมหานคร	23 ม.ค. 2560	17	17	17
รวม	-	-	300	234	230

รูปที่ 3.1 การเก็บข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยาของนกนางแอ่นบ้าน: (ก) อุปกรณ์ที่ใช้ในการวัด (ข) การใส่รหัสห่วงขา (ค) การชั่งน้ำหนัก (ง) การวัดความยาวหาง (จ) การสังเกตความยาวและพื้นที่จุดแต้มขาวของขนหางคู่นอก (ฉ) การสังเกตสีขนบริเวณอก
(ที่มา: รูปถ่ายโดย อรณิช ดีสิทธิเวช, 2558)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3.2 วิธีการเก็บตัวอย่างนกนางแอ่นบ้าน: (ก) การดึงขนผลัด (ข) การเจาะเลือดที่เส้นเลือดบริเวณขา (ค) การใช้หลอด Capillary เก็บเลือด (ง) การซับหรือป้ายเลือดด้วยกระดาษ FTA

(ที่มา: รูปถ่ายโดย อรณิช ดีสิทธิเวช, 2558)

3.3.2 การสกัดดีเอ็นเอ

เนื่องจากตัวอย่างที่เก็บได้มีทั้งเนื้อเยื่อและเลือด จึงแบ่งการสกัดดีเอ็นเอดังนี้

3.3.2.1 การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเนื้อเยื่อ

กรณีตัวอย่างเป็นขนผลัดจะสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเนื้อเยื่อที่ติดมากับปลอกขน โดยตัดบริเวณปลอกขนให้มีความยาวขนประมาณ 0.2-0.5 เซนติเมตร มาเพื่อสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ GF-1 tissue DNA extraction kit (Vivantis, Malaysia) นำขนมาสับให้ละเอียด โดยใช้ DI water ปริมาตร 100 ไมโครลิตร หยดก่อนสับเพื่อป้องกันการฟุ้งกระจายของตัวอย่าง หลังจากสับละเอียดแล้วนำใส่หลอด Micro centrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ตามด้วย TL buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตร Proteinase K ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และ Lysis enhancer ปริมาตร 20 ไมโครลิตร นำไปบ่มใน Water bath ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง โดยกลับหลอดทุก 30 นาที เมื่อครบเวลาเติม RNase A ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มใน Incubator ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 10 นาที หลังจากนั้นเติม Buffer TB ปริมาตรเป็น 2 เท่าของสารละลายก่อนหน้า กลับหลอดเพื่อผสมให้เข้ากันแล้วนำบ่มใน Water bath ที่อุณหภูมิ 65 องศา-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลเซียส อีกครั้ง เป็นระยะเวลา 10 นาที จากนั้นเติมเอทานอล 99.5 เปอร์เซ็นต์ ที่เย็นจัด ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันทันทีแล้วนำไป Spin down ดูดส่วนใสลง Column ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1 นาที แล้วเทส่วนใสทิ้ง ล้าง Column ด้วย Wash buffer ปริมาตร 650 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1 นาที แล้วเทส่วนใสทิ้ง ทำขั้นตอนล้าง Column ทั้งหมด 2 ครั้ง จากนั้นทำ Column ให้แห้งโดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1 นาที ย้าย Column ลงในหลอด Micro centrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตรใหม่ แล้วเติม Elution buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้เป็นระยะเวลา 2 นาที จึงปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 5,000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1 นาที เมื่อได้ดีเอ็นเอ ตรวจสอบคุณภาพและปริมาณ นำเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.3.2.2 การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือด

นำเลือดปริมาตร 10-20 ไมโครลิตร มาสกัดดีเอ็นเอด้วยชุด GF-1 Blood kit (Vivantis, Malaysia) โดยการเติม BB buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และ Proteinase K ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมกันโดยกลับหลอดเบาๆ แล้วนำไปบ่มที่ Water bath ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 5 ชั่วโมง โดยกลับหลอดทุก 30 นาที เมื่อครบเวลาเติม Rnase A ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มใน Incubator ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 นาที หลังจากนั้นเติมเอทานอล 99.5 เปอร์เซ็นต์ ที่เย็นจัด ปริมาตร 200 ไมโครลิตร กลับหลอดทันที จากนั้นย้ายสารลง Column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติม Wash buffer 1 เพื่อล้าง Column ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง ต่อจากนั้นล้าง Column ต่อด้วย Wash buffer 2 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบเช่นเดิม แล้วเทส่วนใสทิ้ง ทำให้แห้งโดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 นาที ย้าย Column ลงในหลอด Micro centrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตรใหม่ แล้วเติม Elution buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้เป็นระยะเวลา 2 นาที จึงปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 5,000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1 นาที เมื่อได้ดีเอ็นเอ ตรวจสอบคุณภาพและปริมาณ นำเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.3.3 การทำให้กระดาษ FTA card บริสุทธิ์

กรณีตัวอย่างเลือดอยู่ใน FTA card จะทำให้ดีเอ็นเอบนกระดาษบริสุทธิ์ก่อน ใช้ Poucher ขนาด 2 มิลลิเมตร เจาะบนกระดาษ FTA แล้วใส่ชิ้นส่วนกระดาษลงในหลอด Micro-centrifuge ขนาด 0.2 มิลลิลิตร จากนั้นทำให้บริสุทธิ์โดยดัดแปลงตามวิธีการของสุพัตรา และคณะ (2555) ทำการเติม FTA purification reagent ปริมาตร 125 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที ก่อนจะ Vortex หลังจากนั้นนำไปแช่ใน Heat box อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เวลา 10 นาที เมื่อครบเวลา Vortex อีกครั้งแล้วดูดส่วนใสออก (ทำซ้ำอีก 1 ครั้ง) แล้วจึงเติม TE buffer ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 125 ไมโครลิตร เพื่อหยุดการทำงานของ FTA purification reagent จากนั้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Vortex ก่อนนำไปแช่ใน Heat box ที่ อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลาให้นำออกจาก Heat box แล้ว Vortex อีกครั้งก่อนจะดูดส่วนใสออก (ทำซ้ำอีก 1 ครั้ง) แล้วนำกระดาษ FTA ที่ได้ทำให้แห้งด้วย Heat box อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที สามารถนำไปเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยไม่ต้องตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอ

3.3.4 การระบุเพศด้วยเทคนิคทางโมเลกุล

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

ตารางที่ 3.3 ขั้นตอน อุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตำแหน่งยีน *CHD*

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.5 การวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางสัณฐานวิทยากับเพศ

เมื่อได้ผลการระบุเพศทางโมเลกุลแล้วจึงนำข้อมูลในฤดูอพยพที่ 2 จำนวน 147 ตัวอย่าง มาหาความสัมพันธ์กับข้อมูลทางสัณฐานวิทยาของนกนางแอ่นบ้าน ได้แก่ ความยาวปาก ความยาวหัวถึงปาก ความยาวปีก ความยาวหน้าแข้ง ความเว้าลึกของขนหาง ความยาวของขนหางคู่ใน ความยาวของขนหางคู่นอก ความยาวจุดแต้มขาวบนขนหางคู่นอก น้ำหนัก และพื้นที่ของจุดแต้มขาวบนขนหางคู่นอก โดยความยาวมีหน่วยเป็นมิลลิเมตร น้ำหนักมีหน่วยเป็นกรัม และพื้นที่ของจุดแต้มขาวบนขนหางคู่นอก มีหน่วยเป็นตารางมิลลิเมตร แสดงข้อมูลดังตารางภาคผนวก ก-1 และ ก-2 นำมาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ด้วยโปรแกรม Rapid miner studio (Rai *et al*., 2014) เปรียบเทียบกับการระบุเพศด้วยเทคนิคทางโมเลกุล เมื่อได้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่สัมพันธ์กับเพศแล้ว นำมาทดสอบระบุเพศกับนกนางแอ่นบ้านในฤดูอพยพที่ 3 แสดงข้อมูลดังตารางภาคผนวก ก-3 และ ก-4 และตรวจสอบความถูกต้องของการระบุเพศด้วยเทคนิคทางโมเลกุล นอกจากนี้ยังสังเกตสีขนบริเวณอกของนกในฤดูอพยพที่ 2 และ 3 ดังตารางภาคผนวกที่ ก-1, ก-2, ก-3 และ ก-4 โดยมี 5 รูปแบบ ได้แก่ อกสีส้มเข้ม อกสีส้มปานกลาง อกสีส้มอ่อนปลายหางสีส้มเข้ม อกสีส้มอ่อน และอกสีขาว จากนั้นวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างสีขนบริเวณอกกับเพศที่ระบุด้วยเทคนิคทางโมเลกุล

3.3.6 การศึกษาความหลากหลายและระบุสปีชีส์ย่อยด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์

เบื้องต้นทำการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากดีเอ็นเอในอัลลีล *CHD-Z* โดยสุ่มตัวอย่างนกนางแอ่นบ้านเพศผู้จำนวน 5 ตัวอย่าง เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยไพรเมอร์ P2/P8 ตามตารางที่ 3.3 จากนั้นแปลผลโดยใช้อะกาโรสเจลความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ แล้วทำให้ผลิตภัณฑ์ PCR บริสุทธิ์ด้วย Kit GF-1 Ambiclean (PCR & Gel) (Vivantis, Malaysia) ก่อนส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยบริษัท Bioneer ประเทศเกาหลีใต้ นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบหาความสัมพันธ์ด้วยการ Blast และเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank ใน National Center for Biotechnology Information (NCBI) วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้โปรแกรม BioEdit เวอร์ชั่น 7.2.5 โดยจะวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในตำแหน่งยีน *CHD* ด้วยโปรแกรม Phylip เวอร์ชั่น 3.6 เนื่องจากรูปแบบ Dendrogram ที่ได้จากโปรแกรมนี้เป็นการวิเคราะห์แบบ Kimura 2-patameter ซึ่งเหมาะสำหรับการประเมินความหลากหลาย

จากนั้นทำการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในตำแหน่งยีน *ND2* และ *Cyt-b* โดยสุ่มตัวอย่าง 2 ตัวอย่าง มาทดสอบเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมจากไพรเมอร์ตามตารางที่ 3.1 ซึ่งแต่ละตัวอย่างจะมีส่วนประกอบของ Master mix ดังนี้ ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเลือด ความเข้มข้น 100 นาโนกรัม ปริมาตร 1 ไมโครลิตร 10X Standard *Taq* reaction buffer ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร 50 mM $MgCl_2$ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ไพรเมอร์แต่ละความเข้มข้น 20 พิโครโมล/ไมโครลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร 5000 ยูนิต/มิลลิลิตร *Taq* polymerase ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร 1.25 mM dNTPs ปริมาตร 4 ไมโครลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI water ให้มีปริมาตรสุดท้ายในแต่ละหลอดเป็น 25 ไมโครลิตร หลังจากนั้นนำเข้าเครื่อง Thermal cycler มีสภาวะดัดแปลงตามงานวิจัยของ Lovette and Rubenstein (2007) โดยมีการใช้ค่า Annealing temperature (T_a) อยู่ในอุณหภูมิ 54-62 องศาเซลเซียสในการทดสอบ เมื่อทราบสภาวะที่เหมาะสมแล้วจะทำการสุ่มตัวอย่างในฤดูอพยพที่ 2 จำนวน 10 ตัวอย่าง และฤดูอพยพที่ 3 จำนวน 10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตัวอย่าง จากการคัดเลือกลักษณะสีขนบริเวณอกที่แตกต่างกันแล้วนำมาเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมดังตารางที่ 3.4

ตารางที่ 3.4 ขั้นตอน อุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตำแหน่งยีน *ND2* และ *Cyt-b*

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

จากนั้นวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้อะกาโรสเจล ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยบริษัท Bioneer ประเทศเกาหลีใต้ เมื่อได้ลำดับนิวคลีไอไทด์ นำลำดับนิวคลีโอไทด์ไปเปรียบเทียบกับสิ่งมีชีวิตใกล้เคียงในตำแหน่งยีนเดียวกันจากฐานข้อมูล GenBank ของ National center for biotechnology information (NCBI) โดยเฉพาะนกนางแอ่นบ้าน 6 สปีชีส์ย่อย จาก Dor *et al.* (2010) จากพื้นที่ต่างๆ ทั่วโลก จากนั้นวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม Bio Edit เวอร์ชั่น 7.2.5 และแสดง Phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA 6 ซึ่งสามารถให้รูปแบบ Phylogenetic tree โดยวิเคราะห์แบบ Maximum-likelihood และ Bootstrap เท่ากับ 1,000 ซึ่งเหมาะสำหรับระบุสปีชีส์ย่อยของนกนางแอ่นบ้าน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 ผลการเก็บตัวอย่างนกนางแอ่นบ้าน

จากการลงพื้นที่เพื่อเก็บตัวอย่างของกลุ่มงานวิจัยสัตว์ป่า กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช และสถานีวิจัยสัตว์ป่าบึงบอระเพ็ด จาก 2 บริเวณ ได้แก่ อำเภอปัว จังหวัดน่าน (รหัสในการทดลอง: NBS) และถนนสีลม เขตบางรัก กรุงเทพมหานคร (รหัสในการทดลอง: BS) แบ่งเป็น 3 ช่วงเวลา หรือ 3 ฤดูอพยพ มีตัวอย่างทั้งหมด 4,522 ตัว สุ่มนกนางแอ่นบ้านมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้จำนวน 300 ตัว คิดเป็น 6.63 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในตารางที่ 4.1

จากตารางพบว่า สามารถดักจับนกที่มีห่วงขาที่เคยใส่หรือเรียกว่า Retraping โดยนกนางแอ่นบ้านที่สุ่มมาศึกษาทั้งหมด 4,522 ตัว พบจำนวน Retraping 123 ตัว โดยในตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาจำนวน 300 ตัว พบจำนวน Retraping 5 ตัว ได้แก่ ฤดูอพยพที่ 2 รหัส ทดลอง NBS19 ใส่ห่วงขาวันที่ 9 ธันวาคม 2557 ที่จังหวัดน่าน และจับซ้ำได้วันที่ 22 ธันวาคม 2558 ที่จังหวัดน่าน รหัส BS87 ใส่ห่วงขาวันที่ 10 มีนาคม 2557 ที่กรุงเทพมหานคร และจับได้ซ้ำวันที่ 11 มกราคม 2559 ที่กรุงเทพมหานคร ฤดูอพยพที่ 3 รหัส NBS125 ใส่ห่วงขาวันที่ 9 ธันวาคม 2557 ที่จังหวัดน่าน รหัส NBS189 และ NBS165 ใส่ห่วงขาวันที่ 23 ธันวาคม 2558 ที่จังหวัดน่าน ซึ่งทั้ง 3 ตัว จับได้ซ้ำวันที่ 20-21 ธันวาคม 2559 ที่จังหวัดน่าน จากข้อมูลการพบ Retraping สังเกตได้ว่ากลุ่มประชากรของนกนางแอ่นบ้านในแต่ละพื้นมีการอพยพกลับมาแหล่งที่อยู่อาศัยเดิม คือ นกนางแอ่นบ้านที่เคยดักจับได้จากจังหวัดน่านมีการอพยพกลับมาอีกครั้งที่จังหวัดน่าน และนกนางแอ่นบ้านที่เคยดักจับได้จากกรุงเทพมหานคร มีการอพยพกลับมาอีกครั้งที่กรุงเทพมหานคร โดยพบลักษณะเช่นนี้ในทุกฤดูอพยพ และไม่พบการปะปนกันระหว่างจังหวัดน่านและกรุงเทพมหานคร ซึ่งสันนิษฐานว่านกนางแอ่นบ้านทั้ง 2 จังหวัดอพยพมาจากต่างพื้นที่กันหรืออาจเป็นนกอพยพกลุ่มเดียวกัน แต่ในแต่ละจังหวัดมีองค์ประกอบของประชากรที่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงต้องพิสูจน์ด้วยการศึกษาความหลากหลายด้วยเทคนิคทางโมเลกุลต่อไป

ตารางที่ 4.1 จำนวนตัวอย่างนกนางแอ่นบ้านที่จับได้ในแต่ละฤดูอพยพ

ฤดูอพยพ	สถานที่	วันที่เก็บตัวอย่าง	จำนวน (ตัว)	จำนวนที่จับได้ซ้ำ (Retraping)	จำนวนนกที่ใช้ศึกษา (ตัว)
1	กรุงเทพมหานคร	26 ม.ค. 2558	485	27	61
2	จังหวัดน่าน	22-23 ธ.ค. 2558	1,881	19	120
	กรุงเทพมหานคร	11 ม.ค. 2559	402	21	30
3	จังหวัดน่าน	20-21 ธ.ค. 2559	1,548	47	72
	กรุงเทพมหานคร	23 ม.ค. 2560	206	9	17
รวม	-	-	4,522	123	300

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในงานวิจัยนี้ทำการเก็บตัวอย่าง 3 รูปแบบ ได้แก่ เก็บเนื้อเยื่อบริเวณปลอกขน โดยดึงขนผลัดบริเวณปีกหรือเก็บเลือดด้วย Capillary tube และเก็บเลือดด้วย FTA card โดยเจาะเลือดจากเส้นเลือดบริเวณขานก ซึ่งเป็นบริเวณที่ปลอดภัยต่อนกขนาดเล็ก (Owen, 2011) โดยการเก็บตัวอย่างจำเป็นต้องคำนึงถึงความปลอดภัยของนกและวัตถุประสงค์ในการนำตัวอย่างไปศึกษา โดยแบ่งการเก็บตัวอย่างออกเป็น 3 กรณี ได้แก่ กรณีที่ 1 หากพบขนผลัดบริเวณปีกของนกจะเก็บเฉพาะขนผลัดของนกเพื่อให้นกไม่เกิดบาดแผล โดยในกรณีนี้จะใช้เนื้อเยื่อปลอกขนขนาดปริมาณ 0.2-0.3 เซนติเมตร ซึ่งจะได้รับปริมาณดีเอ็นเอเพียงพอและสามารถใช้ในการระบุเพศนกด้วยเทคนิคทางโมเลกุลได้ แต่ไม่เหมาะกับการศึกษาความหลากหลายและระบุสปีชีส์ย่อยด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ เนื่องจากการศึกษาด้วยวิธีนี้จำเป็นต้องใช้ตัวอย่างที่ปราศจากการปนเปื้อน ซึ่งการใช้ตัวอย่างจากขนอาจเกิดการปนเปื้อนจากเชื้อโรคต่างๆที่ติดมากับขนนกได้ กรณีที่ 2 หากไม่พบขนผลัดบริเวณปีก จึงจำเป็นต้องเก็บเลือด โดยการเก็บเลือดด้วย Capillary tube จะได้เลือดปริมาณ 20-30 ไมโครลิตร จึงทำให้มีปริมาณดีเอ็นเอเพียงพอในการศึกษาการระบุเพศนกด้วยเทคนิคทางโมเลกุล อีกทั้งไม่พบปัญหาการปนเปื้อนจากเชื้อต่างๆ จึงสามารถนำไปใช้ในการศึกษาความหลากหลาย รวมถึงการระบุสปีชีส์ย่อยของนกนางแอ่นบ้านด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ แต่ไม่สามารถเก็บตัวอย่างเลือดไว้ได้นาน ดังนั้นจึงต้องเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซียสเซล เพื่อยืดอายุการใช้งาน สำหรับกรณีที่ 3 หากเก็บตัวอย่างเลือดด้วย FTA card จะใช้กับนกตัวที่ไม่สามารถเจาะเลือดได้ปริมาณมาก (น้อยกว่า 20 ไมโครลิตร) เพื่อไม่ให้นกเกิดความบาดเจ็บมากเกินควร และตัวอย่างเลือดจาก FTA card จะใช้ศึกษาเพียงการระบุเพศด้วยเทคนิคทางโมเลกุลเท่านั้น เพราะการศึกษานี้ต้องการปริมาณดีเอ็นเอในการศึกษาเพียงเล็กน้อย อีกทั้งยังสามารถเก็บตัวอย่างเลือดไว้ใน FTA card ได้เป็นเวลานานในอุณหภูมิห้อง แต่ไม่สามารถใช้ในการศึกษาความหลากหลายและการระบุสปีชีส์ย่อยได้ เพราะมีปริมาณดีเอ็นเอไม่เพียงพอในการศึกษา

เบื้องต้นทำการศึกษาเพศของนกนางแอ่นบ้านในฤดูอพยพที่ 1 จำนวน 61 ตัวอย่าง โดยใช้เพียงการเก็บตัวอย่างแบบกรณีที่ 1 คือเก็บเนื้อเยื่อบริเวณปลอกขน เนื่องจากนกนางแอ่นบ้านที่พบในประเทศไทยอยู่ในช่วงนอกฤดูผสมพันธุ์จะมีการผลัดขน จากการเก็บตัวอย่างทำให้สังเกตเห็นว่านกนางแอ่นบ้านที่พบมีลักษณะของสีขนบริเวณอกที่หลากหลาย ซึ่งจากรายงานของ Tuner (2004) พบความแปรผันของสีขนบริเวณอกของนกนางแอ่นบ้านในฤดูผสมพันธุ์ โดยสามารถแบ่งเป็น 6 ลักษณะตามสปีชีส์ย่อย ได้แก่ *Hirundo rustica rustica* อกสีขาว *H. r. gutturalis* อกสีส้มปนขาว *H. r. tytleri* อกสีส้มเข้ม *H. r. transitiva* อกสีส้มปานกลาง *H. r. savignii* อกสีน้ำตาล และ *H. r. erythrogaster* อกสีส้มอ่อน ต่อมาในการเก็บนกนางแอ่นบ้านในฤดูอพยพที่ 2 จำนวน 150 ตัวอย่าง และฤดูอพยพที่ 3 จำนวน 89 ตัวอย่าง โดยส่วนใหญ่ได้เก็บตัวอย่างแบบกรณีที่ 2 คือ เก็บหยดเลือดด้วย Capillary tube เพื่อนำไปศึกษาความหลากหลายและระบุสปีชีส์ย่อยด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ แต่การเก็บตัวอย่างแบบกรณีที่ 1 และ 3 จะนำไปใช้ในการระบุเพศเพียงอย่างเดียว ทั้งนี้ยังมีการสังเกตลักษณะสีขนบริเวณอก โดยลักษณะที่พบในจังหวัดน่าน และกรุงเทพมหานคร ในช่วงฤดูอพยพ มี 5 ลักษณะ ได้แก่ อกสีส้มเข้ม (รูปที่ 4.1 ก) อกสีส้มปานกลาง (รูปที่ 4.1 ข) อกสีส้มอ่อนปลายส่วนล่างสีส้มเข้ม (รูปที่ 4.1 ค) อกสีส้มอ่อน (รูปที่ 4.1 ง) และอกสีขาว (รูปที่ 4.1 จ) จากการสังเกตสีขนของนกนางแอ่นบ้านไม่สามารถนำใช้ในการระบุสปีชีส์ย่อยได้ เนื่องจากนกในฤดูอพยพมีการผลัดขนเพื่อสร้างขนชุดใหม่ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงสีของขน (Sarah, 2007) ดังนั้นจึงต้องวิเคราะห์ความแตกต่างของสีบริเวณอกด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์และเพื่อการระบุสปีชีส์ย่อยได้อย่างถูกต้อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.1 ลักษณะสีขนบริเวณอกนกนางแอ่นบ้าน ซึ่งแบ่งออกเป็น 5 ลักษณะ คือ (ก) อกส้มเข้ม (ข) อกส้มปานกลาง (ค) อกสีส้มอ่อนปลายส่วนล่างสีส้มเข้ม (ง) อกส้มอ่อน (จ) อกขาว

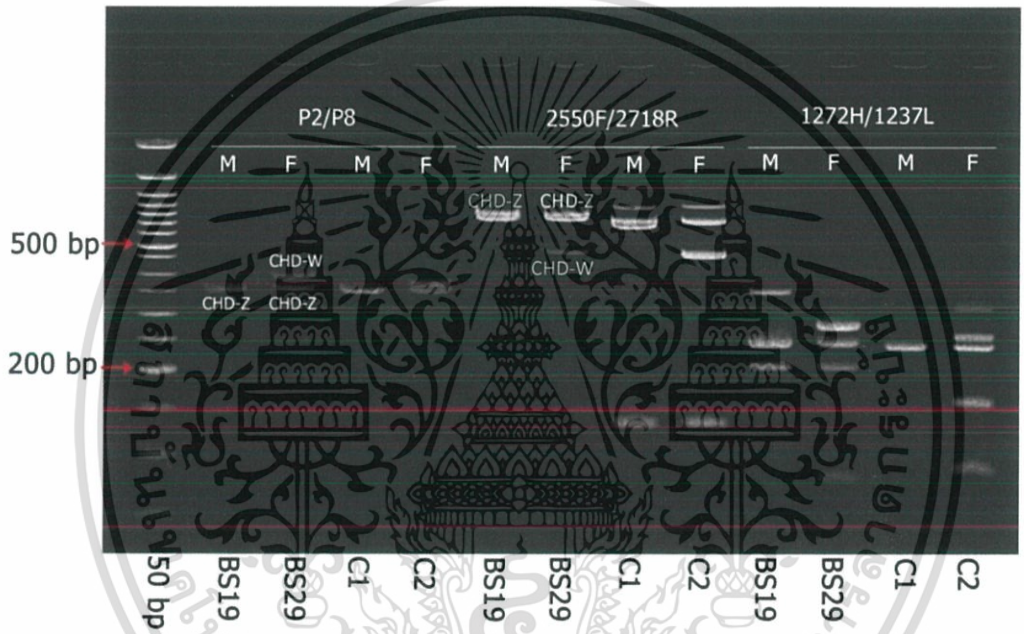
4.2 ผลการระบุเพศด้วยเทคนิคทางโมเลกุล

4.2.1 สภาวะและไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการระบุเพศนกนางแอ่นบ้าน

จากการสุ่มเลือกนกนางแอ่นบ้านจำนวน 2 ตัวอย่าง คือ รหัส BS19 และ BS29 มาเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในตำแหน่งยีน *CHD* ด้วยไพรเมอร์จำนวน 3 คู่ คือ P2/P8, 2550F/2718R และ 1237L/1272H เปรียบเทียบกับตัวอย่างไก่ (*Gallus gallus*) ที่ทราบเพศแล้ว โดยรหัส C1 คือ เพศผู้ และรหัส C2 คือ เพศเมีย ซึ่งใช้อุณหภูมิ Annealing 50 องศาเซลเซียส เมื่อตรวจผลด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสโดยใช้อะกาโรสเจล 3 เปอร์เซ็นต์พบว่า ไพรเมอร์ P2/P8 สามารถระบุเพศนกนางแอ่นบ้านและไก่ได้อย่างชัดเจน โดยสามารถแยกความแตกต่างระหว่างเพศผู้และเพศเมีย คือ เพศผู้ปรากฏ 1 แถบ ของอัลลีล *CHD-Z* และเพศเมีย ปรากฏ 2 แถบ ของอัลลีล *CHD-Z* และอัลลีล *CHD-W* ดังนั้น รหัส BS19 ระบุเป็นเพศผู้ ส่วนรหัส BS29 ระบุเป็นเพศเมีย ทั้งนี้ยังพบชิ้นดีเอ็นเอของอัลลีล *CHD-Z* ขนาด 350 คู่เบส ซึ่งมีขนาดเล็กกว่าชิ้นดีเอ็นเอของอัลลีล *CHD-W* ที่มีขนาด 400 คู่เบส โดยมีขนาดต่างกัน 50 คู่เบส และผลการตรวจสอบเพศไก่ (C1 และ C2) ที่เป็นตัวเปรียบเทียบพบชิ้นดีเอ็นเอของ *CHD-Z* มีขนาด 350 คู่เบส และชิ้นดีเอ็นเอของ *CHD-W* มีขนาด 360 คู่เบส มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอต่างกัน 10 คู่เบส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำหรับไพรเมอร์ 2550F/2718R เมื่อนำมาใช้ในการตรวจสอบเพศในไก่เพศผู้ พบชิ้นดีเอ็นเอ 3 แถบ ได้แก่ ขนาด 700, 600 และ 125 คู่เบส เพศเมียพบชิ้นดีเอ็นเอ 4 แถบ ได้แก่ ขนาด 700, 600, 475 และ 125 คู่เบส ส่วนนกนางแอ่นบ้านให้ชิ้นดีเอ็นเอของอัลลีล *CHD-Z* ขนาด 650 คู่เบส และอัลลีล *CHD-W* ขนาด 475 คู่เบส ซึ่งมีขนาดชิ้นดีเอ็นเอต่างกัน 175 คู่เบส แม้ว่าการใช้ไพรเมอร์นี้จะพบความแตกต่างระหว่างเพศผู้และเพศเมีย แต่งานวิจัยนี้ไม่เลือกใช้ไพรเมอร์ 2550F/2718R ในระบุเพศนกนางแอ่นบ้านเพราะอัลลีล *CHD-W* ปรากฏแถบดีเอ็นเอจาง อาจทำให้เกิดการระบุเพศผิดพลาดได้ ส่วนการระบุเพศนกนางแอ่นบ้านและไก่ด้วยไพรเมอร์ 1272H/1237L ปรากฏแถบดีเอ็นเอจำนวนมาก ทำให้ยุ่งยากในการวิเคราะห์ผลเพศ ดังนั้นจึงไม่สามารถใช้ไพรเมอร์นี้ในการระบุเพศนกนางแอ่นบ้านได้ ดังแสดงรูปที่ 4.2



รูปที่ 4.2 การเปรียบเทียบผลิตภัณฑ์ PCR ของนกนางแอ่นบ้าน (*Hirundo rustica*: BS19 และ BS29) และไก่ (*Gallus gallus*: C1 และ C2) ที่เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยไพรเมอร์ P2/P8, 1237L/1272H และ 2550F/2718R

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้ไพรเมอร์ P2/P8 ในการระบุเพศนกนางแอ่นบ้านซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Saino *et al*. (2002) และ Malaitad *et al*. (2015) ศึกษาเพศของนกนางแอ่นบ้านจากไพรเมอร์ P2/P8 เช่นกัน โดยพบขนาดชิ้นดีเอ็นเอของอัลลีล *CHD-Z* และอัลลีล *CHD-W* มีความแตกต่างกัน 50 คู่เบส มีงานวิจัยของ Jensen *et al*. (2003) ระบุเพศนกทั้งหมด 47 สปีชีส์ โดยใช้ไพรเมอร์ 2 คู่ คือ ไพรเมอร์ P2/P8 และไพรเมอร์ 1237L/1272H พบว่าจากการระบุเพศนกทั้งหมด ไพรเมอร์ P2/P8 สามารถระบุเพศได้ดีกว่า ไพรเมอร์ 1237L/1272H เนื่องจากมีความจำเพาะกับยีน *CHD* โดยมีขนาดชิ้นดีเอ็นเอแตกต่างกันระหว่างอัลลีล *CHD-Z* และอัลลีล *CHD-W* อยู่ในช่วง 15-50 คู่เบส รวมทั้งงานวิจัยของ De Marchi *et al*. (2012) ที่ศึกษาการระบุเพศนกหัวโตกินปู (*Dromas ardeola*) ใช้ไพรเมอร์ P2/P8 ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม และให้ชิ้นดีเอ็นเอของอัลลีล *CHD-Z* ขนาด 379 คู่เบส และชิ้นดีเอ็นเอของอัลลีล *CHD-W* ขนาด 396 คู่เบส โดยมีชิ้นดีเอ็นเอแตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ระหว่างอัลลีล *CHD-Z* และอัลลีล *CHD-W* 17 คู่เบส และนกกินหอยปากแดง (*Eurasian oystercatcher*) พบชิ้นดีเอ็นเอของอัลลีล *CHD-Z* ขนาด 380 คู่เบส และอัลลีล *CHD-W* ขนาด 400 คู่เบส มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอต่างกัน 20 คู่เบส (Watson *et al.*, 2004) สำหรับการใช้ไพรเมอร์ 1272H/1237L ในการระบุเพศนกนางแอ่นบ้าน ดังงานวิจัยของ Guerrini *et. al.* (2014) ที่พบชิ้นดีเอ็นเอของอัลลีล *CHD-Z* ขนาด 200 คู่เบส และอัลลีล *CHD-W* ขนาด 240 คู่เบส มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอต่างกัน 40 คู่เบส อย่างไรก็ตามความแตกต่างในชิ้นดีเอ็นเอของอัลลีล *CHD-Z* และอัลลีล *CHD-W* พบน้อยกว่าการใช้ไพรเมอร์ P2/P8 ที่มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอต่างกันระหว่างอัลลีล *CHD-Z* และอัลลีล *CHD-W* จำนวน 50 คู่เบส

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

4.2.2 การระบุเพศนกนางแอ่นบ้าน

การระบุเพศนกนางแอ่นบ้านด้วยเทคนิคทางโมเลกุลกับไพรเมอร์ P2/P8 โดยใช้อุณหภูมิ Annealing 50 องศาเซลเซียส เพื่อเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในนกนางแอ่นบ้านจำนวน 300 ตัวอย่าง ที่สุ่มเก็บได้บริเวณอำเภอปัว จังหวัดน่าน และถนนสีลม เขตบางรัก กรุงเทพมหานคร ในฤดูอพยพที่ 1 จำนวน 61 ตัวอย่าง ระบุเพศได้ 58 ตัวอย่าง เป็นเพศผู้ 41 ตัว เพศเมีย 17 ตัว มีอัตราส่วนเพศผู้ต่อเพศเมียเป็น 2.41: 1 ในฤดูอพยพที่ 2 จำนวน 150 ตัวอย่าง ระบุเพศได้ 147 ตัวอย่าง เป็นเพศผู้ 73 ตัว เพศเมีย 74 ตัว มีอัตราส่วนเพศผู้ต่อเพศเมียเป็น 1: 1.01 และฤดูอพยพที่ 3 จำนวน 89 ตัวอย่าง ระบุเพศได้ 87 ตัวอย่าง เป็นเพศผู้ 51 ตัว เพศเมีย 36 ตัว มีอัตราส่วนเพศผู้ต่อเพศเมียเป็น 1.41: 1 โดยจากทั้ง 3 ฤดูอพยพสามารถระบุเพศได้ทั้งหมด 292 ตัวอย่าง คิดเป็น 97.33 เปอร์เซ็นต์ ระบุเป็นเพศเมีย 127 ตัวอย่าง เพศผู้ 165 ตัวอย่าง และระบุไม่ได้ 8 ตัวอย่าง เนื่องจากเป็นตัวอย่างที่เก็บด้วยกระดาษ FTA ซึ่งมีปริมาณเลือดน้อยจึงมีปริมาณดีเอ็นเอไม่เพียงพอในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ดังแสดงจำนวนตัวอย่างในตารางที่ 4.2

จากผลการระบุเพศของนกนางแอ่นบ้านใน 3 ฤดูอพยพพบว่า ในฤดูอพยพที่ 1 มีอัตราส่วนเพศผู้มากกว่าเพศเมีย ส่วนฤดูอพยพที่ 2 และ 3 มีอัตราส่วนเพศผู้ต่อเพศเมียเป็น 1: 1.01, 1.41: 1 ซึ่งใกล้เคียง 1: 1 และเมื่อพิจารณาอัตราส่วนเพศผู้ต่อเพศเมียในแต่ละจังหวัด เนื่องจากฤดูอพยพที่ 1 เก็บตัวอย่างนกนางแอ่นบ้านเฉพาะที่กรุงเทพมหานคร จึงมีอัตราส่วนเพศผู้ต่อเพศเมียคือ 2.41: 1 ฤดูอพยพที่ 2 พบอัตราส่วนเพศผู้ต่อเพศเมียในจังหวัดน่าน คือ 1: 1.30 และกรุงเทพมหานคร คือ 2.80:

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1 ส่วนฤดูอพยพที่ 3 พบอัตราส่วนเพศผู้ต่อเพศเมีย ในจังหวัดน่าน คือ 1: 1.06 และกรุงเทพมหานครพบเฉพาะเพศผู้ จึงไม่มีอัตราส่วนของเพศเมียเปรียบเทียบ

โดยเมื่อวิเคราะห์อัตราส่วนในแต่ละจังหวัดพบว่า จังหวัดน่านมีอัตราส่วนของนกนางแอ่นใกล้เคียง 1: 1 โดยจะพบจำนวนเพศเมียมากกว่าจำนวนเพศผู้เพียงเล็กน้อย และกรุงเทพมหานครมีอัตราส่วนของนกนางแอ่นบ้านเพศผู้มากกว่าเพศเมีย ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่านกนางแอ่นบ้านจากจังหวัดน่านและกรุงเทพมหานคร มีแนวโน้มองค์ประกอบของประชากรแตกต่างกัน เนื่องจากพบอัตราส่วนระหว่างเพศผู้และเพศเมียที่ต่างกัน โดยมีรายงานของตวงรัตน์และสุมาลี (2541) ที่พบการทำรังวางไข่ของนกนางแอ่นบ้านในจังหวัดน่าน และพบว่า อัตราส่วนเพศผู้ต่อเพศเมียใกล้เคียง 1: 1 จึงกล่าวได้ว่านกนางแอ่นบ้านจากจังหวัดน่านเป็นกลุ่มประชากรที่มีทั้งนกประจำถิ่นและนกอพยพ ทำให้อัตราส่วนเพศผู้ต่อเพศเมียใกล้เคียง 1: 1 ส่วนนกนางแอ่นบ้านจากกรุงเทพมหานครยังไม่พบรายงานการทำรังวางไข่ จึงกล่าวได้ว่านกนางแอ่นบ้านจากกรุงเทพมหานครเป็นกลุ่มประชากรอพยพเท่านั้น ซึ่งพบอัตราส่วนเพศผู้มากกว่าเพศเมีย

ตารางที่ 4.2 ผลการระบุเพศนกนางแอ่นบ้านด้วยเทคนิคทางโมเลกุล

ฤดูอพยพ	จังหวัด	จำนวน (ตัว)			รวม	อัตราส่วน (เพศผู้:เพศเมีย)	
		เพศผู้	เพศเมีย	NA		จังหวัด	ฤดูอพยพ
1	กรุงเทพมหานคร	41	17	3	61	2.41: 1	2.41: 1
2	จังหวัดน่าน	51	66	3	120	1: 1.30	1: 1.01
	กรุงเทพมหานคร	22	8	-	30	2.80: 1	
3	จังหวัดน่าน	34	36	2	72	1: 1.06	1.41: 1
	กรุงเทพมหานคร	17	-	-	17	1	

หมายเหตุ: NA = ไม่สามารถระบุเพศได้เนื่องจากได้เลือดปริมาณน้อยทำให้ได้ปริมาณดีเอ็นเอไม่เพียงพอในการวิเคราะห์ผล

ดังนั้นอัตราส่วนเพศผู้ต่อเพศเมียของนกนางแอ่นบ้านที่อพยพมายังประเทศไทยนั้นพบได้ 2 ลักษณะ คือ อัตราส่วนเพศผู้ต่อเพศเมียใกล้เคียง 1: 1 และอัตราส่วนเพศผู้มากกว่าเพศเมีย โดยมีรายงานที่เกี่ยวข้องกับอัตราส่วนเพศในทั้ง 2 กรณี ดังเช่นงานวิจัยของ Kleven *et al.* (2006) ที่กล่าวว่านกนางแอ่นบ้านจะคู่ครองกันไปตลอดชีวิตทำให้อัตราส่วนคงที่ และงานวิจัยของ Saino *et al.* (2002) ที่พบว่า พ่อแม่นกนางแอ่นบ้านจะช่วยกันเลี้ยงดูลูกนกในสัดส่วนจำนวนตัวที่เท่ากัน โดยไม่เกี่ยวข้องกับอัตราส่วนเพศ และการที่พบอัตราส่วนเพศเมียใกล้เคียงกับเพศผู้ เนื่องจากลูกนกเพศเมียบางตัวมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่สมบูรณ์ทำให้พ่อแม่นกให้ความสนใจในการเลี้ยง จึงมีความแข็งแรงและมีอัตรารอดที่ใกล้เคียงกับเพศผู้นั่นเอง (Saino *et al.*, 1999) ดังนั้นจึงทำให้พบอัตราส่วนเพศผู้ต่อเพศเมียใกล้เคียง 1: 1 สำหรับการพบอัตราส่วนเพศผู้มากกว่าเพศเมีย ดังงานวิจัยของ Boncoraglio *et al.* (2008) ที่กล่าวว่าพ่อแม่นกนางแอ่นบ้านจะดูแลลูกนกเพศผู้มากกว่าเพศเมีย ทำให้มีความแข็งแรงและมีอัตรารอดมากกว่าเพศเมีย และรายงานของ Guerrini *et al.* (2014) พบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อัตราส่วนของเพศผู้ที่มากกว่าเพศเมียในนกนางแอ่นบ้านที่เป็นนกอพยพ เนื่องจากพฤติกรรมของนกเพศผู้มักมีการกระจายตัวไปถิ่นที่อยู่ใหม่เมื่อโตเต็มวัย ดังนั้นจึงพบเพศผู้มากกว่าเพศเมียในช่วงฤดูอพยพ

โดยประโยชน์ของการทราบอัตราส่วนเพศนกสามารถบ่งบอกถึงข้อมูลประชากรนกในแต่ละฤดูอพยพเพื่อเป็นข้อมูลทางด้านนิเวศวิทยาในพื้นที่ที่ทำการศึกษา และอัตราส่วนเพศผู้ต่อเพศเมียของนกนางแอ่นบ้านที่แตกต่างกันในแต่ละฤดูอพยพสามารถบ่งบอกถึงสภาพอากาศของโลกที่เปลี่ยนแปลงทำให้ประชากรนกมีการเปลี่ยนแปลงสัดส่วนของประชากร ดังเช่นรายงานของ ตวงรัตน์และสุมาลี (2541) อ้างถึง Turner and Rose (1989) ที่รายงานว่านกนางแอ่นบ้านมีอัตราการตายถึง 70 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากนกนางแอ่นบ้านที่อพยพย้ายถิ่นต้องประสบกับสภาพอากาศที่เปลี่ยนแปลงในระหว่างการอพยพ ประกอบกับเป็นนกที่มีจำนวนมากจึงมีการแย่งที่พักอาศัย และอาหาร ดังนั้นการที่สัดส่วนระหว่างเพศผู้และเพศเมียของนกนางแอ่นบ้านมีการเปลี่ยนแปลงจึงบ่งบอกถึงการเปลี่ยนแปลงของสภาพอากาศได้

นอกจากนี้ยังศึกษาสีขนบริเวณอกของตัวอย่างนกนางแอ่นบ้านในฤดูอพยพที่ 2 จำนวน 146 ตัว และฤดูอพยพที่ 3 จำนวน 84 ตัว รวมจำนวนทั้งหมด 230 ตัว พบว่า นกนางแอ่นบ้านที่มีขนบริเวณอกสีส้มเข้มมีอัตราส่วนเพศผู้ต่อเพศเมีย คือ 2.50: 1 อกสีส้มปานกลาง คือ 2.53: 1 อกสีส้มอ่อนปลายส่วนล่างสีส้มเข้ม คือ 1: 1.43 อกสีส้มอ่อน คือ 1: 1.30 และอกสีขาว คือ 1: 2.09 ซึ่งอัตราส่วนข้างต้นแสดงให้เห็นถึงสีขนบริเวณอกมีแนวโน้มสัมพันธ์กับเพศ โดยสีส้มเข้มและสีส้มปานกลางมีแนวโน้มเป็นเพศผู้ และอกสีส้มอ่อนปลายส่วนล่างสีส้มเข้ม สีส้มอ่อน และสีขาว มีแนวโน้มเป็นเพศเมีย โดยในงานวิจัยนี้ศึกษาสีขนบริเวณอกของนกนางแอ่นบ้านในช่วงฤดูอพยพ จึงพบความแตกต่างของสีขนไม่ชัดเจนเท่ากับนกนางแอ่นบ้านในฤดูผสมพันธุ์ ดังงานวิจัยของ Wilkins *et al.* (2016) ที่พบนกนางแอ่นบ้านในสปีชีส์ย่อยต่างๆ ได้แก่ *H. r. transitiva* และ *H. r. rustica* มีลักษณะสีขนบริเวณอกของเพศผู้มีสีเข้มกว่าเพศเมีย และรายงานของ Hasegawa *et al.* (2010) พบสปีชีส์ย่อย *H. r. gutturalis* มีลักษณะสีคอของเพศผู้ที่เข้มกว่าเพศเมีย โดยสีขนที่โดดเด่นและชัดเจนของเพศผู้เพื่อประโยชน์ในการคัดเลือกผสมพันธุ์

4.3 ผลการระบุเพศนกนางแอ่นบ้านด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

4.3.1 ผลการวิเคราะห์ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่สัมพันธ์กับเพศ

จากการเก็บข้อมูลลักษณะสัณฐานวิทยาของนก ได้แก่ ความยาวปาก ความยาวปีก ความยาวหัวถึงปาก ความยาวหน้าแข้ง ความเว้าลึกของขนหาง ความยาวของขนหางคู่ใน ความยาวขนหางคู่นอก ความยาวและพื้นที่ของจุดแต้มขาวบนขนหางคู่นอก และน้ำหนัก เมื่อนำมาหาความสัมพันธ์กับเพศที่ระบุเพศด้วยเทคนิคทางโมเลกุล โดยนำข้อมูลเข้าโปรแกรม Rapid miner studio ซึ่งเป็นโปรแกรมที่สามารถหาความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่มีข้อมูลในรูปแบบเชิงปริมาณกับเพศที่เป็นข้อมูลเชิงคุณภาพ โดยสร้างโมเดลแบบ Decision tree และโปรแกรม Rapid miner studio วิเคราะห์ตัวเลขด้วยวิธี Bootstrap regression tree ซึ่งให้ตัวเลขที่สามารถจำแนกแบ่งเป็นเพศผู้และเพศเมียได้ โดยวิเคราะห์กับตัวอย่างจากฤดูอพยพที่ 2 จำนวน 147 ตัวอย่าง ยกเว้นความยาวปีกใช้ตัวอย่างในฤดูอพยพที่ 2 เพียง 141 ตัวอย่าง เนื่องจากนกนางแอ่นบ้านจำนวน 6 ตัวอย่าง มีการผลัดขนบริเวณปีกจึงไม่สามารถเก็บข้อมูลได้ เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Rapid miner studio โดยวิเคราะห์ทีละลักษณะ สามารถแบ่งข้อมูลออกเป็น 3 รูปแบบ คือ รูปแบบที่ 1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่สามารถระบุเพศได้ถูกต้อง มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับการระบุเพศทางโมเลกุล ได้แก่ ความยาวจุดแต้มขาวของขนหางคู่นอก และความเว้าลึกของขนหางรูปแบบที่ 2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่สามารถระบุเพศได้ถูกต้องน้อยกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับการระบุเพศทางโมเลกุล ได้แก่ ความยาวขนหางคู่นอก พื้นที่จุดแต้มขาวบนขนหางคู่นอก ความยาวขนหางคู่ใน ความยาวปาก ความยาวหน้าแข้ง น้ำหนัก และความยาวหัวปาก และรูปแบบที่ 3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ไม่พบรูปแบบความสัมพันธ์กับเพศ คือ ความยาวปีก ดังแสดงตารางที่ 4.3

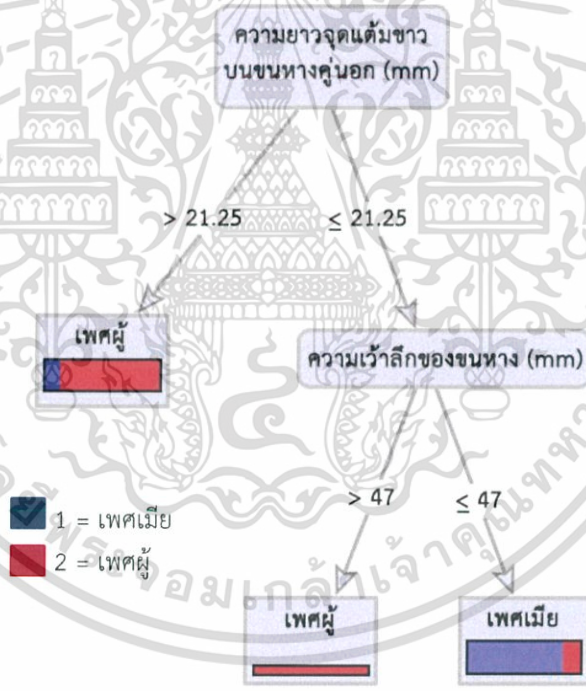
เมื่อพิจารณาข้อมูลของลักษณะทางสัณฐานวิทยาในรูปแบบที่ 1 ซึ่งทดสอบกับนกนางแอ่นบ้านจำนวน 147 ตัวอย่าง พบความยาวของจุดแต้มขาวมากกว่า 20.50 มิลลิเมตร ระบุเป็นเพศผู้ได้จำนวน 62 ตัว แต่หากความยาวจุดแต้มขาวน้อยกว่าหรือเท่ากับ 20.50 มิลลิเมตร ระบุเป็นเพศเมียได้จำนวน 61 ตัว โดยระบุเพศถูกต้องจำนวน 123 ตัว คิดเป็น 83.68 เปอร์เซ็นต์ และไม่สามารถระบุเพศจากลักษณะความยาวจุดแต้มขาวได้จำนวน 24 ตัว และพบความเว้าลึกของขนหางมากกว่า 38.50 มิลลิเมตร ระบุเป็นเพศผู้ได้จำนวน 59 ตัว หากความเว้าลึกของขนหางน้อยกว่าหรือเท่ากับ 38.50 มิลลิเมตร ระบุเป็นเพศเมียได้จำนวน 62 ตัว โดยระบุเพศถูกต้องจำนวน 121 ตัว คิดเป็น 82.32 เปอร์เซ็นต์ ไม่สามารถระบุเพศจากความเว้าลึกของขนหางได้ 26 ตัว ทั้งนี้ผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยของ Duijns *et al.* (2011) ใช้ลักษณะดังกล่าวในการระบุเพศเช่นกัน คือ ความยาวจุดแต้มขาวบนขนหางคู่นอกมากกว่า 29.50 มิลลิเมตร ระบุเป็นเพศผู้ และน้อยกว่า 17.50 มิลลิเมตร ระบุเป็นเพศเมีย ส่วนความเว้าลึกของขนหางที่มากกว่า 58 มิลลิเมตร ระบุเป็นเพศผู้ และน้อยกว่า 51 มิลลิเมตร ระบุเป็นเพศเมีย โดยให้ขนาดความยาวของข้อมูลการระบุเพศนกนางแอ่นบ้านแตกต่างกัน เนื่องจากศึกษานกนางแอ่นบ้านในฤดูอพยพจากประเทศแซมเบีย ทวีปแอฟริกา ซึ่งคาดว่าจะเป็นสปีชีส์ย่อย *H. r. rustica* ซึ่งต่างจากนกนางแอ่นบ้านในประเทศไทย และงานวิจัยของ Hermosell *et al.* (2007) ที่ได้ศึกษาเพศของนกนางแอ่นบ้านจากทวีปยุโรป โดยได้เก็บลักษณะความยาวของขนหางและความยาวของกระดูกจำนวน 7 ลักษณะ (ไม่มีการเก็บข้อมูลจุดแต้มขาวบนขนหางคู่นอก) และพบว่า ความยาวของขนหางคู่นอก ความยาวของขนหางคู่ใน และความยาวกระดูกหน้าอก สามารถนำมาสร้างสมการ Discriminant function และระบุเพศได้ถูกต้องมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ แม้ว่าการใช้สมการ Discriminant function ในการระบุเพศจะสามารถระบุเพศนกนางแอ่นบ้านได้ดี แต่อย่างไรก็ตามในภาคสนามจำเป็นต้องใช้ความรวดเร็วในการระบุเพศ ซึ่งการใช้สมการ Discriminant function ในการระบุเพศจำเป็นต้องมีการคำนวณ และต้องเก็บข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยา 2 ลักษณะขึ้นไป ทำให้เกิดความล่าช้าในการเก็บตัวอย่าง ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้การวิเคราะห์แบบ Bootstrap regression tree ในการวิเคราะห์ข้อมูลทางลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพื่อให้ได้ตัวเลขที่ใช้ในการจำแนกเพศได้ และพบว่า การใช้ความยาวจุดแต้มขาวบนขนหางคู่นอกหรือความเว้าลึกของขนหางสามารถระบุเพศได้มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้งานวิจัยของ Wojczulanis-Jakubas and Jakubas (2011) ที่ได้ระบุเพศนก *Acrocephalus schoenobaenus* ในภาคสนามจากลักษณะความยาวปีกกับปากของด้วยสมการ Discriminant function และให้ผลการระบุเพศที่ถูกต้อง 82 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจึงสามารถนำลักษณะความยาวจุดแต้มขาวบนขนหางคู่นอก และความเว้าลึกของขนหางไปใช้ในการระบุเพศในภาคสนามได้ เนื่องจากให้ผลการระบุเพศที่ถูกต้องใกล้เคียงกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 รูปแบบการระบุเพศนกจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาของนกนางแอ่นบ้านด้วยโปรแกรม Rapid miner studio

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	รูปแบบการระบุเพศ	การวิเคราะห์ผลจากโปรแกรม Rapid Miner		การระบุเพศจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ไม่สามารถแบ่งกลุ่มเพศได้ (ตัว)	เปอร์เซ็นต์ความถูกต้องการระบุเพศจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา (เปอร์เซ็นต์)
		เพศผู้ (ตัว)	เพศเมีย (ตัว)		
ความยาวจุดแต้มขาวบนขนหางคู่นอก (mm)	เพศผู้ > 20.50 ≥ เพศเมีย	62	61	24	83.68
ความเว้าลึกของขนหาง (mm)	เพศผู้ > 38.50 ≥ เพศเมีย	59	62	26	82.32
ความยาวของขนหางคู่นอก (mm)	เพศผู้ > 82.50 ≥ เพศเมีย	54	63	30	79.59
พื้นที่ของจุดแต้มขาวบนขนหางคู่นอก (mm^2)	เพศผู้ > 11.50 ≥ เพศเมีย	56	55	36	75.51
ความยาวของขนหางคู่ใน (mm)	เพศเมีย > 42.50 ≥ เพศผู้	50	54	43	70.75
ความยาวปาก (mm)	เพศผู้ > 13.15 ≥ เพศเมีย	3	74	70	52.38
ความยาวหน้าแข้ง (mm)	เพศเมีย > 9.75 ≥ เพศผู้	3	74	70	52.38
น้ำหนัก (g)	เพศเมีย > 12.55 ≥ เพศผู้	2	74	71	51.70
ความยาวหัวปาก (mm)	เพศผู้ > 27.5 ≥ เพศเมีย	73	2	72	51.02
ความยาวปีก (mm)	ไม่พบรูปแบบความสัมพันธ์	-	-	-	-

เมื่อนำลักษณะความยาวจุดแต้มขาวบนขนหางคู่นอกและความเว้าลึกของขนหางวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Rapid miner studio พร้อมกัน เพื่อการระบุเพศที่ถูกต้องมากยิ่งขึ้น ทำให้ได้ตัวเลขในการจำแนกเพศที่เปลี่ยนไป คือ ความยาวจุดแต้มขาวบนขนหางคู่นอกจาก 20.50 มิลลิเมตร เป็น 21.25 มิลลิเมตร และความเว้าลึกของขนหางจาก 38.50 มิลลิเมตร เป็น 47 มิลลิเมตร ดังแสดงในรูปที่ 4.3 ซึ่งการเปลี่ยนแปลงตัวเลขมาจากการตัดสินใจของโปรแกรมจากการวิเคราะห์ข้อมูลตัวเลขของลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั้ง 2 ลักษณะพร้อมกัน โดยในการระบุเพศจะพิจารณาลักษณะความยาวจุดแต้มขาวบนขนหางคู่นอกก่อน คือ หากมากกว่า 21.25 มิลลิเมตร ระบุแป็นเพศผู้ แต่หากน้อยกว่าหรือเท่ากับ 21.25 มิลลิเมตร ยังไม่สามารถระบุเพศได้ จึงต้องพิจารณาความเว้าลึกของขนหางต่อ โดยหากมากกว่า 47 มิลลิเมตร ระบุเป็นเพศผู้ และน้อยกว่าหรือเท่ากับ 47 มิลลิเมตร ระบุเป็นเพศเมีย ซึ่งการระบุเพศจาก 2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยานี้ สามารถระบุเป็นเพศผู้ 63 ตัว และเพศเมีย 64 ตัว โดยระบุได้ทั้งหมด 127 คิดเป็น 86.39 เปอร์เซ็นต์ ไม่สามารถระบุเพศจากการสังเกตลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั้ง 2 ลักษณะเมื่อเปรียบเทียบกับการระบุเพศทางโมเลกุลจำนวน 20 ตัว คิดเป็น 13.61 เปอร์เซ็นต์



รูปที่ 4.3 แผนภาพ Decision tree ที่ใช้ในการจำแนกเพศจากความยาวจุดแต้มขาวบนขนหางคู่นอกและความเว้าลึกของขนหาง (mm) เมื่อเทียบกับการระบุเพศทางโมเลกุล

จากตารางที่ 4.3 เมื่อพิจารณาข้อมูลของลักษณะทางสัณฐานวิทยาในรูปแบบที่ 2 จากค่าความผิดพลาดน้อยกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ ที่ทดสอบกับนกนางแอ่นบ้านจำนวน 147 ตัวอย่าง พบตัวเลขที่ใช้ในการจำแนกเพศของลักษณะความยาวของขนหางคู่นอกคือ 82.50 มิลลิเมตร พื้นที่จุดแต้มขาวบนขนหางคู่นอก คือ 11.50 ตารางมิลลิเมตร ความยาวปาก คือ 13.15 มิลลิเมตร และความยาวหัวปาก คือ 27.50 มิลลิเมตร โดยหากลักษณะดังกล่าวมีค่ามากกว่าตัวเลขจำแนกเพศจะระบุว่าเป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพศผู้ และน้อยกว่าหรือเท่ากับตัวเลขจำแนกเพศจะระบุเป็นเพศเมีย โดยพบว่า เพศผู้ส่วนมากจะมีความยาวของลักษณะทางสัณฐานวิทยาเหล่านี้ที่มากกว่าเพศเมีย โดยการที่เพศผู้ที่มีสัดส่วนขนาดใหญ่จะเป็นประโยชน์ในการคัดเลือกผสมพันธุ์ (Hasegawa *et al*., 2010) ส่วนตัวเลขจำแนกเพศของลักษณะความยาวของขนหางคู่ใน คือ 42.50 มิลลิเมตร ความยาวหน้าแข้ง คือ 9.75 มิลลิเมตร และน้ำหนัก คือ 12.55 กรัม โดยหากลักษณะดังกล่าวมีค่ามากกว่าตัวเลขจำแนกเพศจะระบุว่าเป็นเพศเมีย และน้อยกว่าหรือเท่ากับตัวเลขจำแนกเลขจะระบุเป็นเพศผู้ จะพบว่าเพศเมียจะมีความยาวและขนาดของลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่มากกว่าเพศผู้ เนื่องจากลักษณะดังกล่าวไม่สัมพันธ์กับเพศของนกนางแอ่นบ้าน (Hermosell *et al*., 2007) และอาจมีการเปลี่ยนแปลงขนาดหรือความยาวตามการดำรงชีวิตของนกนางแอ่นบ้าน

สำหรับตัวอย่างเพศผู้และเพศเมียที่ระบุเพศด้วยเทคนิคทางโมเลกุลแล้ว และระบุเพศด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาไม่ถูกต้อง อธิบายได้ว่านกเพศเมียอาจมีความสมบูรณ์มาก เนื่องจากได้รับอาหารและการดูแลจากพ่อแม่นกที่เท่าเทียมกับเพศผู้ทำให้มีสัดส่วนที่ใหญ่เท่ากับเพศผู้ ส่วนเพศผู้คาดว่าเป็นตัวที่ยังโตไม่เต็มวัยจึงทำให้มีสัดส่วนที่เล็กเท่าเพศเมีย (Saino *et al*., 1999)

ดังนั้นจากผลการทดลองพบว่า สามารถใช้ลักษณะความยาวจุดแต้มขาวบนขนหางคู่นอกหรือความเว้าลึกของขนหางในการระบุเพศนกนางแอ่นบ้านโดยจะมีตัวเลขในการจำแนกเพศเป็น 20.50 มิลลิเมตร และ 38.50 มิลลิเมตร ตามลำดับ อีกทั้งยังสามารถใช้ลักษณะทั้งสองพิจารณาร่วมกันในการการระบุเพศนกนางแอ่นบ้าน โดยต้องพิจาณาลักษณะความยาวจุดแต้มขาวบนขนหางคู่นอกก่อนซึ่งมีตัวเลขในการจำแนกเพศ คือ 21.25 มิลลิเมตร และจึงพิจารณาความเว้าลึกของขนหางซึ่งมีตัวเลขในการจำแนกเพศ คือ 47 มิลลิเมตร โดยลักษณะทางสัณฐานวิทยาดังกล่าวมีความเหมาะสมและมีสัมพันธ์กับเพศ สามารถระบุเพศนกนางแอ่นบ้านในประเทศไทยได้ถูกต้องมากที่สุดดังแสดงการระบุเพศนกนางแอ่นบ้านในภาคผนวก ข

4.3.2 ผลการระบุเพศนกนางแอ่นบ้านในภาคสนาม

จากที่กล่าวมาแล้วว่าลักษณะความยาวจุดแต้มขาวบนขนหางคู่นอกกับความเว้าลึกของขนหางมีความสัมพันธ์กับเพศ โดยให้ข้อผิดพลาดน้อยที่สุดเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับการระบุเพศทางโมเลกุล แต่อย่างไรการระบุเพศในภาคสนามจำเป็นต้องอาศัยความรวดเร็วในการสังเกต ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Kulaszewicz *et al*. (2013) พบว่า เมื่อใช้ลักษณะความยาวปีกหรือความยาวปากในการระบุเพศนกตั๊กแตนเพียงลักษณะเดียวสามารถให้ผลในการระบุเพศถูกต้องมากกว่าการพิจารณาหลายลักษณะ โดยพบว่าเมื่อนำรูปแบบการระบุเพศไปทดสอบกับนกนางแอ่นบ้านที่ดักจับได้ในฤดูอพยพที่ 3 จาก 2 จังหวัด จำนวน 89 ตัว โดยมี 2 ตัวอย่างไม่ได้นำมาทำนายเพศเนื่องจากไม่มีข้อมูลทางสัณฐานวิทยา ดังนั้นจึงมีตัวอย่างทั้งหมด 87 ตัวอย่างในการทดสอบ ดังตารางที่ 4.4 เมื่อทำนายเพศจากความยาวจุดแต้มขาวบนขนหางคู่นอกสามารถทำนายถูกต้องจำนวน 73 ตัว คิดเป็น 83.91 เปอร์เซ็นต์ ทำนายผิดเพียง 14 ตัว หากทำนายเพศด้วยความเว้าลึกของขนหางสามารถทำนายถูก 46 ตัว คิดเป็น 52.87 เปอร์เซ็นต์ ทำนายผิด 41 ตัว และเมื่อพิจารณาทั้ง 2 ลักษณะร่วมกันสามารถทำนายถูก 48 ตัว คิดเป็น 55.17 เปอร์เซ็นต์ ทำนายผิด 39 ตัว เมื่อนำเปอร์เซ็นต์การระบุเพศของนกนางแอ่นบ้านในฤดูอพยพที่ 3 เปรียบเทียบกับฤดูอพยพที่ 2 จะพบว่าค่าความยาวจุดแต้มขาวบนขนหางคู่นอกของทั้ง 2 ฤดูอพยพ มีความถูกต้องใกล้เคียงกัน โดยในฤดูอพยพที่ 2 จากจำนวนที่ใช้ทดสอบ 147 ตัว สามารถระบุเพศได้ถูกต้อง 123 ตัว คิดป็น 83.68 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อเปรียบเทียบค่าความเว้าลึกของขนหางใน 2 ฤดูอพยพ พบว่าฤดูอพยพที่ 2 สามารถระบุเพศได้ถูกต้อง 82.32 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมากกว่าการระบุเพศในฤดูอพยพที่ 3 ถึง 29.45 เปอร์เซ็นต์ และการระบุเพศจากความเว้าลึกของขนหางกับความยาวจุดแต้มขาวบนขนหางคู่นอกสามารถระบุเพศได้ถึง 86.36 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมากกว่าฤดูอพยพที่ 3 ถึง 31.19 เปอร์เซ็นต์ จากค่าความเว้าลึกของขนหางมีเปอร์เซ็นต์ลดลงในการระบุเพศนกนางแอ่นบ้านของฤดูอพยพที่ 3 เนื่องจากนกนางแอ่นบ้านในแต่ละฤดูอพยพอาจมีความแตกต่างตามถิ่นอยู่อาศัยหรือสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไป ทำให้สัดส่วนของแต่ละประชากรมีขนาดแตกต่างกันหรือนกอาจมีการผลัดขนยังไม่สมบูรณ์ ทำให้เกิดความผิดพลาดจากการระบุเพศจากลักษณะนี้ได้ อีกทั้งในการเก็บสุ่มเก็บตัวอย่างนกนางแอ่นบ้านนั้นยังไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างนกตัวไม่เต็มวัยกับนกตัวเต็มวัยได้อย่างชัดเจน ทำให้การวิเคราะห์บางลักษณะทางสัณฐานวิทยาเกิดความคาดเคลื่อน แต่คาดการณ์ได้ว่าเป็นกลุ่มของนกตัวเต็มวัยเนื่องจากนกนางแอ่นบ้านที่สามารถบินออกจากรังส่วนใหญ่เป็นตัวเต็มวัย โดยมีอายุเฉลี่ยประมาณ 2-3 ปี จึงจะบินอพยพ ดังนั้นจำเป็นต้องนำไปทดสอบในฤดูอพยพที่มากขึ้น ทั้งนี้ในการใช้ความยาวจุดแต้มยาวในการระบุเพศจะวัดเพียงลักษณะเดียว แต่ความเว้าลึกของขนหางต้องวัดถึง 2 ลักษณะได้แก่ ความยาวของขนหางคู่นอก และความยาวของขนหางคู่ใน เมื่อนำความยาวของขนหางคู่นอกมาลบด้วยความยาวของขนหางคู่ใน จึงจะสามารถทราบค่าความเว้าลึกของขนหาง ซึ่งในภาคสนามต้องการความรวดเร็วในการระบุเพศ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้เพียงความยาวจุดแต้มขาวบนขนหางคู่นอกในการระบุเพศในภาคสนาม เนื่องจากมีความถูกต้องในการระบุเพศมากที่สุด เพราะขนาดความยาวจุดแต้มขาวในนกตัวไม่เต็มวัยหรือนกตัวเต็มวัยมีขนาดใกล้เคียงกัน เมื่อใช้ลักษณะนี้พิจารณาเพศจึงพบค่าผิดพลาดเพียงเล็กน้อย และสามารถลดค่าความผิดพลาดที่จะเกิดขึ้นจากการเสียหายของขนหางหรือการผลัดขนไม่สมบูรณ์ในนกนางแอ่นบ้านได้

ตารางที่ 4.4 ผลการทำนายเพศในภาคสนามด้วยลักษณะความยาวจุดแต้มขาวบนขนหางคู่นอกและความเว้าลึกของขนหาง

รูปแบบการทำนายความยาวจุดแต้มขาวบนขนหางคู่นอก (mm)	การทำนายเพศนกนางแอ่นบ้านฤดูอพยพที่ 3 จำนวน 87 ตัว			
	จังหวัดน่าน		กรุงเทพมหานคร	
	ทำนายถูก (ตัว)	ทำนายผิด (ตัว)	ทำนายถูก (ตัว)	ทำนายผิด (ตัว)
ความยาวจุดแต้มขาว (>20.5=เพศผู้, ≤20.5=เพศเมีย)	60	10	13	4
ความเว้าลึกของขนหาง (>38.5=เพศผู้, ≤38.5=เพศเมีย)	34	36	12	5
ความยาวจุดแต้มขาว เพศผู้ > 21.25 ≥ นำไปวิเคราะห์ความเว้าลึกของขนหาง / ความเว้าลึกของขนหาง เพศผู้> 47 ≥ เพศเมีย	34	36	14	3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากข้อมูลของตารางที่ 4.4 เป็นข้อมูลของนกนางแอ่นบ้านในฤดูอพยพที่ 3 เมื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลการระบุเพศของนกนางแอ่นบ้านในฤดูอพยพที่ 2 ทำให้ทราบว่าการพิจารณาความยาวจุดแต้มขาวบนขนหางคู่นอกให้ข้อมูลที่ค่อนข้างคงที่ในการทำนายเพศทั้ง 2 ฤดูอพยพ คือ ฤดูอพยพที่ 2 ระบุถูกต้องคิดเป็น 83.68 เปอร์เซ็นต์ และฤดูอพยพที่ 3 ระบุถูกต้อง 83.91 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากมีรายงานของ Kose and Moller (1999) พบพื้นที่ของจุดแต้มขาวบนขนหางคู่นอกในนกนางแอ่นบ้านตัวไม่เต็มวัยและตัวเต็มวัยมีสัดส่วนของพื้นที่จุดแต้มขาวที่ใกล้เคียงกัน จึงสามารถใช้ลักษณะนี้ในการระบุเพศได้ถูกต้องมากที่สุด แต่เมื่อพิจารณาการระบุเพศจากลักษณะความยาวจุดแต้มบนขนหางคู่นอก โดยแยกจังหวัดพบว่าจังหวัดน่านทำนายเพศถูกต้องจำนวน 60 ตัว คิดเป็น 85.71 เปอร์เซ็นต์ ส่วนกรุงเทพมหานครทำนายเพศถูกต้องจำนวน 13 ตัว คิดเป็น 76.47 เปอร์เซ็นต์ จะเห็นได้ว่าการทำนายเพศนกนางแอ่นบ้านของกรุงเทพมหานครมีเปอร์เซ็นต์การทำนายถูกต่ำกว่าจังหวัดน่าน ทั้งนี้อาจเนื่องจากกรุงเทพมหานครมีนกนางแอ่นบ้านหลายสปีชีส์ย่อย ทำให้สัดส่วนลักษณะทางสัณฐานวิทยามีความแตกต่างกันตามสปีชีส์ย่อย ดังนั้นการพิจาณาความยาวจุดแต้มขาวบนขนหางคู่นอกของนกนางแอ่นบ้านจากกรุงเทพมหานคร จึงพบค่าผิดพลาดในการทำนายเพศมากกว่าจังหวัดน่าน ทั้งนี้ต้องมีการศึกษาความหลากหลายและระบุสปีชีส์ย่อยเพื่อยืนยันผลการทดลองนี้

4.4 ผลการศึกษาความหลากหลายและระบุสปีชีส์ย่อยด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์

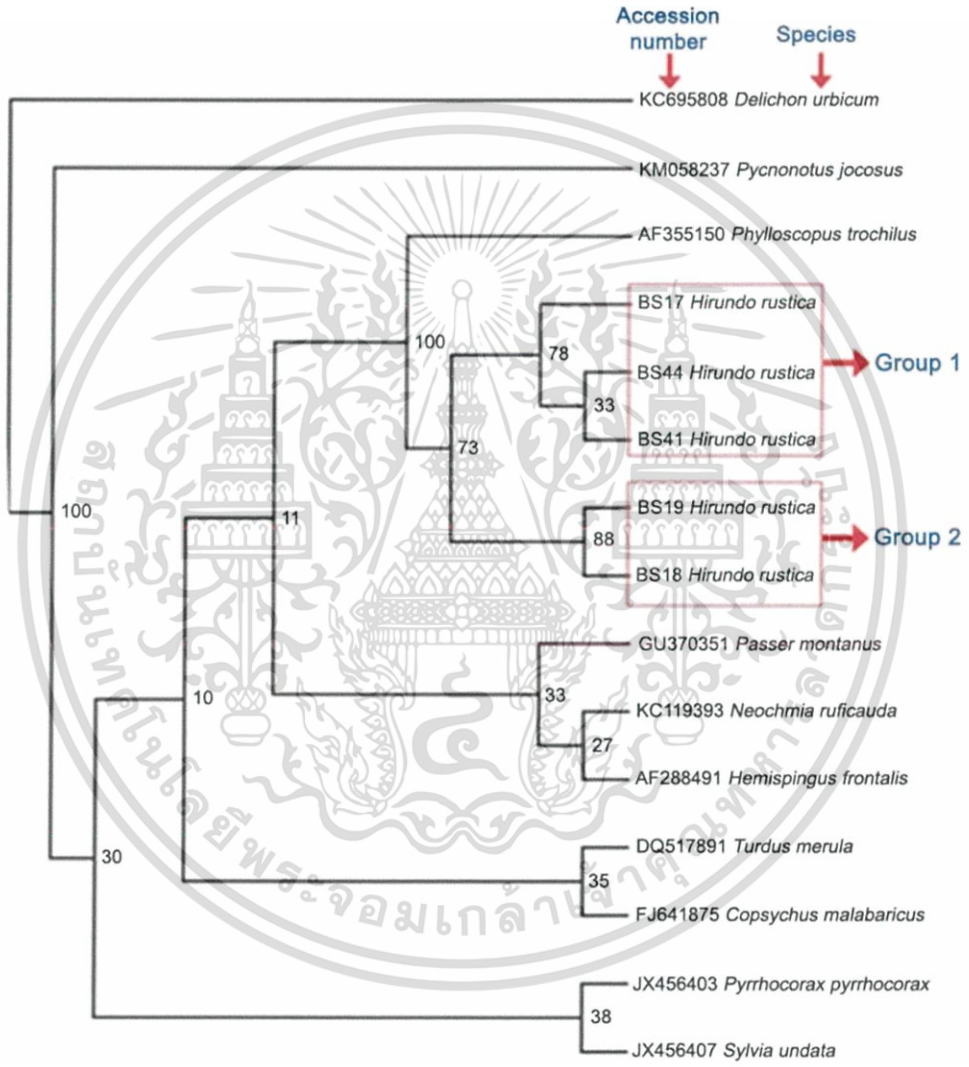
ในการศึกษาความหลากหลายแบ่งเป็น 2 ลักษณะ คือ การศึกษาความหลากหลายในตำแหน่งยีน *CHD* และการศึกษาความหลากหลายในตำแหน่ง *Cyt-b* กับ *ND2* ซึ่งจากการศึกษาความหลากหลายแล้ว ยังสามารถนำมาใช้ในการระบุสปีชีส์ย่อย รวมถึงการคาดคะเนเส้นทางอพยพของนกนางแอ่นบ้าน

4.4.1 การศึกษาความหลากหลายด้วยตำแหน่งยีน *CHD*

การประเมินความหลากหลายได้ทดลองสุ่มตัวอย่างจากนกนางแอ่นบ้านบริเวณ ถนนสีลม กรุงเทพมหานคร ในฤดูอพยพที่ 1 เพศผู้จำนวน 5 ตัวอย่าง (BS17, BS18, BS19, BS41 และ BS44) ซึ่งทราบเพศแล้วจากการระบุเพศด้วยเทคนิคทางโมเลกุล โดยวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งยีน *CHD* ด้วยไพรเมอร์ P2/P8 และแปลผลด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสโดยใช้อะกาโรสเจล 3 เปอร์เซ็นต์ พบชิ้นดีเอ็นเอของอัลลีล *CHD-Z* ขนาดประมาณ 350 คู่เบส ดังรูปที่ 4.2 แต่เมื่อวิเคราะห์การจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ในชิ้นดีเอ็นเอของอัลลีล *CHD-Z* ด้วยโปรแกรม BioEdit สามารถทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แน่นอน มีขนาด 354 คู่เบส ซึ่งมีการแปรผันของลำดับนิวคลีโอไทด์เพียงเล็กน้อย โดยมีการเปลี่ยนแปลงเบสเพียง 1 เบส (Single Nucleotide Polymorphisms: SNPs หรือสนิปส์) แบบ Transition ระหว่างเบส C และ T จำนวน 4 ตำแหน่ง ในตำแหน่งที่ 1, 2, 4 และ 304 คิดเป็น 1.10 เปอร์เซ็นต์ และพบการเปลี่ยนแปลงเบสแบบ Transversion ระหว่างเบส G และ T จำนวน 1 ตำแหน่ง ในตำแหน่งที่ 284 คิดเป็น 0.28 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของนกนางแอ่นบ้านมา Blast เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank ใน NCBI ไม่พบข้อมูลการศึกษาของนกนางแอ่นบ้านในตำแหน่งยีน *CHD-Z* แต่มีในนกในวงศ์ Passeriformes อย่างน้อย 10 ชนิด ได้แก่ KC695808 (*Delichon urbicum*), KM058237 (*Pycnonotus jocosus*), AF355150 (*Phylloscopus trochilus*), GU370351 (*Passer momtanus*), KC119393 (*Neochmia ruficauda*), AF288491 (*Hemispingus frontalis*), DQ517891 (*Turdus merula*) FJ641875 (*Copsychus malabaricus*), JX456403 (*Pyrrhocoraax pyrrhocorax*) และ JX456407 (*Sylvia undata*) จึง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นำมาศึกษาความสัมพันธ์กับนกนางแอ่นบ้าน เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ด้วยโปรแกรม Phylip พบว่า นกกระจิบ (*Phylloscopus trochilus*) มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับนกนางแอ่นบ้าน ดังแสดงในรูปที่ 4.4 โดยให้ผลสอดคล้องกับงานวิจัย Ericson *et al.* (2003) ศึกษาความสัมพันธ์ของนกในวงศ์ Passeriformes จำนวน 48 ชนิด โดยสามารถจัดกลุ่มเป็น 4 กลุ่ม โดยกลุ่มนกนางแอ่น (Swallow) จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับกลุ่มนกกระจิบ (Old world warbler) ทั้งนี้ยังสามารถแบ่งกลุ่มนกนางแอ่นบ้านออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ BS17, BS41 และ BS44 กับ BS18 และ BS19 ซึ่งมีแนวโน้มว่านกนางแอ่นบ้านที่พบในประเทศไทยมีอย่างน้อย 2 สปีชีส์ย่อย

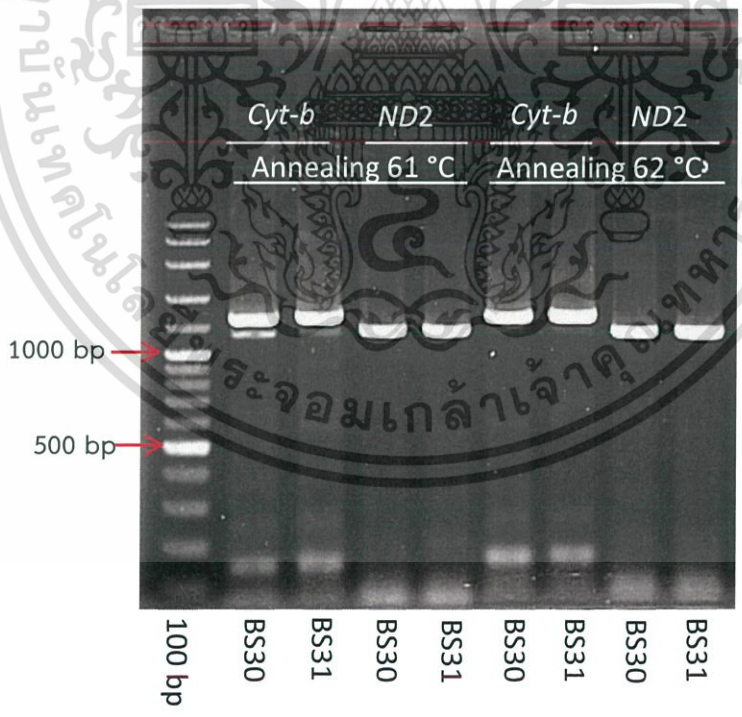


รูปที่ 4.4 แผนภูมิความสัมพันธ์ (Dendrogram) ของนกนางแอ่นบ้านจำนวน 5 ตัวอย่าง และนกในวงศ์ Passeriformes จำนวน 10 ตัวอย่างที่ศึกษาความสัมพันธ์ด้วยโปรแกรม Phylip เวอร์ชั่น 3.6 วิเคราะห์แบบ Kimura 2-parameter

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4.2 การศึกษาความหลากหลายและระบุสปีชีส์ย่อยด้วยตำแหน่งยีน *ND2* และ *Cyt-b*

เพื่อเป็นการยืนยันผลการแบ่งกลุ่มนกนางแอ่นบ้านของตำแหน่งยีน *CHD-Z* จึงทำการศึกษาความหลากหลายในตำแหน่ง *ND2* และ *Cyt-b* เพิ่มเติม เนื่องจากงานวิจัยของ Dor *et al.* (2010) พบว่าสามารถใช้ 2 ตำแหน่งนี้ในการแบ่งกลุ่มนกนางแอ่นบ้านทั้ง 6 สปีชีส์ย่อยเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่ม Asia-American ได้แก่ *H. r. gutturalis*, *H. r. erythrogaster* และ *H. r. tytleri* กลุ่ม European-Middle Eastern ได้แก่ *H. r. rustica*, *H. r. transitiva* และ *H. r. savignii* จากนั้นคัดเลือกตัวอย่างในแต่ละฤดูอพยพ ซึ่งคัดเลือกตามบริเวณที่ดักจับได้ และสีขนบริเวณอกที่แตกต่างกัน ในเบื้องต้นสุ่มตัวอย่างในฤดูอพยพที่ 1 ได้แก่ BS30 และ BS31 เพื่อทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ในตำแหน่ง *ND2* และ *Cyt-b* โดยใช้ไพรเมอร์ที่เหมาะสมตามงานวิจัยของ Dor *et al.* (2010) คือ ไพรเมอร์ METb/TRPc ในตำแหน่งยีน *ND2* และ ProgND5F/ProgCBR ในตำแหน่งยีน *Cyt-b* และใช้อุณหภูมิ Annealing ที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 54-62 องศาเซลเซียส จากนั้นทดสอบใช้ Annealing ที่ 54 และ 60 องศาเซลเซียส พบว่าปรากฏแถบที่หลากหลายทั้ง 2 ตำแหน่ง โดยจากการคำนวณสูตร (T_m-5 = T_a) ได้อุณหภูมิ Annealing ที่เหมาะสมของตำแหน่ง *Cyt-b* คือ 61 องศาเซลเซียส และตำแหน่ง *ND2* คือ 64 องศาเซลเซียส จึงทดสอบเพิ่มอุณหภูมิ Annealing เป็น 61 และ 62 องศาเซลเซียส เพื่อให้มีความจำเพาะมากขึ้น โดยพบว่าอุณหภูมิ Annealing ที่ 62 องศาเซลเซียสสามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมได้เหมาะสมกับทั้ง 2 ตำแหน่ง เมื่อแปลผลด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส ด้วยอะกาโรสเจล 1 เปอร์เซ็นต์ พบขนาดชิ้นส่วนของดีเอ็นเอในตำแหน่ง *ND2* ประมาณ 1,200 คู่เบส และตำแหน่ง *Cyt-b* ประมาณ 1,300 คู่เบส ดังแสดงในรูปที่ 4.5



รูปที่ 4.5 การเปรียบเทียบอุณหภูมิ Annealing จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในตำแหน่งยีน *ND2* และ *Cyt-b* ของนกนางแอ่นบ้าน (*Hirundo rustica*: BS30 และ BS31)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อทราบสภาวะและไพรเมอร์ที่เหมาะสมแล้ว จึงคัดเลือกตัวอย่างจากลักษณะสีขนบริเวณอกมาเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมและส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยในฤดูอพยพที่ 2 มีจำนวน 10 ตัวอย่าง ได้แก่ สีส้มเข้ม (NBS07) สีส้มปานกลาง (NBS119 และ BS86) อกสีส้มอ่อน ปลายส่วนล่างสีส้มเข้ม (BS76) สีส้มอ่อน (BS81 และ BS85) สีขาว (BS66, NBS20, NBS110 และ NBS115) ฤดูอพยพที่ 3 มีจำนวน 10 ตัวอย่าง ได้แก่ สีส้มเข้ม (BS100) สีส้มปานกลาง (BS95, BS96, NBS142 และ NBS148) สีส้มอ่อน (BS94, NBS138) สีขาว (BS104, NBS125 และ NBS133) เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งยีน *ND2* สามารถทราบขนาดที่แน่นอนของชิ้นดีเอ็นเอ คือ 1,151 คู่เบส ส่วนการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งยีน *Cyt-b* สามารถทราบขนาดที่แน่นอนของชิ้นดีเอ็นเอ คือ 1,260 คู่เบส เมื่อสุ่มเลือกตัวอย่างนกนางแอ่นบ้าน รหัส BS95 ไป Blast เพื่อเปรียบเทียบความสัมพันธ์ในฐานข้อมูล GenBank ในตำแหน่ง *ND2* มีค่าความเหมือน (identity) 98 เปอร์เซ็นต์ ในสปีชีส์ย่อย *H. r. tytleri, H. r. savignii, H. r. erythrogaster* และ *H. r. rustica* และค่าความเหมือน 99 เปอร์เซ็นต์ ในสปีชีส์ย่อย *H. r. gutturalis, H. r. transitiva H. r. rustica* สำหรับในตำแหน่ง *Cyt-b* มีค่าความเหมือน 94 เปอร์เซ็นต์ ในสปีชีส์ย่อย *H. r. savignii* และ *H. r. transitiva* มีค่าความเหมือน 95 เปอร์เซ็นต์ ใน สปีชีส์ย่อย *H. r. tytleri* และ *H. r. savignii* และค่าความเหมือน 96 เปอร์เซ็นต์ ในสปีชีส์ย่อย *H. r. gutturalis, H. r. erythrogaster, H. r. transitiva* และ *H. r. rustica* จากนั้นจึงสุ่มเลือกตัวอย่างจากฐานข้อมูลมาเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ ดังตารางที่ 4.5

จากผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูลสุ่มเลือกตัวอย่างที่มีค่าความเหมือนมากกว่า 94 เปอร์เซ็นต์ มาจำนวน 17 ตัวอย่าง โดยในตัวอย่างดังกล่าวเป็นตัวอย่างจากงานวิจัยของ Zink *et al.* (2006) แบ่งเป็นสปีชีส์ย่อย *H. r. gutturalis* (gu2 และ gu3) และ *H. r. tytleri* (ty1 และ ty2) ตัวอย่างจากงานวิจัยของ Dor *et al.* (2010) มีสปีชีส์ย่อย *H. r. gutturalis* (gu1) *H. r. erythrogaster* (er1, er2 และ er3) *H. r. savignii* (sa1 และ sa2) และ *H. r. rustica* (ru1 และ ru2) และตัวอย่างจากงานวิจัยของ Dor *et al.* (2011) มีสปีชีส์ย่อย *H. r. transitive* (tr1, tr2, tr3 และ tr4) และ *H. r. rustica* (ru3) นำมาใช้เพื่อหาความสัมพันธ์ในรูปแบบ Phylogenetic tree โดยใช้โปรแกรม MEGA 6 เพื่อวิเคราะห์แบบ Maximum-likelihood และ Bootstrap เท่ากับ 1,000

จากตารางที่ 4.5 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของนกนางแอ่นบ้านที่นำมาศึกษาเปรียบเทียบในครั้งนี้นั้น มาจากการศึกษาก่อนหน้านี้ แบ่งเป็นการศึกษาวิจัยของ Zink *et al.* (2006) โดย Accession number ขึ้นต้นด้วย DQ มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอในตำแหน่ง *ND2* ของสปีชีส์ย่อย *H. r. gutturalis* และ *H. r. tytleri* เท่ากับ 1,041 คู่เบส จากงานวิจัยของ Dor *et al.* (2010) โดย Accession number ขึ้นต้นด้วย GU แบ่งเป็นขนาดของชิ้นดีเอ็นเอในตำแหน่ง *ND2* ขนาด 1,023 คู่เบส และตำแหน่ง *Cyt-b* มีขนาด 1,143 คู่เบส และการศึกษาวิจัยของ Dor *et al.* (2011) โดย Accession number ขึ้นต้นด้วย JN มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอในตำแหน่ง *ND2* ขนาด 1,041 คู่เบส และตำแหน่ง *Cyt-b* ขนาด 1,110-1,143 คู่เบส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 แสดงรหัส สปีชีส์ย่อย Accession number ค่า identity และประเทศ ที่ใช้ในการศึกษาสปีชีส์ย่อยในนกนางแอ่นบ้าน จากฐานข้อมูล GenBank เปรียบเทียบกับนก-นางแอ่นบ้านรหัส BS95

รหัส	สปีชีส์ย่อย	Accession number		Identity (%)		ประเทศ
		ND2	*Cyt-b*	*ND2*	*Cyt-b*	
ty1	*H. r. tytleri*	DQ176557	GU460259	98	95	รัสเซีย
ty2	*H. r. tytleri*	DQ176567	GU460260	98	95	รัสเซีย
gu1	*H. r. gutturalis*	GU460321	GU460261	99	96	ญี่ปุ่น
gu2	*H. r. gutturalis*	DQ176547	GU460265	99	96	รัสเซีย
gu3	*H. r. gutturalis*	DQ176551	GU460264	99	96	รัสเซีย
er1	*H. r. erythrogaster*	GU460315	GU460253	98	96	อเมริกา
er2	*H. r. erythrogaster*	GU460317	GU460255	98	96	อเมริกา
er3	*H. r. erythrogaster*	GU460318	GU460256	98	96	อาร์เจนตินา
sa1	*H. r. savignii*	GU460310	GU460248	98	94	อียิปต์
sa2	*H. r. savignii*	GU460312	GU460250	98	95	อียิปต์
tr1	*H. r. transitiva*	JN642496	JN642406	99	96	อิสราเอล
tr2	*H. r. transitiva*	JN642510	JN642420	99	94	อิสราเอล
tr3	*H. r. transitiva*	JN642513	JN642423	99	96	อิสราเอล
tr4	*H. r. transitiva*	JN642515	JN642425	99	96	อิสราเอล
ru1	*H. r. rustica*	GU460302	GU460238	99	96	อเมริกา
ru2	*H. r. rustica*	GU460303	GU460240	98	96	แอฟริกาใต้
ru3	*H. r. rustica*	JN642437	JN642347	99	96	อังกฤษ

ในการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์นกนางแอ่นบ้านจำนวน 20 ตัวอย่าง ได้แก่ ฤดูอพยพที่ 2 จำนวน 10 ตัวอย่าง และฤดูอพยพที่ 3 จำนวน 10 ตัวอย่าง กับฐานข้อมูล GenBank ได้เลือกใช้ทั้ง 2 ตำแหน่งวิเคราะห์ร่วมกันในการระบุสปีชีส์ย่อยของนกนางแอ่นบ้าน เพราะขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอในฐานข้อมูลมีขนาดลำดับนิวคลีโอไทด์แตกต่างกันดังที่กล่าวมาแล้ว ดังนั้นในการศึกษาเปรียบเทียบจึงวิเคราะห์ตำแหน่งยีน *ND2* ที่มีชิ้นดีเอ็นเอขนาด 1,014 คู่เบส และตำแหน่งยีน *Cyt-b* ที่มีชิ้นดีเอ็นเอขนาด 1,012 คู่เบส โดยมีขนาดชิ้นดีเอ็นเอรวม 2,026 คู่เบส เท่านั้น

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งยีน *ND2* และ *Cyt-b* จำนวน 2,026 คู่เบสของนกนางแอ่นบ้านในประเทศไทยจำนวน 20 ตัวอย่างและนกนางแอ่นบ้านจากฐานข้อมูลทั้ง 6 สปีชีส์ย่อย จำนวน 17 ตัวอย่าง พบว่าสามารถจำแนกกลุ่มออกเป็น 4 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ได้แก่ รหัส ru1, ru2, ru3, sa1, sa2, tr1, tr2, tr3 และ tr4 ประกอบไปด้วยสปีชีส์ย่อย *H. r. rustica, H. r. savignii* และ *H. r. transitiva* โดยไม่มีตัวอย่างนกนางแอ่นบ้านจากประเทศไทย กลุ่มที่ 2 ได้แก่ รหัส er1, er2, er3, ty1, ty2, BS76 และ BS100 ประกอบไปด้วยสปีชีส์ย่อย *H. r. erythrogaster* และ *H. r.*

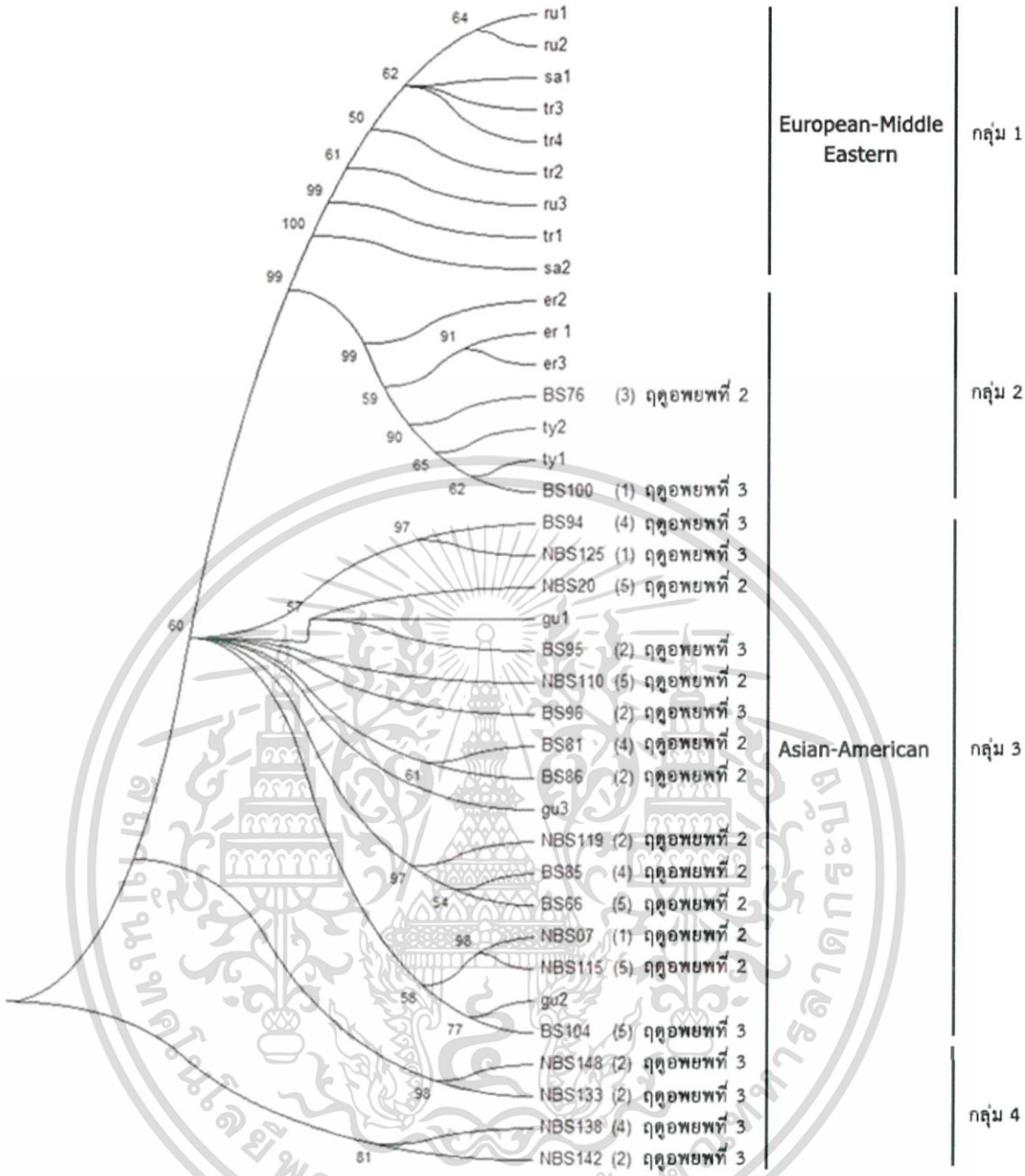
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

tytleri โดยพบว่านกนางแอ่นบ้านรหัส BS76 และ BS100 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับ *H. r. tytleri* แต่ยังไม่สามารถระบุได้อย่างชัดเจน เนื่องจากว่าสปีชีส์ย่อย *H. r. tytleri* มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกันมากกับสปีชีส์ย่อย *H. r. erythrogaster* กลุ่มที่ 3 ได้แก่ รหัส gu1, gu2, gu3 BS66, BS81, BS85, BS86, BS95, BS96, BS104, NBS07, NBS20, NBS110, NBS115 และ NBS125 โดยพบเพียงสปีชีส์ย่อย *H. r. gutturalis* จึงอาจกล่าวได้ว่านกในกลุ่มนี้เป็นสปีชีส์ย่อย *H. r. gutturalis* กลุ่มที่ 4 ได้แก่ รหัส NBS133 NBS138 NBS142 และ NBS148 ไม่สามารถระบุสปีชีส์ย่อยได้ เนื่องจากไม่มีสปีชีส์ย่อยจากฐานข้อมูลรวมอยู่ในกลุ่ม ดังนั้นนกนางแอ่นบ้านในประเทศไทยอาจแบ่งเป็น 3 กลุ่มใหญ่ โดยส่วนใหญ่จัดอยู่ในกลุ่มที่มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับ *H. r. gutturalis* มีส่วนน้อยที่สัมพันธ์กับ *H. r. tytleri* และยังระบุไม่ได้ชัดเจนอีก 1 กลุ่ม ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Dor *et al*. (2010) ที่แบ่งนกนางแอ่นบ้านเป็น 2 กลุ่มใหญ่ โดยกลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย *Hirundo rustica rustica, H. r. transitiva* และ *H. r. savignii* ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม European-Middle Eastern แยกออกจากกลุ่ม Asia- American ที่มีสปีชีส์ย่อย *H. r. gutturalis H. r. tytleri.* และ *H. r. erythrogaster* ดังแสดงในรูปที่ 4.6

เมื่อพิจารณาการระบุสปีชีส์ย่อยแต่ละจังหวัด โดยจังหวัดน่านพบตัวอย่างที่มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับสปีชีส์ย่อย *H. r. gutturalis* ได้แก่ รหัส NBS07, NBS20, NBS110 และ NBS115 ส่วนกรุงเทพมหานครพบตัวอย่างที่มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับสปีชีส์ย่อย *H. r. gutturalis* ได้แก่ รหัส BS66, BS81, BS85, BS86, BS95, BS96 และ BS104 และตัวอย่างที่มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับสปีชีส์ย่อย *H. r. tytleri* ได้แก่รหัส BS76 และ BS100 ทั้งนี้สามารถนำข้อมูลดังกล่าวอธิบายการระบุเพศจากลักษณะความยาวจุดแต้มขาวบนขนหางคู่นอกของนกนางแอ่นบ้านจากกรุงเทพมหานครที่มีค่าความผิดพลาดมากกว่านกนางแอ่นบ้านจากจังหวัดน่าน เนื่องจากกรุงเทพมหานครมีนกนางแอ่นบ้านอย่างน้อย 2 สปีชีส์ย่อย จึงมีความแปรผันของข้อมูลมากกว่าจังหวัดน่านที่พบอย่างน้อย 1 สปีชีส์ย่อย

ส่วนการพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะของสีขนบริเวณอกกับสปีชีส์ย่อย พบว่าลักษณะสีขนบริเวณอกไม่มีความสัมพันธ์กับสปีชีส์ย่อย โดยเฉพาะในกลุ่มที่ 3 มีสีขนบริเวณอกเกือบทุกลักษณะได้แก่ สีส้มเข้ม สีส้มปานกลาง สีส้มอ่อน และสีขาว สอดคล้องกับรายงานของ Sarah (2007) ที่กล่าวว่านกจะมีความแปรผันของสีขนในฤดูการอพยพ จึงไม่สามารถระบุสปีชีส์ย่อยจากการสังเกตสีขนบริเวณอกในนกนางแอ่นบ้านช่วงฤดูอพยพได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.6 Phylogenetic tree ของนกนางแอ่นบ้านที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MEGA 6 ด้วยวิธี Maximum-likelihood โดยทำซ้ำ 1000 ครั้ง จากลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง *ND2* และ *Cyt-b* เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล GenBank สำหรับตัวเลขในวงเล็บแสดงสีขนบริเวณอก ได้แก่ (1) สีส้มเข้ม (2) ส้มปานกลาง (3) อกสีส้มอ่อนปลายส่วนล่างสีส้มเข้ม (4) สีส้มอ่อน และ (5) สีขาว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งยีน *ND2* และ *Cyt-b* ของนกนางแอ่นบ้าน โดยพิจารณาตำแหน่งยีน *ND2* จากลำดับนิวคลีโอไทด์ 1,014 คู่เบส มีสนิปส์ (SNPs) แบบ Transition จำนวน 2 รูปแบบ ได้แก่ A กับ T และ C กับ G และมีสนิปส์แบบ Transversion จำนวน 3 รูปแบบ ได้แก่ A กับ G, C กับ T และ G กับ T แต่ไม่พบรูปแบบ A กับ C โดยในตัวอย่างกลุ่มที่ 3 จำนวน 14 ตัวอย่าง ที่มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับ *H. r. gutturalis* มีสนิปส์แบบ Transition 0.30 เปอร์เซ็นต์แบ่งเป็น A-T และ C-G จำนวน 0.20 และ 0.10 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และมีสนิปส์แบบ Transversion 1.28 เปอร์เซ็นต์ แบ่งเป็น A-G, C-T และ G-T จำนวน 0.69, 0.49 และ 0.10 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ มีผลรวมการเปลี่ยนแปลงเบสทั้งหมด 1.58 เปอร์เซ็นต์ ส่วนตัวอย่างกลุ่มที่ 2 จำนวน 2 ตัวอย่าง ที่มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับ *H. r. tytleri* พบสนิปส์แบบ Transition คิดเป็น 0.60 เปอร์เซ็นต์ แบ่งเป็น A-T และ C-G จำนวน 0.30 และ 0.30 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และแบบ Transversion คิดเป็น 1.29 เปอร์เซ็นต์ แบ่งเป็น A-G, C-T และ G-T จำนวน 0.20, 0.79 และ 0.30 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ มีผลรวมการเปลี่ยนแปลงทั้งหมด 1.89 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าตัวอย่างในกลุ่มที่ 2 และ 3 พบความหลากหลายภายในแต่ละกลุ่มโดยแสดงเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงเบสที่ใกล้เคียงกัน สำหรับการพิจารณาตำแหน่งยีน *Cyt-b* จากลำดับนิวคลีโอไทด์ 1,012 คู่เบส มีสนิปส์แบบ Transition ได้แก่ A กับ T และ C กับ G และแบบ Transversion ได้แก่ A กับ C, A กับ G, C กับ T และ G กับ T ซึ่งตัวอย่างกลุ่มที่ 3 มีสนิปส์แบบ Transition 2.27 เปอร์เซ็นต์ แบ่งเป็น A-T และ C-G จำนวน 1.38 และ 0.08 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และแบบ Transversion 5.54 เปอร์เซ็นต์ แบ่งเป็น A-C, A-G, C-T และ G-T จำนวน 1.98, 1.38, 1.78 และ 0.40 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ มีผลรวมการเปลี่ยนแปลงทั้งหมด 7.81 เปอร์เซ็นต์ ส่วนตัวอย่างกลุ่มที่ 2 ไม่พบสนิปส์แบบ Transition แต่พบสนิปส์แบบ Transversion 0.69 เปอร์เซ็นต์ แบ่งเป็น A-C, A-G และ C-T จำนวน 0.39, 0.10 และ 0.20 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จึงมีผลรวมการเปลี่ยนแปลงเบส 0.69 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งพบความหลากหลายสูงในกลุ่มที่ 3 แต่พบความหลากหลายน้อยในตัวอย่างกลุ่มที่ 2 เนื่องจากมีเพียง 2 ตัวอย่างในการวิเคราะห์

เมื่อนำเปอร์เซ็นต์ของการเปลี่ยนแปลงเบสของตำแหน่งยีน *ND2* และ *Cyt-b* มาวิเคราะห์รวมกัน จะเห็นได้ชัดเจนว่ากลุ่มที่ 2 มีการเปลี่ยนแปลงเบสรวม 2.58 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งน้อยกว่ากลุ่มที่ 3 ที่มีการเปลี่ยนแปลงเบสรวม 9.39 เปอร์เซ็นต์ แต่เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงนี้ไม่สามารถนำมาเปรียบเทียบกันได้เนื่องจากสปีชีส์ย่อย *H. r. tytleri* ในกลุ่มที่ 2 มีเพียง 2 ตัวอย่าง จึงไม่สามารถกล่าวได้ว่ามีความหลากหลายน้อย เมื่อเทียบกับสปีชีส์ย่อย *H. r. gutturalis* ในกลุ่มที่ 3 ที่มีจำนวน 14 ตัวอย่าง ดังข้อมูลในตารางที่ 4.6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

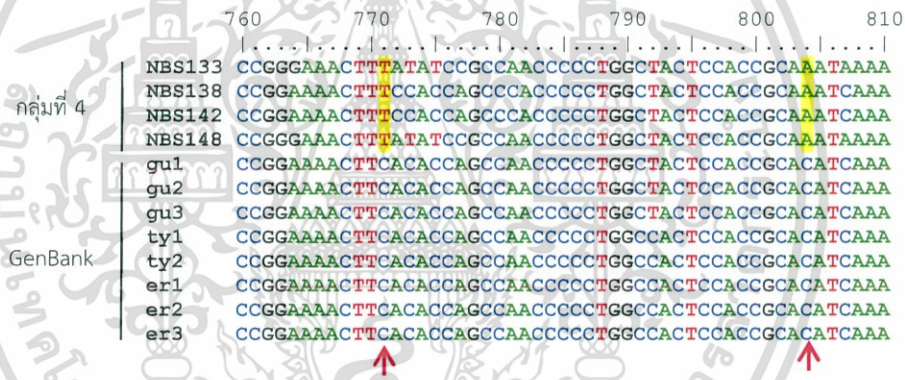
ตารางที่ 4.6 เปอร์เซ็นต์การเกิด SNPs และรูปแบบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แปรผันในตำแหน่งยีน *ND2* และ *Cyt-b* ของนกนางแอ่นบ้านสปีชีส์ย่อย *H. r. gutturalis* และ *H. r. tytleri*

SNP	รูปแบบการแทนที่เบส	การเปลี่ยนแปลงเบสในยีน *ND2* (เปอร์เซ็นต์)		การเปลี่ยนแปลงเบสในยีน *Cyt-b* (เปอร์เซ็นต์)	
		H. r. gutturalis (gu)	*H. r. tytleri* (ty)	*H. r. gutturalis* (gu)	*H. r. tytleri* (ty)
Transition	A-T	0.20	0.30	1.38	0
	C-G	0.10	0.30	0.89	0
Transversion	A-C	0	0	1.98	0.39
	A-G	0.69	0.20	1.38	0.10
	C-T	0.49	0.79	1.78	0.20
	G-T	0.1	0.30	0.40	0
รวม	-	1.58	1.89	7.81	0.69

เมื่อวิเคราะห์ประสิทธิภาพของการระบุสปีชีส์ย่อยของนกนางแอ่นบ้านในการจำแนกตัวอย่างของฐานข้อมูล GenBank ได้แก่ สปีชีส์ย่อย *H. r. gutturalis* รหัส gu1, gu2 และ gu3 และสปีชีส์ย่อย *H. r. tytleri* รหัส ty1 และ ty2 เมื่อใช้ตำแหน่งยีน *ND2* ในการจำแนกความต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่าง *H. r. gutturalis* และ *H. r. tytleri* พบความต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ คือ 1.87 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อใช้ตำแหน่งยีน *Cyt-b* ในการจำแนกระหว่าง 2 สปีชีส์ย่อยนี้พบ ความต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ คือ 1.09 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งการใช้ตำแหน่งยีน *Cyt-b* ในการจำแนก 2 สปีชีส์ย่อยนี้ให้ความต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์น้อยกว่าตำแหน่งยีน *ND2* จึงกล่าวได้ว่าตำแหน่ง *ND2* มีประสิทธิภาพในการแยก 2 สปีชีส์ย่อยนี้ได้ดีกว่าตำแหนงยีน *Cyt-b* และเมื่อนำตัวอย่างในกลุ่มที่ 3 จำนวน 14 ตัวอย่าง และกลุ่มที่ 2 จำนวน 2 ตัวอย่าง ที่ทราบสปีชีส์ย่อยแล้วมาทดสอบการระบุสปีชีส์ย่อยด้วยตำแหน่ง *ND2* จากการ Blast สามารถระบุว่าเป็นสปีชีส์ย่อย *H. r. gutturalis* จำนวน 14 ตัวอย่าง มีค่า identity 99 เปอร์เซ็นต์ และระบุเป็นสปีชีส์ย่อย *H. r. tytleri* มีค่า identity ระหว่าง 94-96 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตามเมื่อทดสอบการระบุสปีชีส์ย่อยด้วยตำแหน่ง *Cyt-b* สามารถระบุสปีชีส์ย่อยจากการ Blast ได้ถูกต้องเพียงจำนวน 4 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นตัวอย่างสปีชีส์ย่อย *H. r. gutturalis* โดยให้ค่า identity 99 เปอร์เซ็นต์ ส่วนตัวอย่างที่เหลือจำนวน 12 ตัวอย่างให้ค่า identity ของ 2 สปีชีส์ย่อยเท่ากัน ทำให้ไม่สามารถจำแนกสปีชีส์ย่อยจากการ Blast ด้วยตำแหน่ง *Cyt-b* ได้ ดังนั้นในการวิเคราะห์สปีชีส์ย่อยอาจทำได้ด้วยยีนในตำแหน่งยีน *ND2* ได้ แต่มีโอกาสในการระบุสปีชีส์ย่อย *H. r. tytleri* ผิดพลาดได้จากค่า identity ต่ำ อีกทั้งสปีชีส์ย่อย *H. r. tytleri* ยังมีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับสปีชีส์ย่อย *H. r. erythrogaster* จึงอาจทำให้การวิเคราะห์คลาดเคลื่อนได้ ดังงานวิจัยของ Malaitad *et al*. (2016) ที่พบว่าการระบุสปีชีส์ย่อยในนกนางแอ่นบ้านของประเทศไทย (รหัส BS76) ระบุเป็นสปีชีส์ย่อย *H. r. erythrogaster* ซึ่งไม่สอดคล้องกับงานวิจัยนี้ที่ระบุว่ารหัส BS76 เป็นสปีชีส์ย่อย *H. r. tytleri* เนื่องจากในงานวิจัยดังกล่าวไม่ได้นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของสปีชีส์ย่อย *H. r. tytleri* มาวิเคราะห์ อีกทั้งใช้เพียงตำแหน่งยีน *ND2* ในการระบุสปีชีส์ย่อย ดังนั้นในการวิเคราะห์สปีชีส์ย่อยควรนำลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้ง 2 ตำแหน่งมาวิเคราะห์ร่วมกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำหรับการเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมในกลุ่มที่ 4 ที่ไม่สามารถระบุสปีชีส์ย่อยได้นั้น อาจเนื่องจากเป็นลูกผสมระหว่างสปีชีส์ย่อย *H. r. tytleri, H. r. gutturalis* หรือ *H. r. erythrogaster* ดังรายงานของ Scordato *et al*. (2017) ที่พบการผสมข้ามสปีชีส์ย่อยระหว่างสปีชีส์ย่อย *H. r. tytleri, H. r. gutturalis* และ *H. r. rustica* ในเขตรอยต่อของประชากรจากประเทศรัสเซียตะวันออกถึงประเทศรัสเซียตะวันตก โดยพบลูกผสมในพื้นที่ดังกล่าวมีลักษณะของสีขนบริเวณอกที่แตกต่างไปจากสปีชีส์ย่อยเดิมหรืออาจเป็นสปีชีส์ใหม่ รวมทั้งอาจเนื่องจากไม่มีตัวอย่างในฐานข้อมูลในการเปรียบเทียบ โดยคาดว่าน่าจะเป็นลูกผสมระหว่าง *H. r. gutturalis*, *H. r. tytleri* หรือ *H. r. erythrogaster* เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างกลุ่มที่ 4 กับตัวอย่างจากฐานข้อมูลของสปีชีส์ย่อย *H. r. gutturalis*, *H. r. tytleri* และ *H. r. erythrogaster* พบบางตำแหน่งยีน *Cyt-b* ของกลุ่มที่ 4 มีการเปลี่ยนแปลงเบสแตกต่างจากตัวอย่างจากฐานข้อมูล ดังแสดงในรูปที่ 4.7 พบในตำแหน่งที่ 771 โดยกลุ่มที่ 4 มีเบส T ซึ่งต่างจากสปีชีส์ย่อยทั้งสามที่มีเบสเป็น C และในตำแหน่งที่ 804 ของกลุ่มที่ 4 มีเบส A ซึ่งต่างจากสปีชีส์ย่อยทั้งสามที่มีเบสเป็น C ดังนั้นจึงคาดคะเนได้ว่ากลุ่มที่ 4 ไม่ใช่ลูกผสมระหว่าง *H. r. gutturalis*, *H. r. tytleri* หรือ *H. r. erythrogaster* ทั้งนี้อาจเป็นลูกผสมระหว่างสปีชีส์ย่อยอื่นๆ หรือเป็นสปีชีส์ย่อยใหม่ โดยยังไม่สามารถระบุได้ชัดเจนเนื่องจากไม่มีลำดับนิวคลีคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank ในการเปรียบเทียบ

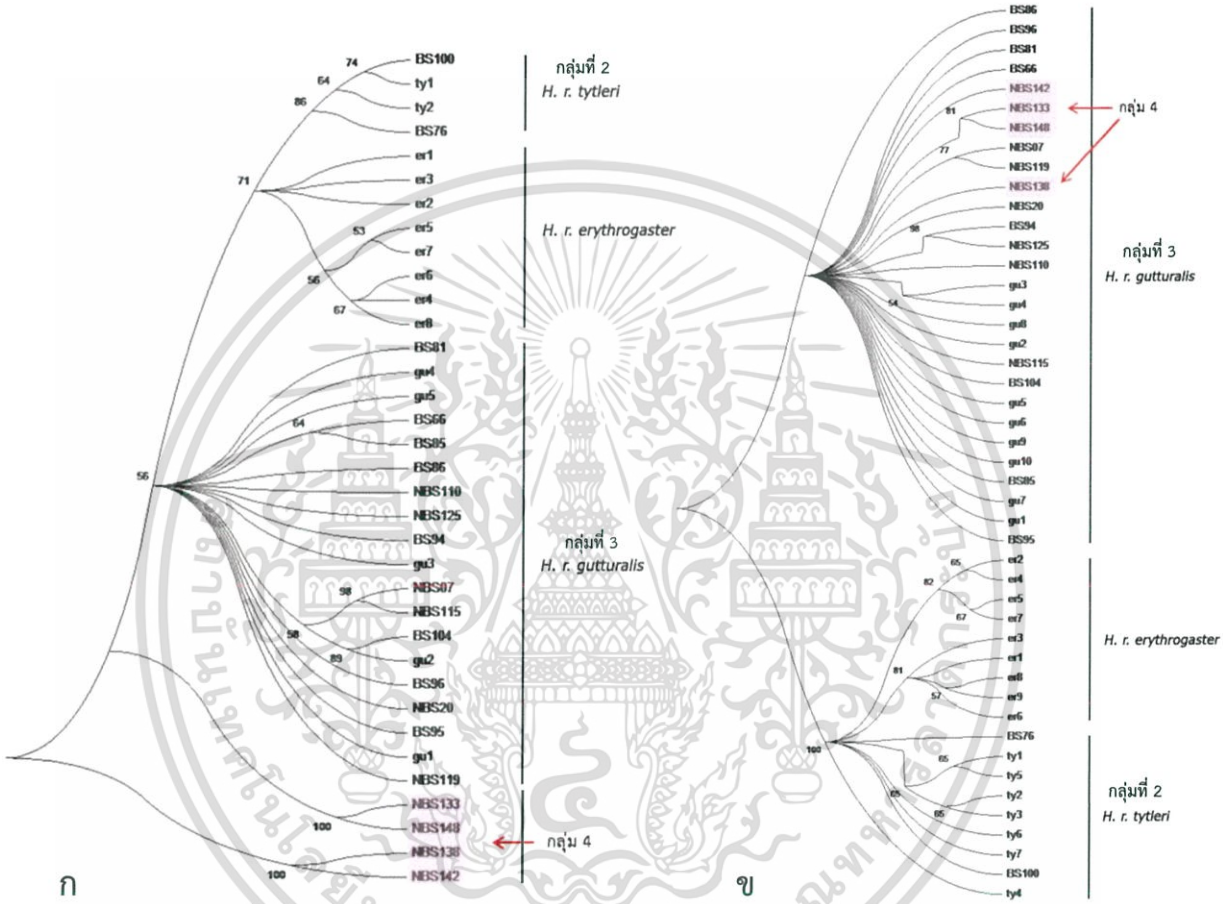


รูปที่ 4.7 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งยีน *Cyt-b* ของนกนางแอ่นบ้านโดยลูกศรชี้ตำแหน่งที่แตกต่างกัน

เมื่อพิจารณาการระบุสปีชีส์ย่อยแยกทีละตำแหน่งโดยตัดตัวอย่างจากฐานข้อมูลในกลุ่มที่ 1 ออก ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม European-Middle Eastern และเพิ่มตัวอย่างของฐานข้อมูลในกลุ่มของ Asian-American พบว่าตำแหน่งยีน *Cyt-b* สามารถจัดกลุ่มที่ 2 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับสปีชีส์ย่อย *H. r. tytleri* และจัดกลุ่มที่ 3 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับสปีชีส์ย่อย *H. r. gutturalis* แต่ไม่สามารถระบุสปีชีส์ย่อยกลุ่มที่ 4 ได้เช่นเดียวกับการวิเคราะห์ทั้ง 2 ตำแหน่ง ดังแสดงในรูปที่ 4.8ก สำหรับตำแหน่งยีน *ND2* เมื่อเพิ่มตัวอย่างจากฐานข้อมูลในการวิเคราะห์พบว่าสามารถจัดกลุ่มที่ 2 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับสปีชีส์ย่อย *H. r. tytleri* และกลุ่มที่ 3 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับสปีชีส์ย่อย *H. r. gutturalis* และสามารถจัดกลุ่มที่ 4 ได้แก่ NBS133, NBS138, NBS142 และ NBS148 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับสปีชีส์ย่อย *H. r. gutturalis* ดังแสดงในรูปที่ 4.8ข โดยจะเห็นว่าตัวอย่างในกลุ่มที่ 4 เป็นตัวอย่างนกนางแอ่นบ้านจากจังหวัดน่าน ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าตัวอย่างในกลุ่มที่ 4 อาจเป็นสปีชีส์ย่อยใหม่ที่มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับสปีชีส์ย่อย *H. r. gutturalis* เนื่องจากมีรายงานของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตวงรัตน์และสุมาลี (2541) รายงานว่าพบการทำรังวางไข่ของนกนางแอ่นบ้านที่จังหวัดน่านเพราะสภาพอากาศของน่านเป็นเมืองหนาวที่เหมาะแก่การทำรังวางไข่ของนกนางแอ่นบ้าน จึงอาจเป็นไปได้ว่าตัวอย่างในกลุ่มที่ 4 เป็นตัวอย่างจากจังหวัดน่านโดยเป็นกลุ่มนกประจำถิ่นที่มีการทำรังวางไข่ จึงส่งผลให้มีพันธุกรรมที่เปลี่ยนแปลงไปจาก 6 สปีชีส์ย่อย อย่างไรก็ตามยังไม่สามารถระบุกลุ่มที่ 4 ว่าเป็นสปีชีส์ย่อยใหม่ได้อย่างชัดเจน เนื่องจากจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมโดยเก็บตัวอย่างจากรังของนกนางแอ่นบ้านที่จังหวัดน่าน และพื้นที่อื่นๆในประเทศไทยที่มีรายงานพบการทำรังวางไข่ของนกนางแอ่นบ้านเพื่อยืนยันผลการทดลองนี้



รูปที่ 4.8 Phylogenetic tree ของนกนางแอ่นบ้านที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MEGA 6 จากลำดับนิวคลีโอไทด์ (ก) ตำแหน่งยีน *Cyt-b* และ (ข) ตำแหน่งยีน *ND2* เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล GenBank

สำหรับประโยชน์ที่ได้รับจากการระบุสปีชีส์ย่อยนี้ คือสามารถทราบเส้นทางอพยพที่ชัดเจนมากยิ่งขึ้น โดยจากรายงานวิจัยก่อนหน้าพบแหล่งที่อยู่ของสปีชีส์ย่อย *H. r. gutturalis* ในช่วงฤดูผสมพันธุ์ทางประเทศรัสเซียตะวันออก ประเทศจีน ประเทศเกาหลี และประเทศญี่ปุ่น (Dickinson and Dekker, 2001) งานวิจัยที่สังเกตพฤติกรรมการผสมพันธุ์ของนกนางแอ่นบ้านสปีชีส์ย่อย *H. r. gutturalis* ในประเทศญี่ปุ่น (Hasegawa *et al*., 2010) รวมทั้งรายงานของ Dor *et al*. (2010) ที่ศึกษาความหลากหลายของนกนางแอ่นบ้าน 6 สปีชีส์ย่อยทั่วโลก โดยเก็บตัวอย่าง *H. r. gutturalis* จากประเทศรัสเซีย ประเทศมองโกเลีย และประเทศญี่ปุ่น และรายงานของ Pagani-Nunez *et al*.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(2016) พบการทำรังวางไข่ทางตอนใต้ของประเทศจีน ส่วนสปีชีส์ย่อย *H. r. tytleri* มีเพียงรายงานของ Dickinson and Dekker (2001) และ Dor *et al*. (2010) ที่พบแหล่งที่อยู่อาศัยในประเทศมองโกเลีย ทะเลสาบไบคาลของประเทศรัสเซีย ดังนั้นจึงคาดการณ์เส้นทางอพยพของ *H. r. gutturalis* และ *H. r. tytleri* ที่มายังประเทศไทยนั้นอยู่ในเส้นทางอพยพเอเชียตะวันออกถึงออสเตรเลีย โดยอาจบินมาจากตอนเหนือของรัสเซีย และหรือด้านตะวันออกเฉียงเหนือของรัสเซียบินเลาะชายฝั่งจากประเทศญี่ปุ่นมายังประเทศไทย ซึ่งควรมีการศึกษายืนยันการอพยพด้วยวิธีอื่นๆ ต่อไป นอกจากนี้ยังสามารถใช้ประโยชน์จากการระบุสปีชีส์ย่อยของนกนางแอ่นบ้านในประเทศ ในกรณีควบคุมหรือป้องกันโรคระบาด หากพบรายงานการระบาดของโรคที่นกนางแอ่นบ้านเป็นพาหะนำโรคจะสามารถใช้วางแผนป้องกันโรคที่จะมากับนกนางแอ่นบ้านสปีชีส์ย่อย *H. r. gutturalis* และ *H. r. tytleri* จากประเทศต่างๆ ที่มีการระบาดมาก่อนได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากผลการศึกษาอัตราส่วนเพศของนกนางแอ่นบ้านที่ดักจับบริเวณอำเภอปัว จังหวัดน่าน และถนนสีลม เขตบางรัก กรุงเทพมหานคร นำมาเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในตำแหน่งยีน *CHD* ด้วยไพรเมอร์ P2/P8 ที่อุณหภูมิ Annealing 50 องศาเซลเซียส จำนวน 300 ตัวอย่าง สามารถระบุเพศได้ทั้งหมด 292 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 97.33 เปอร์เซ็นต์ ระบุเป็นเพศเมีย 127 ตัวอย่าง เพศผู้ 165 ตัวอย่าง และระบุไม่ได้ 8 ตัวอย่าง และทราบอัตราส่วนเพศผู้ต่อเพศเมียในฤดูอพยพที่ 1-3 คือ 2.41: 1, 1: 1.01 และ 1.41: 1 ตามลำดับ พบอัตราส่วนเพศผู้ต่อเมียในนกนางแอ่นบ้านบริเวณอำเภอปัว จังหวัดน่านใกล้เคียง 1: 1 คือ 1: 1.30 และ 1: 1.06 และพบอัตราส่วนเพศผู้มากกว่าเพศเมียในนกนางแอ่นบ้านบริเวณถนนสีลม เขตบางรัก กรุงเทพมหานคร คือ 2.41: 1, 2.80: 1 และ 1: 0

สำหรับการหาความสัมพันธ์ระหว่างเพศกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วยโปรแกรม Rapid miner studio พบว่า ความยาวของจุดแต้มขาวบนขนหางคู่นอกและความเว้าลึกของขนหางมีความสัมพันธ์กับเพศ สามารถนำมาใช้ในการทำนายเพศโดยมีค่าความถูกต้องในการระบุเพศมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ โดยหากพิจารณาลักษณะของความยาวจุดแต้มขาวบนขนหางคู่นอกที่มากกว่า 20.50 มิลลิเมตร ทำนายเป็นเพศผู้ และน้อยกว่าหรือเท่ากับ 20.50 มิลลิเมตร ทำนายเป็นเพศเมีย ส่วนการพิจารณาความเว้าลึกของขนหางที่มากกว่า 38.50 มิลลิเมตร ทำนายเป็นเพศผู้ และน้อยกว่าหรือเท่ากับ 38.50 มิลลิเมตร ทำนายเป็นเพศเมีย ทั้งนี้ยังสามารถพิจารณาทั้ง 2 ลักษณะร่วมกันโดยจะพิจาณาความยาวจุดแต้มขาวก่อน ซึ่งหากมีค่ามากกว่า 21.25 มิลลิเมตร ทำนายเป็นเพศผู้ และน้อยกว่าหรือเท่ากับ 21.25 มิลลิเมตร ให้พิจาณาความเว้าลึกของขนหางต่อ ซึ่งหากมากกว่า 47 มิลลิเมตร ทำนายเป็นเพศผู้ และน้อยกว่าหรือเท่ากับ 47 มิลลิเมตร ทำนายเป็นเพศเมีย นอกจากนี้ยังพบว่าความเข้มของสีขนบริเวณหน้าอกมีแนวโน้มสัมพันธ์กับเพศ

การศึกษาความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งยีน *CHD-Z* สามารถแบ่งนกนางแอ่นบ้านเป็น 2 กลุ่ม แต่ไม่สามารถใช้ในการระบุสปีชีส์ย่อยได้ เนื่องจากไม่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล ดังนั้นการศึกษาในตำแหน่งยีน *ND2* และ *Cyt-b* ตัวอย่างนกนางแอ่นบ้านจำนวน 20 ตัวอย่าง และตัวอย่างจากฐานข้อมูล GenBank จำนวน 17 ตัวอย่าง เป็นนกนางแอ่นบ้านทั้ง 6 สปีชีส์ย่อย พบว่าสามารถแยกกลุ่มนกนางแอ่นบ้านเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 เป็นตัวอย่างจากฐานข้อมูลประกอบไปด้วยสปีชีส์ย่อย *Hirundo rustica rustica*, *H. r. transitiva* และ *H. r. savignii* ซึ่งอยู่ในกลุ่ม European-Middle Eastern กลุ่มที่ 2 มีสปีชีส์ย่อยได้แก่ *H. r. tytleri* และ *H. r. erythrogaster* โดยตัวอย่างจากประเทศไทยแสดงความสัมพันธ์กับ *H. r. tytleri* ซึ่งตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ส่วนใหญ่เป็นกลุ่มที่ 3 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับสปีชีส์ย่อย *H. r. gutturalis* ส่วนกลุ่มที่ 4 ไม่สามารถระบุสปีชีส์ย่อยได้เนื่องจากไม่มีตัวอย่างจากฐานข้อมูลเป็นตัวเปรียบเทียบหรืออาจเป็นสปีชีส์ย่อยใหม่ เมื่อพิจารณาสีขนบริเวณอกของนกนางแอ่นบ้านพบว่าไม่สัมพันธ์กับสปีชีส์ย่อย อีกทั้งยังไม่สามารถแยกนกนางแอ่นบ้านจังหวัดน่านออกจากกรุงเทพมหานครได้ จึงอาจกล่าวได้ว่าตัวอย่างจากประเทศไทยมีสปีชีส์ย่อยอย่างน้อย 2 สปีชีส์ย่อย ได้แก่ *H. r. gutturalis* และ *H. r. tytleri* โดยในการศึกษาสปีชีส์ย่อยนั้น แม้ว่าตำแหน่งยีน *ND2* จะสามารถระบุสปีชีส์ย่อยได้ แต่ยัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาจมีข้อผิดพลาดในสปีชีส์ย่อย *H. r. tytleri* จึงไม่ควรใช้ตำแหน่งยีน *ND2* หรือ *Cyt-b* ตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่ง แต่ควรใช้ทั้ง 2 ตำแหน่งร่วมกันในการระบุสปีชีส์ย่อย

5.2 ข้อเสนอแนะ

ในการศึกษาอัตราส่วนเพศ ความหลากหลายและการระบุสปีชีส์ย่อยของนกนางแอ่นบ้าน ควรมีการเพิ่มจำนวนตัวอย่างในการศึกษาและเก็บตัวอย่างจากหลายพื้นที่หรือหลายฤดูอพยพ และควรศึกษาความหลากหลายเพิ่มเติมในเทคนิคทางโมเลกุลอื่นๆ เพื่อยืนยันผลการทดลองนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

ณิชาภัทร ชอบอาภรณ์ ไกรรัตน์ เอี่ยมอาไพ สมชาย นิ่มนวล ฑิฐิ สอนสา และสุพัตรา โพธิ์เอี่ยม. 2556. "การระบุเพศและความหลากหลายทางพันธุกรรมในนกสกุล *Charadrius* โดยใช้ยีน *CHD*." *Thai Journal of Genetics*. 6(2) : 141-149.

ตวงรัตน์ โพธิ์เที่ยง. 2554. "การสำรวจและเฝ้าระวังการแพร่ระบาดของโรคไข้หวัดนกในนกธรรมชาติ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2553." หน้า 169-178. ใน **ผลงานวิจัย และรายงานความก้าวหน้างานวิจัย ประจำปี 2553**. กลุ่มงานวิจัยสัตว์ป่า สำนักอนุรักษ์สัตว์ป่า กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช. กรุงเทพฯ.

ตวงรัตน์ โพธิ์เที่ยง และสุมาลี ชัยพรรถพานิช. 2541. "การแพร่กระจายและประชากรของนกนางแอ่นบ้านในประเทศไทย." หน้า 4-19. ใน **ผลงานวิจัย และรายงานความก้าวหน้างานวิจัย**. ส่วนวิจัยสัตว์ป่า สำนักวิชาการป่าไม้ กรมป่าไม้. กรุงเทพฯ.

ธนากร ฤทธิ์ไธสง. 2546. **นกเลี้ยงสวยงาม.** พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์บริษัท ก.พล (1996) จำกัด.

นิตยา เลาหะจินดา. 2539. **วิวัฒนาการของสัตว์**. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : รั้วเขียว. หน้า 80-89.

รุ่งโรจน์ จุกมงคล. 2542. **นก**. กรุงเทพฯ : สารคดี. หน้า 40-43.

รุ่งโรจน์ จุกมงคล. 2553. **Thailand bird guide**. กรุงเทพฯ : สารคดี หน้า 326-327.

วรกมล แน่นอุดร. 2553. "ความแปรผันของไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอตำแหน่ง 8271-8873 ในการถ่ายทอดพันธุกรรมฝ่ายแม่." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร.

สุธี ศุภรัฐวิกร. 2539. **ชีวิตนกจากบันทึกและความทรงจำ.** กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์ Photo & life. หน้า 333-341.

สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม ณิชาภัทร ชอบอาภรณ์ ตฤณเศรษฐ์ วีระพันธุ์ นาถสุดา พุทธารักษ์ และอนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม. 2555. "การระบุเพศในนกแก้วบางชนิด." *Thai Journal of Genetics*. 5 : 94-202.

สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม เกษรา คงกล้า ณัฐกุล ถิ่นหัวเตย ธัญลักษณ์ มาลัยทัศน์ และไกรรัตน์ เอี่ยมอำไพ. 2558. "ความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกปรอดหัวโขน และการระบุเพศ." หน้า 184-189. ใน **การประชุมวิชาการพันธุศาสตร์แห่งชาติครั้งที่ 19**. ขอนแก่น : โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

สมชาย นิ่มนวล ตวงรัตน์ โพธิ์เที่ยง ไกรรัตน์ เอี่ยมอำไพ ศิริพร ทองอารีย์ ฑิฐิ สอนสา วัลยา ไชยภักดี และฟิลลิป ดี ราวด์. 2554. "การศึกษาเส้นทางการอพยพของนกชายเลนด้วยวิธีการติดเครื่องหมายธงสีในประเทศไทย." *Wildlife Yearbook*. 12 : 138-147.

สมิทธิ์ สุติบุตร์. 2547. **นกสวน-นกเมือง.** กรุงเทพ : บ้านและสวน. หน้า 122-123.

โอภาส ขอบเขตต์. 2542. **นกในเมืองไทย.** เล่มที่ 2. กรุงเทพฯ : สารคดี. หน้า 107-108.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Boncoraglio, G. Martinelli, R. and Saino, N. 2008. "Sex-related asymmetry in competitive ability of sexually monomorphic Barn Swallow nestlings." *Behavioral Ecology and Sociobiology*. 62 : 729-738.

Bone, J.F. 1988. **Animal anatomy and physiology**. 3rd ed. New Jersey : Prentice-Hall Inc. No 572.

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

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

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

Cotton, P.A. 2003. "Avian migration phenology and global climate change." *School of Biological Sciences*. 100(21) : 12219-12222.

De Marchi, G. Fasola, M. Chiozzi, G. Bellati, A. and Galeotti, P. 2012. "Sex discrimination of crab plovers (*Dromas ardeola*) by morphometric traits." *Water birds*. 35(2) : 332-337.

Dickinson, E.C. and Dekker, R.W.R.J. 2001. "Systematic notes on Asian birds 13 a preliminary review of the Hirundinidae." *Zoologische Verhandelingen Leiden*. 335 : 127-144.

Dillon, L.S. 1973. **Evolution : concept and consequence**. Saint Louis : The C.V. Mosby Company. No 319.

Ding, Z. Ji, F. Huang, Q. Wang, L. Jiang, A. Zhang, C. Feng, Y. Tian, Y. Hu, H. and Liang, W. 2017. "Brood sex ratio in the Yellow-bellied Prinia (*Prinia flaviventris*)." *Avian Research*. 8 : 15.

Dor, R. Safran, R.J. Sheldon, F.H. Winkler, D.W. and Lovette, I.J. 2010. "Phylogeny of the genus *Hirundo* and the Barn Swallow subspecies complex." *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 56 : 409-418.

Dor, R. Safran, R. J. Vortman, Y. Lotem, A. Mcgowan, A.Evans, M.R. and Lovette I.J. 2011. "Population genetics and morphological comparisons of migratory European (*Hirundo rustica rustica*) and sedentary East-Mediterranean (*Hirundo rustica transitiva*) Barn Swallows." *Journal of Heredity*. 103(1) : 55-63.

Duijns, S. Dijk, J.G. Kraus, R.H. Mateman, C. Brink, B. and Hooft, P. 2011. "An addition field method to sex adult Barn Swallows during the non-breeding season in Zambia: white spot length in the outer tail feather." *Ostrich*. 82 : 129-133.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Ellegren, H. 1996. "First gene on the avian W chromosome (*CHD*) provides a tag for universal sexing of non-ratite birds." *Proceedings of the Royal Society of London Series B Biological Sciences*. 263 : 1635-1641.

Ellegren, H. and Sheldon, B. 1997. "New tools for sex identification and the study of sex allocation in birds." *Trends in Ecology and Evolution* 12 : 255-259.

Ericsona, G.P. and Johansson, S. 2003. "Phylogeny of Passerida (Aves: Passeriformes) based on nuclear and mitochondrial sequence data." Molecular *Phylogenetics and Evolution*. 29 : 126-138.

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

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

Ghorpade, P.B. Gupta, P.K. Prakash, V. Cuthbert, R.J. Kulkarni,M. Prakash, N. Das, A. Sharma, A.K. and Saini, M. 2012. "Molecular sexing of threatened *Gyps vultures*: an important strategy for conservation breeding and ecological studies." *Springer Open Journal*. 62 : 1-12.

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

Griffiths, R. Daan, S. and Dijkstra, C. 1996. "Sex identification in birds using two *CHD* genes Proc." *Royal Society Biological Sciences*. 263 : 1251-1256.

Griffiths, R. and Korn, R.M. 1997. "A *CHD1* gene is Z chromosome linked in the chicken *Gallus domesticus*." *Gene*. 197 : 225-229.

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

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

Guerrini, M. Gennai, C. Panayides, P. Crabtree, A. Zuberogoitia, I. Copland, A.S. Babushkina, O. Politi, P.M. Giunchi, D. and Barbanera, F. 2014. "Large-scale patterns of genetic variation in a female-biased dispersing passerine: the Importance of sex-based analyses." *Plos one*. 9(6) : 1-14.

Hasegawa, M. Arai, E. Watanabe, M. and Nakamura, M. 2010. "Mating advantage of multiple male ornaments in the Barn Swallow (*Hirundo rustica gutturalis*)." *Ornithological Science*. 9 : 141-148.

Hasegawa, M. and Arai, E. 2017. "Natural selection on wing and tail morphology in the Pacific Swallow." *Journal of Ornithology*. 10 : 1-8.

Hatzofe, O. and Getreide, S. 1990. "Sex determination in vultures and other monomorphic raptors." *Torgos*. 8 : 27-29.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Hebert, PD.N. Stoeckle, M.Y. Zemlak, T.S. and Francis, C.M. 2004. "Identification of birds through DNA barcodes." *Plos Biology*. 2 : 312.

Hermosell, I.G. Balbontín, J. Marzal, A. Reviriego, M. and De Lope, F. 2007. "Sex determination in Barn Swallows *Hirundo rustica* by means of discriminant analysis in two European populations." *Ardeola*. 54 : 93-100.

Hirschenhauser, K. Mostl, E. and Kotrschal, K. 1999. "Seasonal patterns of sex steroids determined from feces in different social categories of Greylag Goose (*Anser anser*)." *General and Comparative Endocrinology*. 114 : 67-79.

Humphrey, S.R. and Bain, J.R. 1990. **Endangered animals of Thailand**. Gainesville Florida : Sandhill Crane Press. 6.

Jensen, T. Pernasetti, F.M. and Durrant, B. 2003. "Conditions for rapid sex determination in 47 avian species by PCR of genomic DNA from blood, shell-membrane blood vessels and feathers." *Zoo Biology*. 22 : 561-567.

Kahn, N.W. St John, J. and Quinn, T.W. 1998. "Chromosome-specific intron size differences in the avian *CHD* gene provide a simple and efficient method for sexing birds." *Auk*. 115 : 1074-1078.

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

Kleven, O. Jacobsen, F. Izadnegahdar, R. Robertson, R.J. and Lifjeld, J.T. 2006. "Male tail streamer length predicts fertilization success in the North American Barn Swallow (*Hirundo rustica erythrogaster*)." *Behavioral Ecology and Sociobiology*. 59 : 412-418.

Kose, M. Mand, R. and Møller, A.P. 1999. "Sexual selection for white tail spots in the Barn Swallow in relation to habitat choice by feather lice." *Animal Behavior*. 58 : 1201-1205.

Kose, M. and Møller, A.P. 1999. "Sexual selection feather breakage and parasites: the importance of white spots in the tail of the Barn Swallow (*Hirundo rustica*) behavioral." *Ecology and Sociobiology*. 45 : 430-436.

Kulaszewicz, I. Jakubas, D.and Wojczulanis-Jakubas, M. 2013. "Sex discrimination in Savi's Waebler (*Locustella luscinioides*) using morphometric traits." *Ornis Fennica*. 90 : 203-210.

Lovette, I.J. and Rubenstein, D.R. 2007. "A comprehensive molecular phylogeny of the starlings (Aves: Sturnidae) and mockingbirds (Aves: Mimidae): congruent mtDNA and nuclear trees for a cosmopolitan avian radiation." *Molecular. Phylogenetic Evolution*. 44 : 1031-1056.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Malago Jr, W. Heitor, M.F. Matheucci Jr, E. Medaglia, A. and Henrique-solva, F. 2002. "Large scale sex typing of ostriches using DNA extracted from feathers." *BMC Biotechnology*. 2 : 19.

Malaitad, T. Poeaim, S. and Eiamampai, K. 2015. "Sex identification in Barn Swallows (*Hirundo rustica* Linnaeus) by molecular technique." *Journal of Agricultural Technology*. 11(8) : 2411-2418.

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

Morinha, F. Cabral, J.A. and Bastos E. 2012. "Molecular sexing of birds: a comparative review of polymerase chain reaction (PCR)-based methods." *Theriogenology*. 78 : 703-714.

Owen, J.C. 2011. "Collecting, processing, and storing avian blood: a review." *Journal Field Ornithol*. 82(4) : 339-354.

Pagani-Nunez, E. He, C. Li, B. Li, M. He, R. Jiang, A. and Goodale, E. 2016. "The breeding ecology of the Barn Swallow (*Hirundo rustica gutturalis)* in South China." *Journal of Tropical Ecology*. 32 : 260-263.

Poeaim, S. Chobarporn, N. Eiamampai, K. Nimnuan, S. and Sornsa, T. 2014. "Gender identification in some Plover using *CHD* gene." *International Journal of Arts and Sciences*. 07(02) : 567-572.

Rai, S. Saini, P. and Jain, A.K. 2014. "Model for prediction of dropout student using ID3 decision tree algorithm." *International Journal of Advanced Research in Computer Science and Technology*. 2(1) : 142-146.

Ralph, C.J. G.R. Geupel, P. Pyle, T.E. Martin, and Desante, D.F. 1993. **Handbook of field methods for monitoring landbirds**. Gen. Tech. Rep.PSW-GTR-144. Albany, CA: Pacific Southwest Research Station, Forest Service, U.S. : Department of Agriculture. 1-41.

Richner, H. 1989. "Avian laparoscopy as a field technique for sexing birds and an assessment of its effects on wild birds." *Journal Field Ornithol* 60(2) : 137-142.

Sacchi, P. Soglia, D. Maione, S. Menequz, G. Campora, M. and Rasero, R. 2004. "A non-invasive test for sex identification in short-toed eagle (*Circaetus gallicus*)." *Molecular cell probes*. 18(3) : 193-196.

Saino, N. Ellegren, H. and Møller, A.P. 1999. "No evidence for adjustment of sex allocation in relation to paternal ornamentation and paternity in Barn Swallows." *Molecular Ecology*. 8 : 399-406.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Saino, N. Ambrosini, R. Martinelli, R. Calza, S. Møller, A.P. and Pilastro, A. 2002. "Offspring sexual dimorphism and sex-allocation in relation to parental age and paternal ornamentation in the Barn Swallow." *Molecular Ecology*. 11 : 1533-1544.

Sarah, R.P. 2007. **Sexual selection of ultraviolet and structural colour signals.** United States : Science Publishers. No 1-40.

Scordato, E.S.C. Wilkins, M.R. Semenov, G. Rubtsov, A.S. Kane, N.C. and Safran, R.J. 2017. "Genomic variation across two Barn Swallow hybrid zones reveals traits associated with divergence in sympatry and allopatry." *Molecular Ecology*. 126 : 153-162.

Sheldon, F.H. Whittingham, L.A. Moyle, R.G. Slikas, B. and Winkler D.W. 2005. Phylogeny of Swallows (Aves: Hirundinidae) estimated from nuclear and mitrochondrial DNA sequences." *Molecular Phylogenetics and Evolution.* 35 : 254-270.

Smith, H. Cracken, J. M.C. Shepherd, D. and Velez, P. 1997. **The Mist Netter's Bird Safety Handbook.** Canada : The Institute for Bird Populations. No 6-30.

Spotswood, E.N. Goodman, K.R. Carlisle, J. Cormier, R.L. Humple, D.L. Rousseau, J. Guers,S.L. and Barton, G.G. 2011. "How safe is mist netting evaluating the risk of injury and mortality to birds." *Ecology and Evalution*. 3(1) : 29-38.

Steiner, G. Preusse, G. Zimmerer, C. Elisabeth, M. Krautwald, J. Sablinskas, V. Fuhrmann, H. Koch, E and Bartels T. 2016. "Label free molecular sexing of monomorphic birds using infrared spectroscopic imaging." *Talanta*. 150 : 155-161.

Turner, A. 2004. "Family Hirundinidae (Swallows and martins)." *The Birds of the World*. vol. 9 : 602-685.

Wang, L.C. Severinghaus, L.L. Chen, C.T. Liu, L.Y. Pan, C.H. Huang, D. Lee, H.Y. Lir, J.T. Chin, S.C. Pu, C.E. and Wang, C.H. 2007. "Sexing a wider range of avian species based on two *CHD*1 introns with a unified reaction condition." *Zoo biology*. 26 : 425-431.

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

Weissmann, A. Reitemeier, S. Hahn, A. Gottschalk, J. and Einspanier, A. 2013. "Sexing domestic chicken before hatch: A new method for in ovo gender Identification." *Theriogenology*. 80 : 199-205.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Wilkins, M.R. Karaardic, H. Vortman, Y. Parchman, T.L. Albrecht, T. Petrzelkova, A özkan, L. Pap, P. Hubbard, J.K. Hund, A. and Safran, R.J. 2016. "Phenotypic differentiation is associated with divergent sexual selection among closely related Barn Swallow populations." *Journal of Evolutionary Biology*. 29(12) : 2410-2421.

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

Zink, R.M. Pavlova, A. Rohwer, S. and Drovetski, S.V. 2006. "Barn Swallows before barns: population histories and intercontinental colonization" *Proceedings Biological Sciences*. 273(1591) : 1245-51.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

ข้อมูลตัวอย่างนกนางแอ่นบ้าน

ตารางภาคผนวกที่ ก-1 ตัวอย่างนกนางแอ่นบ้านฤดูอพยพที่ 2 ดักจับวันที่ 22-23 ธันวาคม 2558

รหัสห่วงขา	รหัสทดลอง	ระบุเพศด้วยเทคนิคทางโมเลกุล	น้ำหนัก (g)	ความยาวปาก (mm)	ความยาวหัวถึงปาก (mm)	ความยาวปีก (mm)	ความยาวหน้าแข้ง (mm)	ความยาวขนหางคู่นอก (mm)	ความยาวขนหางคู่ใน (mm)	ความเว้าลึกของขนหาง (mm)	ความยาวจุดแต้มขาวบนขนหางคู่นอก (mm)	พื้นที่ของจุดแต้มขาวบนขนหางคู่นอก (mm^2)	สีขนบริเวณอก
2A80801	NBS01	เมีย	14	11	29.4	117	11	81	44	37	16.5	14.5	ค
2A80802	NBS02	เมีย	13.5	11.5	28.7	115	10	62	42	20	13.5	6	จ
2A80803	NBS03	ผู้	14.7	10.8	28.7	112	10	98	56	42	21.5	11.5	ก
2A80804	NBS04	ผู้	14.6	12	27.8	120	10	99	43	56	28	13	จ
2A80805	NBS05	เมีย	15.2	11.7	29.1	116	11	78	46	32	20	14	ก
2A80806	NBS06	เมีย	15.2	11	29	115	11	90	44	46	20.5	11	ข
2A80807	NBS07	เมีย	13.6	11.1	27.8	111	10	80	44	36	21	16.5	ก

หมายเหตุ:

ก : สีส้มเข้ม

ข : สีส้มปานกลาง

ค : อกสีส้มอ่อนปลายหางสีส้มเข้ม

ง : สีส้มอ่อน

จ : สีขาว

- : ไม่มีข้อมูล

NA : ไม่สามารถระบุเพศ

BS : ตัวอย่างจากถนนสีลม กรุงเทพฯ

NBS : ตัวอย่างจากอำเภอปัว จังหวัดน่าน

(**ที่มา**: ข้อมูลรหัสห่วงขาและลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้รับความอนุเคราะห์จากสถานีวิจัยสัตว์ป่าบึงบอระเพ็ด)

ตารางภาคผนวกที่ ก-1 (ต่อ)

รหัสห่วงขา	รหัสทดลอง	ระบุเพศด้วยเทคนิคทางโมเลกุล	น้ำหนัก (g)	ความยาวปาก (mm)	ความยาวหัวถึงปาก (mm)	ความยาวปีก (mm)	ความยาวหน้าแข้ง (mm)	ความยาวขนหางคู่นอก (mm)	ความยาวขนหางคู่ใน (mm)	ความเว้าลึกของขนหาง (mm)	ความยาวจุดแต้มขาวบนขนหางคู่นอก (mm)	พื้นที่ของจุดแต้มขาวบนขนหางคู่นอก (mm^2)	สีขนบริเวณอก
2A80808	NBS08	ผู้	13.8	10.6	28.1	115	10	83	44	39	25	14	ง
2A80809	NBS09	ผู้	14.5	11.8	29.1	112	11	82	41	41	22.5	15.5	จ
2A80810	NBS10	ผู้	13	12.6	27.7	107	9.7	88	42	46	22	12	จ
2A80811	NBS11	เมีย	13.4	11.3	27.8	111	10	74	42	32	19.5	11	ง
2A80812	NBS12	เมีย	13.5	10.4	27	111	10	78	44	34	16	9	ค
2A80813	NBS13	ผู้	13.1	11.8	27.6	113	10	84	41	43	26.5	16	ง
2A80814	NBS14	เมีย	13.2	11.6	27.4	114	11	78	43	35	10.5	4.5	ง
2A80815	NBS15	เมีย	13.6	11.4	27.8	116	10	80	43	37	20	14	ง
2A80816	NBS16	เมีย	13.3	12	28.4	113	11	81	43	38	22	16	ค
2A80817	NBS17	เมีย	13.4	10.9	28.4	113	10	74	42	32	16	8.5	ง
2A80818	NBS18	ผู้	13.7	12.8	29.6	111	11	88	42	46	25.5	13.5	ข
2A57824	NBS19	ผู้	13.3	10.7	28.6	114	11	79	42	37	26.5	15	ง
2A80819	NBS20	เมีย	13.4	10.7	27.8	114	10	79	46	33	17	8.5	จ
2A80820	NBS21	เมีย	13.2	11.5	28	118	9.9	81	43	38	14	7	จ
2A80821	NBS22	ผู้	14	11.4	28.9	113	9.9	97	42	55	31.5	13.5	จ
2A80822	NBS23	เมีย	15.2	11.2	29.2	113	11	72	43	29	19	10.5	จ

(**ที่มา**: ข้อมูลรหัสห่วงขาและลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้รับความอนุเคราะห์จากสถานีวิจัยสัตว์ป่าบึงบอระเพ็ด)

ตารางภาคผนวกที่ ก-1 (ต่อ)

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

(**ที่มา**: ข้อมูลรหัสห่วงขาและลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้รับความอนุเคราะห์จากสถานีวิจัยสัตว์ป่าบึงบอระเพ็ด)

ตารางภาคผนวกที่ ก-1 (ต่อ)

รหัสห่วงขา	รหัสทดลอง	ระบุเพศด้วยเทคนิคทางโมเลกุล	น้ำหนัก (g)	ความยาวปาก (mm)	ความยาวหัวถึงปาก (mm)	ความยาวปีก (mm)	ความยาวหน้าแข้ง (mm)	ความยาวขนหางคู่นอก (mm)	ความยาวขนหางคู่ใน (mm)	ความเว้าลึกของขนหาง (mm)	ความยาวจุดแต้มขาวบนขนหางคู่นอก (mm)	พื้นที่ของจุดแต้มขาวบนขนหางคู่นอก (mm^2)	สีขนบริเวณอก
2A80839	NBS40	ผู้	13.9	11.3	28.7	122	11	94	45	49	21.5	12.5	จ
2A80840	NBS41	เมีย	14.4	11	28	114	11	93	46	47	25.5	13	จ
2A80841	NBS42	ผู้	13.5	11.3	27.6	114	9.7	94	43	51	13.5	10	จ
2A80842	NBS43	เมีย	14.3	12.2	29	118	10	90	46	44	22	11.5	จ
2A80843	NBS44	ผู้	14.4	12.1	29.7	114	10	76	42	34	20.5	12	ง
2A80844	NBS45	เมีย	13.9	11.6	28.9	117	11	96	47	49	26	17	ก
2A80845	NBS46	ผู้	14.6	12.5	29.7	113	11	84	42	42	25	14	ง
2A80846	NBS47	ผู้	14.6	11.9	28.6	114	11	105	46	59	35	22	ข
2A80847	NBS48	เมีย	13.4	12.2	29	116	11	82	44	38	20.5	13	ค
2A80848	NBS49	ผู้	14.8	11.2	29.3	118	11	88	42	46	32	17.5	จ
2A80849	NBS50	ผู้	14.5	11.4	28.7	118	11	96	41	55	29	21	ข
2A80850	NBS51	เมีย	14.1	11.4	27.8	114	11	77	42	35	13	7.5	ข
2A80851	NBS52	เมีย	13.7	11.5	29.2	111	11	78	42	36	16	9.5	จ
2A80852	NBS53	ผู้	13.6	12.3	29.3	119	10	100	43	57	25.5	12.5	ก
2A80853	NBS54	เมีย	14.2	11.5	28.8	117	12	79	44	35	18	11.5	ค
2A80854	NBS55	เมีย	13.4	11	28.8	115	11	76	43	33	17	9.5	จ

(**ที่มา**: ข้อมูลรหัสห่วงขาและลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้รับความอนุเคราะห์จากสถานีวิจัยสัตว์ป่าบึงบอระเพ็ด)

ตารางภาคผนวกที่ ก-1 (ต่อ)

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

(**ที่มา**: ข้อมูลรหัสห่วงขาและลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้รับความอนุเคราะห์จากสถานีวิจัยสัตว์ป่าบึงบอระเพ็ด)

ตารางภาคผนวกที่ ก-1 (ต่อ)

รหัสห่วงขา	รหัสทดลอง	ระบุเพศด้วยเทคนิคทางโมเลกุล	น้ำหนัก (g)	ความยาวปาก (mm)	ความยาวหัวถึงปาก (mm)	ความยาวปีก (mm)	ความยาวหน้าแข้ง (mm)	ความยาวขนหางคู่นอก (mm)	ความยาวขนหางคู่ใน (mm)	ความเว้าลึกของขนหาง (mm)	ความยาวจุดแต้มขาวบนขนหางคู่นอก (mm)	พื้นที่ของจุดแต้มขาวบนขนหางคู่นอก (mm^2)	สีขนบริเวณอก
2A81601	NBS72	เมีย	14.6	12.1	28.2	117	10	77	46	31	19.5	8	ง
2A81602	NBS73	เมีย	16.6	12.5	28.7	115	11	82	47	35	13.5	5.5	ง
2A81603	NBS74	ผู้	15.5	12.2	28.9	115	9.8	90	41	49	29.5	19.5	ข
2A81604	NBS75	เมีย	14.7	11.6	28.4	114	10	73	45	28	21	9.5	จ
2A81605	NBS76	ผู้	15.2	11.6	28.1	ผลัดขนปีก	11	83	42	41	21.5	13	ค
2A81606	NBS77	เมีย	15.5	12.1	28.8	112	11	74	42	32	21.5	10	จ
2A81607	NBS78	ผู้	15.4	12.5	28.6	115	10	80	42	38	21	14	จ
2A81608	NBS79	เมีย	15.7	12	28.4	112	11	74	41	33	18	10	จ
2A81609	NBS80	ผู้	15.8	12.3	29	116	11	84	42	42	23.5	15.5	ค
2A81610	NBS81	ผู้	15.7	12.3	28.5	117	11	83	43	40	24	17.5	จ
2A81611	NBS82	ผู้	14.8	12	28.2	115	11	86	42	44	25	12.5	ง
2A81612	NBS83	NA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2A81613	NBS84	เมีย	15	11.9	28.5	116	11	76	44	32	10.5	5.5	จ
2A81614	NBS85	เมีย	13.5	11.3	27.6	113	10	86	43	43	14	7.5	ง
2A81615	NBS86	เมีย	15.3	12	28.6	114	11	76	43	33	19.5	14.5	จ
2A81616	NBS87	เมีย	15.9	11.1	28.4	117	9.9	82	44	38	17	10.5	ง

(**ที่มา**: ข้อมูลรหัสห่วงขาและลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้รับความอนุเคราะห์จากสถานีวิจัยสัตว์ป่าบึงบอระเพ็ด)

ตารางภาคผนวกที่ ก-1 (ต่อ)

รหัสห่วงขา	รหัสทดลอง	ระบุเพศด้วยเทคนิคทางโมเลกุล	น้ำหนัก (g)	ความยาวปาก (mm)	ความยาวหัวถึงปาก (mm)	ความยาวปีก (mm)	ความยาวหน้าแข้ง (mm)	ความยาวขนหางคู่นอก (mm)	ความยาวขนหางคู่ใน (mm)	ความเว้าลึกของขนหาง (mm)	ความยาวจุดแต้มขาวบนขนหางคู่นอก (mm)	พื้นที่ของจุดแต้มขาวบนขนหางคู่นอก (mm^2)	สีขนบริเวณอก
2A81617	NBS88	ผู้	15.1	12.7	28.6	114	10	93	42	51	24.5	15.5	ง
2A81618	NBS89	เมีย	14.2	11.6	28	113	11	75	42	33	9	5.5	จ
2A81619	NBS90	เมีย	14.6	12.3	27.8	117	11	77	41	36	14	7	ง
2A81620	NBS91	ผู้	15	11.5	28.4	ผลัดขนปีก	9.9	81	42	39	27	15	ง
2A81621	NBS92	เมีย	15.4	12.7	28	123	11	76	44	32	17	9	ก
2A81622	NBS93	เมีย	14.7	12.5	29.1	114	11	79	41	38	17.5	12.5	ข
2A81623	NBS94	เมีย	13.6	12.1	27.8	ผลัดขนปีก	10	67	44	23	16.5	7.5	ค
2A81624	NBS95	เมีย	15.7	13	29.8	115	11	80	44	36	18	12.5	ง
2A81625	NBS96	เมีย	14.6	10.8	27.7	118	11	98	45	53	24	14.5	ง
2A81626	NBS97	เมีย	15.7	11.7	28.6	113	11	71	42	29	15	9.5	จ
2A81627	NBS98	เมีย	15.1	12.5	29.6	ผลัดขนปีก	11	73	43	30	18	10.5	ค
2A81628	NBS99	เมีย	15	11.6	28.4	116	10	81	43	38	20.5	9.5	จ
2A81629	NBS100	เมีย	15	12.6	29.1	110	11	68	40	28	18	13	จ
2A81630	NBS101	ผู้	14	12.2	28.9	113	11	70	42	28	18	14	จ
2A81631	NBS102	เมีย	15.8	12.1	29.5	119	11	78	45	33	18	10.5	ง
2A81632	NBS103	เมีย	15	12.2	28.3	116	11	78	45	33	16	9.5	ข

(**ที่มา**: ข้อมูลรหัสห่วงขาและลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้รับความอนุเคราะห์จากสถานีวิจัยสัตว์ป่าบึงบอระเพ็ด)

ตารางภาคผนวกที่ ก-1 (ต่อ)

รหัสห่วงขา	รหัสทดลอง	ระบุเพศด้วยเทคนิคทางโมเลกุล	น้ำหนัก (g)	ความยาวปาก (mm)	ความยาวหัวถึงปาก (mm)	ความยาวปีก (mm)	ความยาวหน้าแข้ง (mm)	ความยาวขนหางคู่นอก (mm)	ความยาวขนหางคู่ใน (mm)	ความเว้าลึกของขนหาง (mm)	ความยาวจุดแต้มขาวบนขนหางคู่นอก (mm)	พื้นที่ของจุดแต้มขาวบนขนหางคู่นอก (mm^2)	สีขนบริเวณอก
2A81633	NBS104	ผู้	14.8	11.5	28.4	116	11	87	41	46	30.5	21.5	ง
2A81634	NBS105	ผู้	16	11.9	27.9	117	11	96	44	52	21.5	12	จ
2A81635	NBS106	ผู้	15.4	11.5	28.8	114	11	100	42	58	26	19.5	จ
2A81636	NBS107	ผู้	14	11.8	28.4	111	10	91	41	50	30.5	19	ง
2A81637	NBS108	ผู้	13.8	11.6	28	114	10	91	41	50	28	15.5	ข
2A81638	NBS109	เมีย	13.9	12.3	28.7	117	10	76	42	34	17	8	ข
2A81639	NBS110	เมีย	15.4	11.6	28	114	11	72	43	29	20	13	จ
2A81640	NBS111	ผู้	15.7	12.9	29.1	120	11	95	45	50	23.5	12	ง
2A81641	NBS112	เมีย	16	12.2	28.3	116	10	82	43	39	18	10	จ
2A81642	NBS113	เมีย	15	11.9	28.3	116	10	70	41	29	13.5	7	จ
2A81643	NBS114	ผู้	15.6	13.2	29.6	114	10	74	42	32	26	13	ข
2A81644	NBS115	เมีย	13.9	11.9	28	114	10	76	44	32	14	6.5	จ
2A81645	NBS116	ผู้	14.7	11.4	28.2	112	10	62	43	19	13.5	6	ง
2A81646	NBS117	ผู้	15.9	12.1	28.7	112	10	80	43	37	21	13.5	ง
2A81647	NBS118	ผู้	14.9	11.5	28.5	119	10	108	45	63	35	19.5	ง
2A81648	NBS119	ผู้	15.2	10.8	28.7	117	10	103	45	58	26	17	ข
2A81649	NBS120	เมีย	14.9	12	28.7	116	10	82	46	36	15	9	ง

(**ที่มา**: ข้อมูลรหัสห่วงขาและลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้รับความอนุเคราะห์จากสถานีวิจัยสัตว์ป่าบึงบอระเพ็ด)

ตารางภาคผนวกที่ ก-2 ตัวอย่างฤดูอพยพที่ 2 ดักจับวันที่ 11 มกราคม 2559

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

(**ที่มา**: ข้อมูลรหัสห่วงขาและลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้รับความอนุเคราะห์จากสถานีวิจัยสัตว์ป่าบึงบอระเพ็ด)

ตารางภาคผนวกที่ ก-2 (ต่อ)

รหัสห่วงขา	รหัสทดลอง	ระบุเพศด้วยเทคนิคทางโมเลกุล	น้ำหนัก (g)	ความยาวปาก (mm)	ความยาวหัวถึงปาก (mm)	ความยาวปีก (mm)	ความยาวหน้าแข้ง (mm)	ความยาวขนหางคู่นอก (mm)	ความยาวขนหางคู่ใน (mm)	ความเว้าลึกของขนหาง (mm)	ความยาวจุดแต้มขาวบนขนหางคู่นอก (mm)	พื้นที่ของจุดแต้มขาวบนขนหางคู่นอก (mm^2)	สีขนบริเวณอก
2A42517	BS78	ผู้	15.6	11.8	28.7	121	11	86	42	44	30.5	13	ข
2A42518	BS79	ผู้	13.7	11.7	28.9	115	10.3	72	44	28	22.5	8.5	ข
2A42519	BS80	ผู้	14	12	28.8	112	9.9	98	41	57	27.5	14	ง
2A42520	BS81	ผู้	14.7	11.8	29.1	ผลัดขนปีก	10.1	109	44	65	20	10	ง
2A42521	BS82	ผู้	14.8	12	28.5	108	10.1	79	40	39	19.5	9	ข
2A42522	BS83	ผู้	16	12.4	29.7	119	10.7	101	48	53	33	21	ง
2A42523	BS84	เมีย	13.3	12.2	29.1	112	9.8	76	43	33	26.5	8.5	จ
2A42524	BS85	เมีย	14.5	12.5	28.9	115	10.8	76	46	30	16.5	5.5	ง
2A42525	BS86	ผู้	14	11.7	29.4	13	10.8	90	42	48	30	7	ข
2A38848	BS87	ผู้	14.3	12	29	113	10.5	88	44	44	13	4.5	จ
2A42526	BS88	ผู้	13.8	12.1	29	112	9.8	78	41	37	17	5	ง
2A42527	BS89	เมีย	14.4	11.5	28.8	114	10.1	84	44	40	12.5	4.5	ง
2A42528	BS90	เมีย	14.2	12.1	29.3	115	10.9	88	43	45	16	6	ข
2A83611	BS91	ผู้	15.3	12	28.8	118	10.2	103	41	62	27	6	ง

(**ที่มา**: ข้อมูลรหัสห่วงขาและลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้รับความอนุเคราะห์จากสถานีวิจัยสัตว์ป่าบึงบอระเพ็ด)

ตารางภาคผนวกที่ ก-3 ตัวอย่างนกนางแอ่นบ้านฤดูอพยพที่ 3 ดักจับวันที่ 20-21 ธันวาคม 2559

รหัสห่วงขา	รหัสทดลอง	ระบุเพศด้วยเทคนิคทางโมเลกุล	น้ำหนัก (g)	ความยาวปาก (mm)	ความยาวหัวถึงปาก (mm)	ความยาวปีก (mm)	ความยาวหน้าแข้ง (mm)	ความยาวขนหางคู่นอก (mm)	ความยาวขนหางคู่ใน (mm)	ความเว้าลึกของขนหาง (mm)	ความยาวจุดแต้มขาวบนขนหางคู่นอก (mm)	พื้นที่ของจุดแต้มขาวบนขนหางคู่นอก (mm^2)	สีขนบริเวณอก
2A48061	NBS121	ผู้	-	-	-	-	-	103	42	72.5	28.5	-	-
2A48062	NBS122	ผู้	-	-	-	-	-	85	41	63	22.5	-	-
2A48063	NBS123	ผู้	-	-	-	-	-	101	42	71.5	31.5	-	-
2A48064	NBS124	เมีย	-	-	-	-	-	78	43	60.5	19	-	จ
2A57947	NBS125	เมีย	-	-	-	-	-	85	41	63	19.5	-	จ
2A48065	NBS126	ผู้	-	-	-	-	-	99	42	70.5	27.5	-	ง
2A48066	NBS127	เมีย	-	-	-	-	-	77	45	61	19	-	ง
2A48067	NBS128	ผู้	-	-	-	-	-	81	45	63	26.5	-	ง
2A48068	NBS129	เมีย	-	-	-	-	-	76	44	60	15	-	จ
2A48069	NBS130	ผู้	-	-	-	-	-	97	43	70	20	-	ข
2A48070	NBS131	เมีย	-	-	-	-	-	70	42	56	14	-	ง
2A48071	NBS132	เมีย	-	-	-	-	-	75	46	60.5	14.5	-	ง
2A48072	NBS133	ผู้	-	-	-	-	-	96	42	69	21.5	-	จ
2A48073	NBS134	เมีย	-	-	-	-	-	73	43	58	13.5	-	ค
2A48074	NBS135	เมีย	-	-	-	-	-	74	43	58.5	18.5	-	ค
2A48075	NBS136	ผู้	-	-	-	-	-	107	45	76	25	-	ข

(**ที่มา**: ข้อมูลรหัสห่วงขาและลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้รับความอนุเคราะห์จากสถานีวิจัยสัตว์ป่าบึงบอระเพ็ด)

ตารางภาคผนวกที่ ก-3 (ต่อ)

รหัสห่วงขา	รหัสทดลอง	ระบุเพศด้วยเทคนิคทางโมเลกุล	น้ำหนัก (g)	ความยาวปาก (mm)	ความยาวหัวถึงปาก (mm)	ความยาวปีก (mm)	ความยาวหน้าแข้ง (mm)	ความยาวขนหางคู่นอก (mm)	ความยาวขนหางคู่ใน (mm)	ความเว้าลึกของขนหาง (mm)	ความยาวจุดแต้มขาวบนขนหางคู่นอก (mm)	พื้นที่ของจุดแต้มขาวบนขนหางคู่นอก (mm^2)	สีขนบริเวณอก
2A48076	NBS137	เมีย	-	-	-	-	-	83	44	63.5	15	-	ง
2A48077	NBS138	เมีย	-	-	-	-	-	76	42	59	22	-	ง
2A48078	NBS139	เมีย	-	-	-	-	-	82	46	64	21.5	-	จ
2A48079	NBS140	เมีย	-	-	-	-	-	70	42	56	18	-	จ
2A48080	NBS141	เมีย	-	-	-	-	-	87	43	65	20	-	ง
2A48081	NBS142	ผู้	-	-	-	-	-	92	39	65.5	27.5	-	ข
2A47569	NBS143	ผู้	-	-	-	-	-	104	42	73	29.5	-	ง
2A82898	NBS144	ผู้	-	-	-	-	-	90	43	66.5	20.5	-	ข
2A48082	NBS145	ผู้	-	-	-	-	-	96	43	69.5	25.5	-	ง
2A48083	NBS146	ผู้	-	-	-	-	-	79	39	59	24.5	-	ข
2A48084	NBS147	เมีย	-	-	-	-	-	79	45	62	20	-	ข
2A82897	NBS148	ผู้	-	-	-	-	-	88	42	65	19.5	-	ข
2A48085	NBS149	เมีย	-	-	-	-	-	78	43	60.5	23	-	ข
2A48086	NBS150	เมีย	-	-	-	-	-	87	48	67.5	19.5	-	จ
2A48087	NBS151	เมีย	-	-	-	-	-	87	44	65.5	19.5	-	จ
2A48088	NBS152	ผู้	-	-	-	-	-	86	45	65.5	30.5	-	ง

(**ที่มา**: ข้อมูลรหัสห่วงขาและลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้รับความอนุเคราะห์จากสถานีวิจัยสัตว์ป่าบึงบอระเพ็ด)

ตารางภาคผนวกที่ ก-3 (ต่อ)

รหัสห่วงขา	รหัสทดลอง	ระบุเพศด้วยเทคนิคทางโมเลกุล	น้ำหนัก (g)	ความยาวปาก (mm)	ความยาวหัวถึงปาก (mm)	ความยาวปีก (mm)	ความยาวหน้าแข้ง (mm)	ความยาวขนหางคู่นอก (mm)	ความยาวขนหางคู่ใน (mm)	ความเว้าลึกของขนหาง (mm)	ความยาวจุดแต้มขาวบนขนหางคู่นอก (mm)	พื้นที่ของจุดแต้มขาวบนขนหางคู่นอก (mm^2)	สีขนบริเวณอก
2A48089	NBS153	เมีย	-	-	-	-	-	85	43	64	19	-	ข
2A48090	NBS154	ผู้	-	-	-	-	-	76	43	59.5	29	-	ข
2A48091	NBS155	เมีย	-	-	-	-	-	70	42	56	17	-	ง
2A48092	NBS156	ผู้	-	-	-	-	-	104	42	73	36	-	ง
2A48093	NBS157	ผู้	-	-	-	-	-	104	43	73.5	22	-	ข
2A48094	NBS158	ผู้	-	-	-	-	-	103	43	73	23.5	-	ง
2A82894	NBS159	ผู้	-	-	-	-	-	88	43	65.5	27	-	ข
2A48095	NBS160	ผู้	-	-	-	-	-	94	44	69	22	-	ง
2A48096	NBS161	เมีย	-	-	-	-	-	74	43	58.5	18.5	-	ง
2A48097	NBS162	เมีย	-	-	-	-	-	79	44	61.5	19.5	-	ข
2A48098	NBS163	ผู้	-	-	-	-	-	91	42	66.5	21	-	ง
2A48099	NBS164	ผู้	-	-	-	-	-	85	43	64	19.5	-	ง
2A82737	NBS165	เมีย	-	-	-	-	-	90	44	67	17.5	-	ข
2A48100	NBS166	ผู้	-	-	-	-	-	89	44	66.5	19	-	จ
2A48701	NBS167	ผู้	-	-	-	-	-	96	41	68.5	25.5	-	จ
2A48702	NBS168	เมีย	-	-	-	-	-	78	44	61	16.5	-	จ

(**ที่มา**: ข้อมูลรหัสห่วงขาและลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้รับความอนุเคราะห์จากสถานีวิจัยสัตว์ป่าบึงบอระเพ็ด)

ตารางภาคผนวกที่ ก-3 (ต่อ)

รหัสห่วงขา	รหัสทดลอง	ระบุเพศด้วยเทคนิคทางโมเลกุล	น้ำหนัก (g)	ความยาวปาก (mm)	ความยาวหัวถึงปาก (mm)	ความยาวปีก (mm)	ความยาวหน้าแข้ง (mm)	ความยาวขนหางคู่นอก (mm)	ความยาวขนหางคู่ใน (mm)	ความเว้าลึกของขนหาง (mm)	ความยาวจุดแต้มขาวบนขนหางคู่นอก (mm)	พื้นที่ของจุดแต้มขาวบนขนหางคู่นอก (mm^2)	สีขนบริเวณอก
2A48703	NBS169	เมีย	-	-	-	-	-	80	44	62	18.5	-	ง
2A48704	NBS170	เมีย	-	-	-	-	-	87	42	64.5	15.5	-	ง
2A48705	NBS171	ผู้	-	-	-	-	-	86	45	65.5	29	-	ข
2A48706	NBS172	ผู้	-	-	-	-	-	81	52	66.5	29.5	-	ข
2A48707	NBS173	เมีย	-	-	-	-	-	80	45	62.5	16	-	จ
2A48708	NBS174	ผู้	-	-	-	-	-	96	41	68.5	32	-	ง
2A48709	NBS175	ผู้	-	-	-	-	-	83	41	62	19.5	-	ข
2A48710	NBS176	ผู้	-	-	-	-	-	90	42	66	22	-	จ
2A48711	NBS177	เมีย	-	-	-	-	-	82	46	64	17	-	ง
2A48712	NBS178	เมีย	-	-	-	-	-	73	44	58.5	18.5	-	จ
2A48713	NBS179	เมีย	-	-	-	-	-	78	46	62	13	-	จ
2A48714	NBS180	เมีย	-	-	-	-	-	75	45	60	16	-	ง
2A48715	NBS181	เมีย	-	-	-	-	-	78	44	61	19.5	-	ข
2A48716	NBS182	เมีย	-	-	-	-	-	77	44	60.5	20.5	-	จ
2A48717	NBS183	ผู้	-	-	-	-	-	86	44	65	27	-	ง
2A48718	NBS184	เมีย	-	-	-	-	-	77	43	60	15	-	จ

(**ที่มา**: ข้อมูลรหัสห่วงขาและลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้รับความอนุเคราะห์จากสถานีวิจัยสัตว์ป่าบึงบอระเพ็ด)

ตารางภาคผนวกที่ ก-3 (ต่อ)

รหัสห่วงขา	รหัสทดลอง	ระบุเพศด้วยเทคนิคทางโมเลกุล	น้ำหนัก (g)	ความยาวปาก (mm)	ความยาวหัวถึงปาก (mm)	ความยาวปีก (mm)	ความยาวหน้าแข้ง (mm)	ความยาวขนหางคู่นอก (mm)	ความยาวขนหางคู่ใน (mm)	ความเว้าลึกของขนหาง (mm)	ความยาวจุดแต้มขาวบนขนหางคู่นอก (mm)	พื้นที่ของจุดแต้มขาวบนขนหางคู่นอก (mm^2)	สีขนบริเวณอก
2A48719	NBS185	เมีย	-	-	-	-	-	73	41	57	15	-	จ
2A48720	NBS186	ผู้	-	-	-	-	-	85	43	64	17	-	ง
2A48721	NBS187	NA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2A48722	NBS188	ผู้	-	-	-	-	-	87	42	29.5	64.5	-	ง
2A81557	NBS189	เมีย	-	-	-	-	-	76	42	18.5	59	-	จ
2A48723	NBS190	ผู้	-	-	-	-	-	85	46	27.5	65.5	-	ง
2A48724	NBS191	NA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2A48725	NBS192	เมีย	-	-	-	-	-	73	42	18.5	57.5	-	ง

ตารางภาคผนวกที่ ก-4 ตัวอย่างนกนางแอ่นบ้านถูอพยพที่ 3 ดักจับวันที่ 23 มกราคม 2560

รหัสห่วงขา	รหัสทดลอง	ระบุเพศด้วยเทคนิคทางโมเลกุล	น้ำหนัก (g)	ความยาวปาก (mm)	ความยาวหัวถึงปาก (mm)	ความยาวปีก (mm)	ความยาวหน้าแข้ง (mm)	ความยาวขนหางคู่นอก (mm)	ความยาวขนหางคู่ใน (mm)	ความเว้าลึกของขนหาง (mm)	ความยาวจุดแต้มขาวบนขนหางคู่นอก (mm)	พื้นที่ของจุดแต้มขาวบนขนหางคู่นอก (mm^2)	สีขนบริเวณอก
2A51001	BS92	ผู้	-	-	-	-	-	96	53	32.5	43	-	ค
2A51002	BS93	ผู้	-	-	-	-	-	96	40	30.5	56	-	ข

(**ที่มา**: ข้อมูลรหัสห่วงขาและลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้รับความอนุเคราะห์จากสถานีวิจัยสัตว์ป่าบึงบอระเพ็ด)

ตารางภาคผนวกที่ ก-4 (ต่อ)

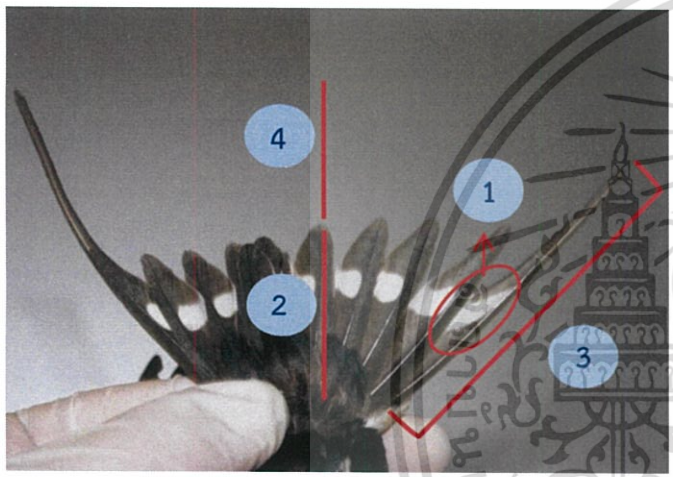
รหัสห่วงขา	รหัสทดลอง	ระบุเพศด้วยเทคนิคทางโมเลกุล	น้ำหนัก (g)	ความยาวปาก (mm)	ความยาวหัวถึงปาก (mm)	ความยาวปีก (mm)	ความยาวหน้าแข้ง (mm)	ความยาวขนหางคู่นอก (mm)	ความยาวขนหางคู่ใน (mm)	ความเว้าลึกของขนหาง (mm)	ความยาวจุดแต้มขาวบนขนหางคู่นอก (mm)	พื้นที่ของจุดแต้มขาวบนขนหางคู่นอก (mm^2)	สีขนบริเวณอก
2A51003	BS94	ผู้	-	-	-	-	-	80	40	24	40	-	ง
2A51004	BS95	ผู้	-	-	-	-	-	80	41	22.5	39	-	ข
2A51005	BS96	ผู้	-	-	-	-	-	110	40	27.5	70	-	ข
2A51006	BS97	ผู้	-	-	-	-	-	101	44	26.5	57	-	ข
2A51007	BS98	ผู้	-	-	-	-	-	90	40	24.5	50	-	ค
2A51008	BS99	ผู้	-	-	-	-	-	75	40	25	35	-	ข
2A51009	BS100	ผู้	-	-	-	-	-	97	40	27.5	57	-	ก
2A51010	BS101	ผู้	-	-	-	-	-	92	42	17	50	-	ก
2A51011	BS102	ผู้	-	-	-	-	-	89	41	31.5	48	-	ก
2A51146	BS103	ผู้	-	-	-	-	-	74	39	20	35	-	ข
2A51012	BS104	ผู้	-	-	-	-	-	82	43	23.5	39	-	จ
2A51013	BS105	ผู้	-	-	-	-	-	80	42	28	38	-	ก
2A51014	BS106	ผู้	-	-	-	-	-	61	43	9	18	-	ง
2A51015	BS107	ผู้	-	-	-	-	-	62	42	12	20	-	ง
2A51016	BS108	ผู้	-	-	-	-	-	90	42	21	48	-	ง

(**ที่มา**: ข้อมูลรหัสห่วงขาและลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้รับความอนุเคราะห์จากสถานีวิจัยสัตว์ป่าบึงบอระเพ็ด)

ภาคผนวก ข

คู่มือการระบุเพศนกนางแอ่นบ้านในประเทศไทย

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ใช้ในการระบุเพศ



ลำดับ	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ใช้ในการระบุเพศนกนางแอ่นบ้านทีละลักษณะ
1	ความยาวจุดแต้มขาวบนขนหางคู่นอก **เพศผู้ > 20.5 mm ≤ เพศเมีย**
2	ความยาวของขนหางคู่ใน
3	ความยาวของขนหางคู่นอก
4	(3 - 2) = ความเว้าลึกของขนหาง **เพศผู้ > 38.5 mm ≤ เพศเมีย**

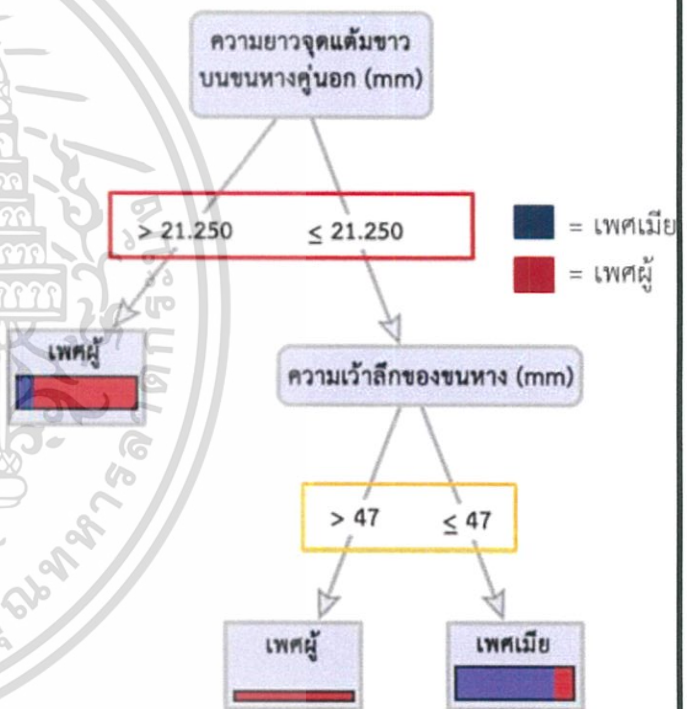
การวัด

ความยาวจุดแต้มขาว

ความยาวขนหางคู่ใน

ความยาวขนหางคู่นอก

การใช้ลักษณะความยาวจุดแต้มขาวบนขนหางคู่นอกร่วมกับความเว้าลึกของขนหาง



รูปภาคผนวกที่ ข: การระบุเพศนกนางแอ่นบ้านโดยใช้ลักษณะความยาวจุดแต้มขาวบนขนหางคู่นอกและหรือความเว้าลึกของขนหาง

ภาคผนวก ค
การเตรียมสารเคมี

1. การเตรียมสารละลาย

1.1 10X TBE buffer ปริมาตร 1000 ml

- ชั่ง Tris base จำนวน 108 g ชั่ง Boric acid จำนวน 61.83 g และชั่ง EDTA จำนวน 9.305 g นำสารที่ชั่งมาละลายน้ำกลั่นปริมาตร 500 ml ปรับ pH ให้เท่ากับ 8 แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1000 ml จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง Autoclave ความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

- ถ้าต้องการเตรียม 1XTBE buffer ปริมาตร 500 ml เพื่อใช้งาน ให้ดูดสารละลาย 10XTBE มา 50 ml แล้วใช้น้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 500 ml

1.2 0.5 M EDTA (PH 8) ปริมาตร 500 ml

- ชั่ง EDTA จำนวน 93.06 g เติมน้ำกลั่นปริมาตร 300 ผสมให้เข้ากันด้วย Magnetic bar จนสารละลายใส จากนั้นปรับ PH ให้เท่ากับ 8 ปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 500 ml นำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง Autoclave ความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.3 1M Tris-HCl (PH 8) ปริมาตร 1000 ml

- ชั่ง Tris 121 g เติมน้ำกลั่น 500 ml แล้วปรับ PH ให้เท่ากับ 8 ด้วย 1M HCl จากนั้นปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นให้เท่ากับ 1000 ml นำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง Autoclave ความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.4 10 mM TE buffer ปริมาตร 100 ml

- ดูด 1M Tris-HCl (PH 8) มาปริมาตร 10 ml และดูด 0.5 M EDTA (PH 8) มาปริมาตร 2 ml แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 100 ml จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง Autoclave ความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

- ถ้าต้องการเตรียม 0.1 mM TE buffer ให้ดูด 10 mM TE buffer ปริมาตร 400 µl แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 40 ml

1.5 20 mg/ml RNaseA ปริมาตร 1 ml

- ชั่ง RNase A .ใส่หลอด Micro centrifuge ขนาด 1.5 ml ผสมกับน้ำ DI water ปริมาตร 1 ml จากนั้น Vortex จนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การเตรียมเทคนิคทางโมเลกุล (PCR)

2.1 20 pmol/ul Primer (P2/P8, 2550F/2718R, 1272H/1237L, ProgND5F/ProgCBR และ METB/TRPC) ปริมาตร 20 µl

- ดูด 100 pmol/ul Primer ปริมาตร 4 µl ผสมกับน้ำ DI water ปริมาตร 16 µl

2.2 1.25 mM Deoxynucleotide Triphosphate (dNTP) ปริมาตร 100 µl

- ดูด 100 mM dATP, dGTP, dCTP และ dTTP .ในแต่ละหลอดปริmมาตรอย่างละ 1.25 µl ผสมกับน้ำ DI water 95 µl

3. การเตรียมสารในวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส

3.1 การเตรียมอะกาโรสเจล 1% และ 3 % ปริมาตร 20 ml

- ชั่งอะกาโรส 0.2 g และ 0.6 g ตามลำดับ ผสมกับ 1X TBE buffer 20 ml

3.2 การเตรียมอะกาโรสเจล 1% และ 3 % ปริมาตร 40 ml

- ชั่งอะกาโรส 0.4 g และ 1.2 g ตามลำดับ ผสมกับ 1X TBE buffer 40 ml

เมื่อผงอะกาโรสและ 1X TBE buffer ตามความเข้มข้นที่ต้องการแล้ว จึงนำเข้า Microwave เพื่อให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน หลังจากนั้นเทใส่ถาดสำหรับเตรียมเจล ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้เจลแข็ง

3.3 การเตรียม 3X Gel loading dye ปริมาตร 200 µl

- ดูด 6X Gel loading dye ปริมาตร 100 µl แล้วเติมน้ำ DI water ปริมาตร 100 µl

4. การเตรียมเอธิเดียมโบรไมด์ (EtBr)

ดูด 10 mg/ml EtBr ปริมาตร 500 µlลงในภาชนะที่เตรียมไว้ แล้วเติม 1X TBE buffer ปริมาตร 499.5 ml แล้วผสมให้เข้ากัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางสาวธัญลักษณ์ มาลัยทัศน์
วัน เดือน ปีเกิด	วันที่ 19 สิงหาคม 2535
ที่อยู่ปัจจุบัน	บ้านเลขที่ 43 ซอยกรุงเทพกรีฑา 23 ถนนกรุงเทพกรีฑา แขวงสะพานสูง เขตสะพานสูง กรุงเทพฯ 10250
ประวัติการศึกษา	(2558) วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ เกรดเฉลี่ย 3.40 สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (2560) วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนอุดหนุนการศึกษาในระดับบัณฑิตศึกษาของคณะวิทยาศาตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ผลงานทางวิชาการ	1. Malaitad, T. Poeaim, S. and Eiamampai, K. 2015. "Sex identification in barn swallows (*Hirundo rustica* Linnaeus) by molecular technique." *Journal of Agricultural Technology*. 11(8) : 2411-2418. 2. ธัญลักษณ์ มาลัยทัศน์ สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม และไกรรัตน์ เอี่ยมอำไพ. 2558. "ความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกนางแอ่นบ้านจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งยีน *CHD*." หน้า 72-73. ใน **การสัมมนาวิชาการเรื่องสัตว์ป่าเมืองไทย ครั้งที่ 36 "การอนุรักษ์สัตว์ป่าไร้พรมแดน."** กรุงเทพ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 3. Malaitad, T. Laipasu, P. Eiamampai, K. and Poeaim, S. 2016. "Identification of the subspecies and gender of Barn swallow (*Hirundo rustica*)." *Journal of Agricultural Technology* 12(7.1) : 1547-1554. 4. ธัญลักษณ์ มาลัยทัศน์ พรชัย หลายพสุ ไกรรัตน์ เอี่ยมอำไพ และสุพัตรา โพธิ์เอี่ยม. 2559. "ความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะภายนอกกับเพศของนกนางแอ่นบ้าน." หน้า 20-21. ใน **การสัมมนาวิชาการเรื่อง สัตว์ป่าเมืองไทย ครั้งที่ 37 "การจัดการสัตว์ป่า 4.0."** กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลงานทางวิชาการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Journal of Agricultural Technology 2015 Vol. 11(8):2411-2418
Available online http://www.ijat-aatsea.com
ISSN 1686-9141

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

Thanyalak Malaitad[1], Supattra Poeaim[1*] and Krairat Eiamampai[2]

[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

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

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

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

Introduction

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Materials and methods

Sample collection and DNA extraction

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

PCR amplification

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

Resultsand Discussions

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

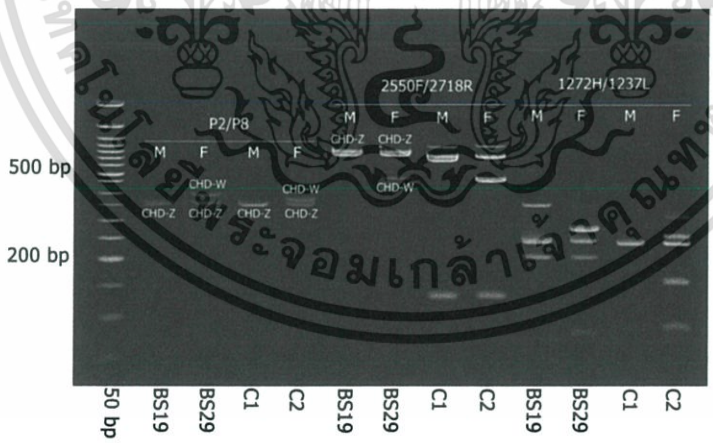


Figure 1. Comparison of PCR products in barn swallows (*Hirundorustica*: BS19 and BS29) and chicken (*Gallus gallus*: C1 and C2) from P2/P8, 1237L/1272Hand 2550F/2718R primers by 3% agarose gel electrophoresis.M = male andF = female

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

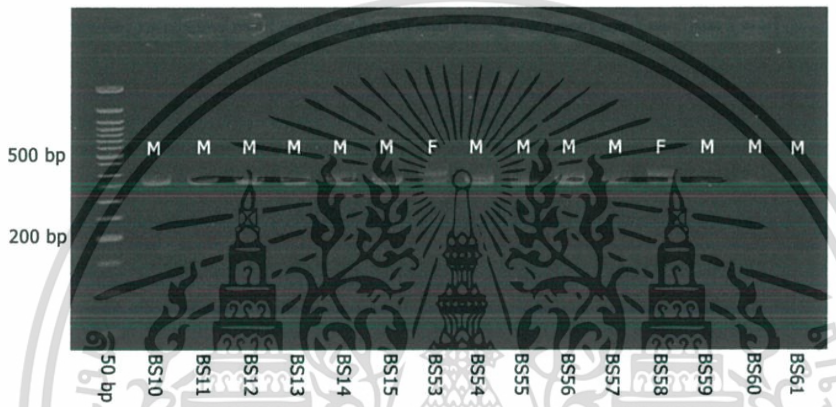


Figure 2. Sex identification in barn swallows (*Hirundorustica*) with P2/P8 primers for *CHD* gene. The PCR products were separated on 3% agarose gel. Female have two band (about 400 and 350bp) and males have one band (350bp) and marker DNA 50bp (lane1) M = male and F = female

Table 1. Expession ofsexing identification of barn swallows

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

Conclusion

Some bird species are dimorphic, which means there are visible differences in appearance between male and female birds plumage. In Thailand, the period of migration, barn swallows are hard to identify sex by using these external features. So, PCR technique by using *CHD* gene with P2/P8 primers can be used. For analysis, the PCR products were separated on 3% agarose gel. Female showed two bands clearlty as 400 and 350 bp and males showedonly 350 bp band. For 61 barn swallows in January 2015, the ratios of male and female were 2.41:1:00 which males had more than females.The results of molecular sexing would also have implications forunder standing behavior, population structure, patterns of migration and estimating pollution risk.

Acknowledgement

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

References

Boncoraglio, G., Martinelli, R. and Saino, N. (2008). Sex-related asymmetry in competitive ability of sexually monomorphic barn swallow nestlingsBehavioral Ecology and Sociobiology 62: 729-738.

Brown, C.R. and Brown, M.B. (1999). Barn Swallow (*Hirundorustica*). In The Birds of North America, No. 452 (A. Poole and F. Gill, eds.). The Birds of North America Online, Ithaca, New York.

Cerit, H. and Avanus, K. (2007). Sex identification in avian species using DNA typingmethods. World Poult Science Journal 63:91–99.

Cheng, Y.H., Kuo, T.F., Lee, D.N. and Weng, C.E. (2006) Sex identification of theblack faced spoonbill (Platalea minor). Zoological Studies. 45(1):104-113.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

De Marchi, G., Fasola, M., Chiozzi, G., Bellati, A. and Galeotti, P. (2012). Sex discrimination of Crab Plovers (*Dromasardeola*) by morphometric traits.Waterbirds 35(2):332-337.

Duijns, S., Dijk, J.G., Kraus, R.H., Mateman, C., Brink, B. and Hooft, P. (2011). An addition field method to sex adult Barn Swallows during the non-breeding seasonin Zambia: White spot length in the outer tail feather. Ostrich 82:129-133.

Ellegren, H. (1996). First gene on the avian W chromosome (CHD) provides a tag for universal sexing of non-ratite birds. In: Proceedings of the Royal Society of London Series B Biological Sciences 263:1635-1641.

Ellegren, H. and Sheldon, B. (1997). New tools for sex identification and the study of sex allocation in birds. Trends in Ecology and Evolution 12:255-259.

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

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

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

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

Hermosell, I.G., Balbontín, J., Marzal, A., Reviriego, M. and de Lope, F. (2007). Sex determination in Barn Swallows *Hirundorustica* by means of discriminant analysis in two European populations. Ardeola54: 93-100.

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

Kleven, O., Jacobsen, F., Izadnegahdar, R., Robertson, R.J.andLifjeld, J.T. (2006). Male tail streamer length predicts fertilization success in the North American barn swallow (*Hirundorustica erythrogaster*). Behavioral Ecology and Sociobiology 59:412 418.

Kose, M., Mand, R. and Moller, A.P. (1999a). Sexual selection for white tail spots in the barn swallow in relation to habitat choice by feather lice. Animal Behavior 58:1201-1205.

Kose, M. and Møller, A.P. (1999b). Sexual selection, feather breakage and parasites: the importance of white spots in the tail of the Barn Swallow (*Hirundorustica*). Behavioral Ecology and Sociobiology. 45:430-436.

Møller, A.P., Magnhagen, C., Ulfstrand, A. and Ulfstrand, S. (1995). Phenotypic quality and moult in the Barn Swallow, *Hirundorustica*. Behavioral Ecology 6:242-249.

Poeaim, S., Chobarporn, N., Eiamampai, K., Nimnuan, S. and Sornsa, T. (2014). Gender identification in some Plover using *CHD* gene. International Journal of Arts and Sciences 07(02):567-572.

Sacchi, P., Soglia, D., Maione, S., Menequz, G., Campora, M. and Rasero, R. (2004). A non-invasive test for sex identification in short-toed eagle (*Circaetusgallicus*). Molecular cell probes. 18(3):193-196.

Saino, N., Ellegren, H. and Moller, P. (1999). Offspring sexual dimorphism and sex-allocation in relation to parental age and paternal ornamentation in the barn swallow. Molecular ecology (8):399-406.

Samuel, D.E. (1971). Field methods determining the sex of barn swallow (*Hirudorustica*). The OHIO journal of science. 71(2):125-128.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Smith, H.G. and Montgomerie, R. (1991). Sexual selection and the tail ornaments of North-American barn swallows. Behavioral Ecology Sociobiology 28:195-201.

Siripong, W., Poeaim, S., Eiamampai, K. and Atittayawan, D. (2015). Gender identification of *Himantopushimantopus* using PCR-based method. Journal of Agricultural Technology 11(2): 307-314.

Vortman, Y., Lotem, A., Dor, R., Lovette, I.J. and Safran, R.J. (2011). The sexual signals of the East-Mediterranean barn swallow: a different swallow tale. Behavioral Ecology 22(6): 1344-1352.

Wang, L.C., Severinghaus, L.L., Chen, C.T., Liu, L.Y., Pan, C.H., Huang, D., Lee, H.Y., Lir, J.T., Chin, S.C., Pu, C.E. and Wang, C.H. (2007). Sexing a wider range of avian species based on two *CHD*1 introns with a unified reaction condition. Zoobiology 26:425-431.

Watson, H.K. Mogg, R.J. Bond, J.M. and Durell, S.A. (2004). Sexing Eurasian oystercatches *Haematopusostralegus* from breast feathers collected when ringing. Wader study gropbulleth 105:87-89.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกนางแอ่นบ้านจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งยีน *CHD*

ธัญลักษณ์ มาลัยทัศน์[1] สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม[1] และไกรรัตน์ เอี่ยมอำไพ[2]

Thanyalak Malaitad[1], Supattra Poeaim[1*] and Krairat Eiamampai[2]

[1]ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520

[2]กลุ่มงานวิจัยสัตว์ป่า สำนักอนุรักษ์สัตว์ป่า กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพันธุ์พืช กรุงเทพฯ 10900

*Corresponding author; e-mail: poeaim@hotmail.com

บทคัดย่อ

นกนางแอ่นบ้าน (Barn Swallow: *Hirundo rustica* Linnaeus) แบ่งออกเป็น 6 สปีชีส์ย่อย คือ *Hirundo rustica rustica*, *H. r. gutturalis*, *H. r. tytleri*, *H. r. transitiva*, *H. r. savignii* และ *H. r. erythrogaster* ที่มีความแตกต่างกันทั้งลักษณะทางสัณฐานวิทยา และแหล่งที่พบ โดยในทวีปเอเชียพบจำนวน 2 สปีชีส์ย่อย คือ *H. r. gutturalis* และ *H. r. tytleri* แม้ว่ามีการแบ่งนกนางแอ่นบ้านในประเทศไทยออกเป็น 3 สปีชีส์ย่อย แต่ยังไม่มีการรายงานการศึกษาสปีชีส์ย่อยทั้งจากการศึกษาจากลักษณะภายนอก และ/หรือระดับโมเลกุล ดังนั้นงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกนางแอ่นบ้านด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยสุ่มตัวอย่างนกเพศผู้จำนวน 5 ตัวอย่าง จากตัวอย่างนกที่นำมาศึกษาเพศด้วยเทคนิคระดับโมเลกุลจำนวน 61 ตัวอย่าง ที่ดักจับด้วยวิธี Mist nets บริเวณหน้าอาคารซีพีทาวเวอร์ ถนนสีลม กรุงเทพมหานคร ในเดือนมกราคม พ.ศ. 2558 โดยวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งยีน *Chromo-helicase-DNA-binding* (*CHD*) ด้วยไพรเมอร์ P2/P8 พบว่ามีขนาดชิ้นดีเอ็นเอขนาด 345 คู่เบส ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์แตกต่างกัน และแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ซึ่งอาจประเมินได้ว่านกนางแอ่นบ้านที่อพยพมายังประเทศไทยมีความหลากหลายทางพันธุกรรม และคาดว่าน่าจะมีนกนางแอ่นบ้านอย่างน้อย 2 สปีชีส์ย่อย ซึ่งควรมีการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งยีนอื่นร่วมด้วย เช่น *Nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase* subunit 2 (*ND2*) หรือ *Cytochrome* b (*Cyt*-b) รวมทั้งตัวอย่างนกจากพื้นที่อื่น เช่น อำเภอปัว จังหวัดน่าน เพื่อประโยชน์ในการวิเคราะห์ทั้งด้านโครงสร้างประชากร และฐานข้อมูลทางพันธุกรรม รวมทั้งทิศทางการอพยพของนกนางแอ่นบ้านต่อไป

Abstract

Barn Swallows (*Hirundo rustica* Linnaeus) are six currently recognized subspecies: *Hirundo rustica rustica*, *H. r. gutturalis*, *H. r. tytleri*, *H. r. transitiva*, *H. r. savignii* and *H. r. erythrogaster*. These subspecies vary in morphological appearance and geographic. There are two Asian subspecies: *H. r. gutturalis* and *H. r. tytleri*. In Thailand, Barn Swallows are divided into three subspecies. However, there have been no reports of the subspecies using both morphological traits and/or molecular techniques. Therefore, the aim of this study was to investigate the genetic diversity of Barn Swallows using DNA sequencing. Five male birds were sampling from 61 samples that were sexing by molecular DNA sexing technique which were captured using mist nets at CP Tower, Silom road Bangkok on January 2015. *Chromo-helicase-DNA-binding* (*CHD*) gene sequences from P2/P8 primer about 345 base pairs that were shown different and divided into two groups. This result suggests that Barn Swallows which migration to Thailand have genetic diversity and possibility of subdividing into at least two subspecies. However, other regions should be sequence such as *Nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase* subunit 2 (*ND2*) or *Cytochrome* b (*Cyt*-b) as well as difference sampling

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

sites like Amphoe Pua, Nan province. In order to provide ether population structure or genetic databases as well as flyways of Barn Swallow were further analyzed.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

International Journal of Agricultural Technology 2016 Vol. 12(7.1):1547-1554
Available online http://www.ijat-aatsea.com
ISSN 1686-9141

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

Thanyalak Malaitad[1], Pornchai Laipasu[2], Krairat Eiamampai[3] and Supattra Poeaim[1*]

[1] Department of Biology, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL), Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand
[2] Department of Statistics, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL), Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand
[3]Wildlife Research Division, Wildlife Conservation Office, Department of National Parks, Wildlife and Plant Conservation, Chatuchak, Bangkok, 10900, Thailand.

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

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

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Introduction

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

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

Materials and methods

Sample collection and DNA extraction

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

identified to species based on morphological characters by the staff of the Wildlife Research Division, Department of National Parks, Wildlife and Plant Conservation, Thailand. For gender identification, the sixty samples were collected from Pua district, Nan province (NBS) in November 2015. After being trapped, the bird measurements were made such as: wing, bill, head, tar, tail, weight, fat content as well as the length (mm), width (mm) and area (mm^2) of white spots on outermost tail feather (Figure 1). Additionally, the blood or the feather was collected for DNA extraction. For subspecies evaluation, the eight blood samples were sampling from Nan province (NBS) and seven samples from Si Lom road, Bangkok (BS) in January 2016. DNA extraction was as described in Malaitad *et al.*, (2015).

Gender identification

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

Subspecies identification

The *ND2* region is located in mitochondrial DNA was amplified using METB and TRPC primers (Dor *et al.*, 2010). Amplification was performed in 25 µl total volume that contained 100 ng DNA template, 2.5 µl of 10X standard *Taq* reaction buffer, 0.2 µl of *Taq* DNA polymerase, 4 µl of 1.25 mM dNTPs, 2 µl of 50 mM $MgCl_2$, 1µl of 20 µM each primer and adjusted by 13.3 µl of nuclease free water. The PCR condition was an ininitial denaturing step at 95 °C for 4.5 min, 35 cycles of 95 °C for 1 min, 62 °C for 1 min, and 72 °C for 2 min, and final extension step at 72 °C for 4.5 min.

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

Figure 1 There are 3 scales of measurement, the length (mm), width (mm) and the area (mm^2) of the white spot on the outermost tail feather

Results

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

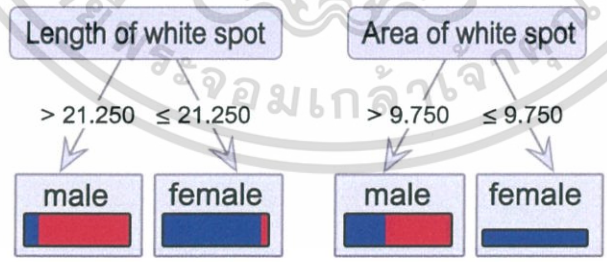


Figure2 The decision tree with Fisher's exact test showed white spot length and white spot area on the outermost tail feather for sexing identification (Blue color = female, Red color = male)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

As results, P2/P8 primers were clearly differed between *CHD*-Z and *CHD*-W allele by agarose gel electrophoresis analysis. Sexing identification was attempted in 60 samples which consisted of 27 males and 33 females. Our data have the range of length, width and area of the white spot on the outermost tail feather are 10.50-35.00 mm, 2.50-7.00 mm and 4.50-21.00 mm^2, respectively. From the decision tree with Fisher's exact test, the length of the white spot on the outermost tail feather had positive correlation with gender. The white spot length less than or equal to 21.25 mm for female and greater than to 21.25 mm for male.

Discussion

Consistent with the previous report by Duijns *et al.,* (2010), this result showed the length of the white spot on the outermost tail feather is sexually dimorphic. The 101 adult barn swallows were caught during the non-breeding season in Zambia, the white spot length less than to 17.50 mm as a female and greater than to 29.50 mm as a male with 95% accurate. However, the rang between 17.50 to 29.50 mm was not reported. In this report, sex determination using the white spot length is 88.33% accurate. Only seven samples are error, it could be from juveniles birds. Because spot size increases with age with the total area of spots differing significantly between juveniles and adults, with the latter having larger spots than juveniles. The area of the white spot on the outermost tail feather was significantly related to the tail length of males, adult males had on average a total area larger than adult females (Kose and Mùller, 1999). The area of the white spot on the outermost tail feather was weakly significantly correlated with male, but not in females. It was found from the decision tree that the white spot area less than or equal to 9.75 mm^2 as a female and greater than to 9.75 mm^2 as a male. However, sex determination using the white spot area is 70% accurate which eighteen samples are unreliable. Nevertheless, the females have the white spot area on the outermost tail feather smaller than the male. There was no significant correlation between the width of white spots of the outermost tail feather with gender since the RapidMiner can not make the decision tree.

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

Conclusion

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

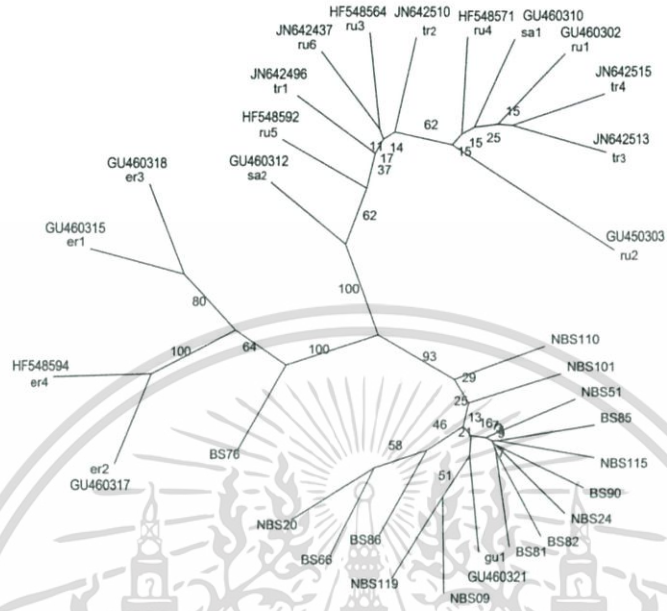


Figure 3 The phylogenetic tree showed the relationship of barn swallows in Thailand (NBS= sampling of Nan province, BS = sampling of Si Lom Bangkok) with five subspecies of Barn swallow.(*Hirundo rustica rustica* = ru, *H. r. gutturali* = gu, *H. r. transitive* = tr, *H. r. savignii* = sa and *H. r. erythrogaster* = er)

Acknowledgement

This work is supported by Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL); fiscal year 2016. We would like to thank the wildlife research division, Department of National Parks, Wildlife and Plant Conservation, Thailand for sampling.

References

Boncoraglio, G., Martinelli, R. and Saino, N. (2008). Sex-related asymmetry in competitive ability of sexually monomorphic barn swallow nestlings. Behavioral Ecology Sociobiology 62: 738-729.

Cerit, H. and Avanus, K. (2006). Sex identification of parrots from feather DNA using *CHDW* and *CHDZ* genes of avian sex chromosomes. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences 31(6): 371-374.

Dor, R., Safran, R.J., Sheldon, F.H., Winkler, D.W. and Lovette, I.J. (2010). Phylogeny of the genus *Hirundo* and the Barn Swallow subspecies complex. Molecular Phylogenetics and Evolution 56: 409-418.

Duijns, S., Dijk, J.G., Kraus, R.H., Mateman, C., Brink, B. and Hooft, P. (2011). An addition field method to sex adult barn swallows during the non-breeding season in Zambia: White spot length in the outer tail feather. Ostrich 82: 129-133.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Efron, B., Hallorant, E. and Holmes, S. (1996). Bootstrap confidence levels for phylogenetic trees. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 93: 7085-7090.

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

Hebert, PD.N., Stoeckle, M.Y., Zemlak, T.S. and Francis,C.M. (2004). Identification of bird through DNA barcodes. PLOS Biology 2: 312.

Hermosell, I.G., Balbontín, J., Marzal, A., Reviriego, M. and De Lope, F. (2007). Sex determination in barn swallows *hirundo rustica* by means of discriminant analysis in two European populations. Ardeola 54: 93-100.

Kose, M. and Mùller, A.P. (1999). Sexual selection, feather breakage and parasites: the importance of white spots in the tail of the barn swallow (*Hirundo rustica*). Behavioral Ecology and Sociobiology 45: 430-436.

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

Morinha, F., Cabral, J.A. and Bastos, E. (2012). Molecular sexing of birds: a comparative review of polymerase chain reaction (PCR)-based methods. Theriogenology 78: 703-714.

Poeaim, S., Chobarporn, N., Eiamampai, K., Nimnuan, S. and Sornsa, T. (2014). Gender identification in some Plover using *CHD* gene International Journal of Arts and Sciences. 07(02): 567-572.

Saino, N., Ambrosini, R., Martinelli, R., Calza, S., Møller, A.P. and Pilastro, A. (2002). Offspring sexual dimorphism and sex-allocation in relation to parental age and paternal ornamentation in the barn swallow. Molecular Ecology 11: 1533-1544.

Samuel, D.E. (1971). Field methods for determining the sex of barn swallows (Hirundo rustica). Ohio Journal of Science 71: 125-128.

Sheldon, F.H. and Winkler, D.W. (1993). Intergeneric phylogenetic relationships of swallows estimated by DNA-DNA hybridization. Auk 110:798-824.

Sheldon, F.H., Whittingham, L.A., Moyle, R.G., Slikas, B. and Winkler D.W. (2005). Phylogeny of swallows (Aves: Hirundinidae) estimated from nuclear and mitrochondrial DNA sequences. Molecular Phylogenetics and Evolution 35: 254-270.

Turner, A. and Rose, C. (1989). Swallows and martins. An identification guide and handbook. Boston, MA: Houghton Mifflin Co., Boston, MA.

Zink, R.M., Pavlova, A., Rohwer, S. and Drovetski, S.V. (2006). Barn swallows before barns: population histories and intercontinental colonization. Proceedings of the Royal Society B 273: 1245-1251.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะภายนอกกับเพศของนกนางแอ่นบ้าน

ธัญลักษณ์ มาลัยทัศน์[1], พรชัย หลายพสุ[2], ไกรรัตน์ เอี่ยมอำไพ[3] และ สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม[1]

Thanyalak Malaitad[1], Pornchai Laipasu[2], Krairat Eiamampa[3] and Supattra Pocaim[1*]

บทคัดย่อ

นกนางแอ่นบ้าน (Barn swallow: *Hirundo rustica*) อพยพมายังประเทศไทยในช่วงนอกฤดูผสมพันธุ์ ซึ่งลักษณะภายนอกของนกเพศผู้ และเพศเมียมีลักษณะเหมือนกัน ทำให้ยากต่อการระบุเพศ ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางกายภาพกับเพศ โดยศึกษานกนางแอ่นบ้านจากอำเภอปัว จังหวัดน่าน ในเดือนธันวาคม พ.ศ. 2558 จำนวน 113 ตัวอย่าง เก็บข้อมูลลักษณะทางกายภาพ เช่น ความยาวปาก ความยาวหน้าแข้ง ความยาวของขนหางคู่นอกสุด ความลึกของขนหาง ความยาวปีก พื้นที่และความยาวจุดแต้มขาวของขนหางคู่นอก พร้อมทั้งระบุเพศนกด้วยเทคนิคทางโมเลกุล โดยเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในส่วนของยีน *chromo-helicase-DNA binding* (*CHD*) ด้วยไพรเมอร์ P2/P8 เมื่อตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่านกเพศเมียมีแถบดีเอ็นเอ 2 แถบ ที่มีขนาด 400 คู่เบส (*CHD-W*) และ 350 คู่เบส (*CHD-Z*) และนกเพศผู้มีแถบดีเอ็นเอเพียง 1 แถบ ประมาณ 350 คู่เบส (*CHD-Z*) เมื่อนำมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ พบว่าค่าความลึกของขนหาง พื้นที่จุดแต้มขาว และความยาวจุดแต้มขาวของขนหางคู่นอกมีความความสัมพันธ์กับเพศ โดยโปรแกรม R แสดงค่าความผิดพลาดในการระบุเพศคิดเป็น 22.12, 27.43 และ 30.97% ตามลำดับ และโปรแกรม Rapid Miner Studio 7.1 แสดงค่าความผิดพลาดในการระบุเพศคิดเป็น 14.16, 19.47 และ 15.04% ตามลำดับ โดยความยาวจุดแต้มขาวของขนหางคู่นอกน่าจะมีความเหมาะสมในการนำไปใช้ระบุเพศในภาคสนามต่อไป

คำสำคัญ: นกนางแอ่นบ้าน ความยาวจุดแต้มขาวของขนหางคู่นอก การระบุเพศนก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ABSTRACT

Barn swallow (*Hirundo rustica*) are migrate to Thailand during the non-breeding season. In non-breeding plumage, the female is very similar in appearance to the male that sexing is proving to be quite difficult. Therefore, the purpose of this study was to relate between appearances and sex identification. The 113 samples were collected from Pua district, Nan province during December 2015. The appearance such as bill length, tarsus length, outermost tail length, tail fork depth, wing length, white spot area and length of the outermost feathers were measured and recorded. Including, sexing with molecular technique, the P2/P8 primer was used to amplify chromo-helicase-DNA binding (CHD) gene and the resulting PCR products were analyzed by agarose gel electrophoresis. Samples from the females produced two bands, which are 400 bp (CHD-W) and 350 bp (CHD-Z), whereas samples from the males produced only a single band about 350 bp (CHD-Z). The result shows a significant relationship between tail fork depth, white spot area and length of the outermost feathers and sex. Program R shows the error of identifying the sex is 22.12, 27.43 and 30.97%, respectively. In the same way, Rapid Miner Studio 7.1 shows the error of identifying the sex is 14.16, 19.47 and 15.04%, respectively. The length of the white spot on the outer feather could be suitable for sexing in the field.

Keyword: Barn swallow, White spot length of the outermost feathers, Sex identification

---

[1]ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520

[2]ภาควิชาสถิติ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520

[3]กลุ่มงานวิจัยสัตว์ป่า สำนักอนุรักษ์สัตว์ป่า กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพันธุ์พืช กรุงเทพฯ 10900

*Corresponding author; e-mail: poeaim@hotmail.com

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้