การระบุเพศนกพงบางชนิด และการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น (*Acrocephalus orientalis*)

SEXING IN SOME WARBLERS AND GENETIC DIVERSITY OF *Acrocephalus orientalis*

วิลาวัณย์ บัณฑิตพรรณ
สุภานัน สุขศิริ
อรณิช ดีสิทธิเวช

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2558

การระบุเพศนกพงบางชนิด และการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น (*Acrocephalus orientalis*)

SEXING IN SOME WARBLERS AND GENETIC DIVERSITY OF *Acrocephalus orientalis*

วิลาวัณย์ บัณฑิตพรรณ

สุภานัน สุขศิริ

อรณิช ดีสิทธิเวช

b.00265869

i.

TB00211

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2558

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

SEXING IN SOME WARBLERS AND GENETIC DIVERSITY OF *Acrocephalus orientalis*

WILAWAN BANDITPHAN
SUPANAN SUKSIRI
ORANIT DEESITTIVECH

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIRMENT FOR
THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE (BIOTECHNOLOGY)
DEPARTMENT OF BIOLOGY, FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2015

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การระบุเพศนกพงบางชนิด และการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น (*Acrocephalus orientalis*)
ชื่อนักศึกษา	นางสาววิลาวัณย์ บัณฑิตพรรณ รหัสนักศึกษา 55051173
	นางสาวสุภานัน สุขศิริ รหัสนักศึกษา 55051205
	นางสาวอรณิช ดีสิทธิเวช รหัสนักศึกษา 55051212
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา	ชีววิทยา
ปีการศึกษา	2558
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพปีการศึกษา 2558

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

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การระบุเพศนกพงบางชนิด และการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น (*Acrocephalus orientalis*)
ชื่อนักศึกษา	นางสาววิลาวัณย์ บัณฑิตพรรณ รหัสนักศึกษา 55051173
	นางสาวสุภานัน สุขศิริ รหัสนักศึกษา 55051205
	นางสาวอรณิช ดีสิทธิเวช รหัสนักศึกษา 55051212
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา	ชีววิทยา
คณะ	วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
ปีการศึกษา	2558
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม

บทคัดย่อ

นกพง (Warblers) ส่วนใหญ่ เพศผู้และเพศเมียจะมีลักษณะสัณฐานภายนอกที่เหมือนกัน (sexually monomorphic) ดังนั้นการศึกษาวิจัยครั้งนี้จึงใช้เทคนิคทางโมเลกุลในการระบุเพศนกจากการเก็บตัวอย่างนกพงบริเวณเขตห้ามล่าสัตว์ป่าบึงบอระเพ็ด จังหวัดนครสวรรค์ จำนวน 11 สถานที่ พบนกพงจำนวน 5 สปีชีส์ ได้แก่ นกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น (*Acrocephalus orientalis*) นกพงคิ้วดำ (*A. bistrigiceps*) นกพงปากหนา (*A. aedon*) นกพงตั๊กแตนอกลาย (*Locustella lanceolata*) และนกพงตั๊กแตนท้ายทอยสีเทา (*L. certhiola*) ในการระบุเพศนกใช้เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) เพิ่มปริมาณยีน *Chromo-Helicase-DNA-binding* (*CHD*) ด้วยไพรเมอร์ P2/P8 และจากนกพงทั้งหมดจำนวน 100 ตัวอย่าง สามารถระบุเป็นเพศผู้ 57 ตัว เพศเมีย 31 ตัว และไม่สามารถระบุเพศได้ 12 ตัวอย่าง โดยใช้นกที่ทราบเพศจากการดูอวัยวะสืบพันธุ์ภายในเป็นตัวควบคุมความถูกต้องของการทดลอง ซึ่งการระบุเพศนกจะเป็นประโยชน์ในการติดตามการเปลี่ยนแปลงประชากรที่เป็นผลกระทบจากปัจจัยต่างๆ เช่น สภาพอากาศ ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่นจาก 3 สถานที่ จำนวน 15 ตัวอย่าง ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล inter Primer Binding Site (iPBS) โดยใช้ไพรเมอร์ 4 ไพรเมอร์ (2277, 2079, 2415 และ 2231) ที่ศึกษาทดลองจากทั้งหมด 40 ไพรเมอร์ เมื่อนำมาสร้างแผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ ที่ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนเท่ากับ 0.80 สามารถแบ่งตัวอย่างนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่นออกเป็น 3 กลุ่ม ซึ่งไม่มีความสัมพันธ์กับสถานที่ที่เก็บตัวอย่าง

คำสำคัญ : การระบุเพศ ความหลากหลายทางพันธุกรรม นกพง เทคนิค iPBS

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Sexing in Some Warblers and Genetic Diversity of *Acrocephalus orientalis*		
Students	Miss Wilawan	Banditphan	Student ID 55051173
	Miss Supanan	Suksiri	Student ID 55051205
	Miss Oranit	Deesitthivech	Student ID 55051212
Degree	Bachelor of Science (Biotechnology)		
Department	Biology		
Faculty	Science		
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)		
Academic Year	2015		
Advisor	Asst. Prof. Dr. Supattra Poeaim		

Abstract

Most of Warbler have a sexually monomorphic, meaning they have the same appearance between male and female. So, the objective of this research used molecular technique for birds sexing. Sample collection sites, 11 area around the Bung Boraphet (Wildlife Non-Hunting Area), five species (100 samples) were found: *Acrocephalus orientalis, A. bistrigiceps, A. aedon, Locustella lanceolata* and *L. certhiola*. For sex identification, the polymerase chain reaction with P2/P8 amplifies of the *Chromo Helicase DNA-binding* (*CHD*) gene. In a total of 100 samples, 57 males and 31 females were determined, whereas 12 samples could not be amplified by PCR. This study used the knowing bird's gender from the reproductive organs for experiment control. Sexing data to understand changes in bird populations in response to factors such as weather. For genetic diversity, *Acrocephalus orientalis* from 3 area (15 samples) was studied by using inter Primer Binding Site (iPBS) technique. Four iPBS primers (2277, 2079, 2415 and 2231) which selected from 40 iPBS primers were investigated. The similarity coefficient at 0.80, the dendrogram showed that bird samples were divided in three groups which were not related to the area.

Keywords: Sexing, Genetic diversity, Warbler, iPBS technique

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษฉบับนี้จัดทำขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ประสบความสำเร็จด้วยความกรุณาจากบุคคลดังต่อไปนี้

ขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม ประธานกรรมการ ช่วยให้คำแนะนำแก้ไขปัญหาต่างๆ จนการทำเล่มโครงงานพิเศษสำเร็จไปได้ด้วยดี

ขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ คอยให้ความรู้ คำแนะนำ ชี้แนะแนวทาง รวมทั้งช่วยตรวจสอบ แก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้น เพิ่มความสมบูรณ์ของรายงานฉบับนี้

ขอบพระคุณคุณไกรรัตน์ เอี่ยมอำไพ หัวหน้าสถานีวิจัยสัตว์ป่าบึงบอระเพ็ด จังหวัดนครสวรรค์ รวมทั้งเจ้าหน้าที่ของสถานีวิจัยสัตว์ป่าบึงบอระเพ็ดทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างนกพง และให้ความรู้เกี่ยวลักษณะทางสัณฐานวิทยาของนกพงเป็นอย่างดี

ขอบพระคุณคุณเลอสรรค์ วศิโนภาส นิสิตปริญญาเอก ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ช่วยให้คำแนะนำ และสอนวิธีการผ่าเปิดช่องท้องของซากนก ในการตรวจวิเคราะห์เพศนก

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาชีววิทยา ช่วยอำนวยความสะดวกในด้านอุปกรณ์เครื่องมือทางวิทยาศาสตร์ที่จำเป็นในการทำโครงงานพิเศษครั้งนี้

ขอบคุณเพื่อนๆ พี่และน้องทุกท่าน ที่ช่วยเป็นกำลังใจ ให้คำปรึกษา แนะนำแนวทางที่เหมาะสม รวมถึงเพื่อนๆน้องๆที่คอยให้กำลังใจอยู่เสมอมา

ขอขอบพระคุณบิดา มารดา และบุคคลในครอบครัว ที่สนับสนุนและให้กำลังใจในการทำโครงงานพิเศษเล่มนี้

สุดท้ายนี้ คณะผู้จัดทำหวังเป็นอย่างยิ่งว่า โครงงานพิเศษฉบับนี้จะเป็นประโยชน์ต่อผู้ที่สนใจไม่มากก็น้อย หากโครงงานพิเศษฉบับนี้มีความผิดพลาดประการใด ผู้จัดทำต้องขออภัยไว้ ณ ที่นี้ด้วย

วิลาวัณย์ บัณฑิตพรรณ
สุภานัน สุขศิริ
อรณิช ดีสิทธิเวช

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ข
กิตติกรรมประกาศ ..... ค
สารบัญ ..... ง
สารบัญตาราง ..... ช
สารบัญรูป ..... ซ
คำย่อและสัญลักษณ์ ..... ญ
บทที่ 1 บทนำ 1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ 1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานโครงงานพิเศษ 2
1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ 2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 4
2.1 ลักษณะทั่วไปของนก 4
2.1.1 นกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น 4
2.1.2 นกพงคิ้วดำ 4
2.1.3 นกพงปากหนา 5
2.1.4 นกพงตั๊กแตนอกลาย 6
2.1.5 นกพงตั๊กแตนท้ายทอยสีเทา 6
2.2 การระบุเพศนก 7
2.3 เครื่องหมายทางโมเลกุล inter Primer Binding Site (iPBS) 10
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย 12
3.1 ตัวอย่าง 12
3.2 วัสดุอุปกรณ์ 13
3.3 สารเคมี 14
3.4 วิธีการ 16
3.4.1 การเก็บตัวอย่าง 16
3.4.1.1 เลือดนก (Blood) 16
3.4.1.2 กระดาษ FTA (FTA Card) 17
3.4.1.3 ขนนก (Feather) 17

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.4.1.4 ซากนก 17
3.4.2 การสกัดดีเอ็นเอ 17
3.4.2.1 การสกัดดีเอ็นเอจากเลือดนก 17
3.4.2.2 การสกัดดีเอ็นเอจากขนนก 18
3.4.2.3 การทำให้ดีเอ็นเอบนกระดาษ FTA บริสุทธิ์ 18
3.4.2.4 การสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อซากนก 19
3.4.3 การศึกษาคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอ 19
3.4.4 การระบุเพศนก 20
3.4.4.1 การศึกษาเพศนกโดยผ่าเปิดช่องท้องซากนก 20
3.4.4.2 การคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการระบุเพศนก 20
3.4.4.3 การระบุเพศตัวอย่างนกด้วยเทคนิคระดับโมเลกุล 21
3.4.5 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายทางโมเลกุล inter Primer Binding Site (iPBS) 21
3.4.5.1 การคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม 21
3.4.5.2 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม 22
3.4.5.3 การแปรผลและวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้โปรแกรม NTSYS pc2.1X 22
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล 23
4.1 ผลการระบุเพศนก 23
4.1.1 ผลการตรวจสอบเพศนกจากซากนก 23
4.1.2 ผลการคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการระบุเพศนกด้วยเทคนิค PCR 23
4.1.3 ผลการระบุเพศนกด้วยเทคนิคระดับโมเลกุล 24
4.2 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายทางโมเลกุล inter Primer Binding Site (iPBS) 26
4.2.1 ผลการคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมสำหรับศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม 26
4.2.2 ผลการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น 27
4.2.3 วิเคราะห์ผลความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรม NTSYSpc 2.1X 28

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 30
5.1 สรุปผลการทดลอง 30
5.2 ข้อเสนอแนะ 30
เอกสารอ้างอิง 31
ภาคผนวก 36
ภาคผนวก ก 37
ภาคผนวก ข 42
ภาคผนวก ค 49
ภาคผนวก ง 50

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
3.1	แสดงจำนวนตัวอย่างนกพงแต่ละสปีชีส์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้	13
3.2	แสดงกลุ่ม ลำดับเบส และค่า Ta เฉลี่ยของไพรเมอร์ ในเทคนิค iPBS	15
3.3	แสดงขั้นตอน อุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบในเทคนิค PCR เพื่อระบุเพศนก	20
3.4	แสดงขั้นตอน อุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายทางโมเลกุล iPBS	22
4.1	แสดงผลการระบุเพศนกพงแต่ละสปีชีส์จำนวน 100 ตัวอย่าง	25

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	ลักษณะของนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น	4
2.2	ลักษณะของนกพงคิ้วดำ	5
2.3	ลักษณะของนกพงปากหนา	5
2.4	ลักษณะของนกพงตั๊กแตนอกลาย	6
2.5	ลักษณะของนกพงตั๊กแตนท้ายทอยสีเทา	6
2.6	โครโมโซมเพศของนกเพศผู้ชนิด homogametic sex : ZZ และเพศเมียชนิด heterogametic sex : ZW	7
2.7	แสดงผลของผลิตภัณฑ์ PCR ในการระบุเพศนกหัวโตทรายเล็ก นกหัวโตทรายใหญ่ และนกหัวโตขาดำ ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส ใช้อะกาโรสความเข้มข้น 1.5% กำหนดให้ M แทนเพศผู้ และ F แทนเพศเมีย	8
2.8	แสดงการเข้าเกาะของไพรเมอร์ที่ตำแหน่ง LTR (กำหนดให้ LTR คือ Long Terminal Repeat, PBS คือ Primer Binding Site และ TG และ CA คือลำดับเบสบริเวณ LTR)	11
3.1	ตาข่ายดักนก (Mist net)	12
3.2	(ก) แสดงการเจาะเลือดจากเส้นเลือดบริเวณขาของนก (ข) ใช้ Hematocrit tube เก็บเลือด	16
3.3	แสดงการใช้กระดาษ FTA ป้ายหรือซับเลือด	17
4.1	แสดงลักษณะอวัยวะสืบพันธุ์ภายใน (ก) เพศผู้ (Testis) (ข) เพศเมีย (Ovary)	23
4.2	ผลการเปรียบเทียบไพรเมอร์ P2/P8, 1237L/1272H และ 2550F/2718R ที่อุณหภูมิ annealing 52 °C และ 53 °C จากตัวอย่างซากนกเพศผู้ (NP09) และเพศเมีย (NP10) และแถบดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบขนาด 50 คู่เบส	24
4.3	แสดงผลการระบุเพศนกด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้ไพรเมอร์ P2/P8 จากตัวอย่างทั้งหมด 9 ตัวอย่าง เปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 50 คู่เบส กำหนดให้ M แทนเพศผู้ และ F แทนเพศเมีย	25
4.4	แสดงลักษณะแถบดีเอ็นเอการคัดเลือกไพรเมอร์สำหรับศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายทางโมเลกุล iPBS ของนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น โดยใช้ไพรเมอร์ 5 กลุ่ม จำนวน 40 ไพรเมอร์ เทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส	27

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
4.5	แสดงแถบดีเอ็นเอการศึกษาความหลากหลายพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายทางโมเลกุล iPBS ของนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น ของตัวอย่างนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่นจำนวน 15 ตัวอย่าง เมื่อใช้ไพรเมอร์ 2079 เทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส.....	28
4.6	แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ (Dendrogram) ของนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่นจำนวน 15 ตัวอย่าง ด้วยโปรแกรม NTSYSpc 2.1X เลือกวิธีการจัดแบบ Unweightede Pair Group Method Using Arithmetic Average (UPGMA) กำหนดให้ แทนตัวอย่างนกจากเกาะตาเรือง, แทนตัวอย่างนกจากทางเข้าประมงเชิงพาณิชย์ แทนตัวอย่างนกจากเนินระฆัง.....	29

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำย่อ/สัญลักษณ์

คำย่อ	ความหมาย
bp	คู่เบส
CHD	ยีน *Chromo-helicase-binding protein*
CHD-W	ยีน *CHD* ที่อยู่บนโครโมโซมเพศ W
CHD-Z	ยีน *CHD* ที่อยู่บนโครโมโซมเพศ Z
iPBS	เครื่องหมายทางโมเลกุล inter Primer Binding Site
M	โมลาร์
mg/ml	มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
ml	มิลลิลิตร
mM	มิลลิโมลาร์
ng	นาโนกรัม
ng/ml	นาโนกรัมต่อไมโครลิตร
NP	รหัสตัวอย่างของนกพง
pmole	พิโคโมล
Ta	อุณหภูมิ annealing
µl	ไมโครลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

นกพง (Warblers) เป็นนกอพยพย้ายถิ่นในช่วงฤดูหนาวนอกฤดูผสมพันธุ์ (เกรียงศักดิ์, 2551) มีลำตัวขนาดเล็ก ขนลำตัวสีน้ำตาล เคลื่อนที่ว่องไว หากินตามพื้นดิน กอหญ้าหรือพุ่มไม้รกทึบ เป็นสัตว์ป่าคุ้มครองตามกฎกระทรวงฉบับที่ 4 (พ.ศ. 2537) ออกตามความในพระราชบัญญัติสงวนและคุ้มครองสัตว์ป่า พ.ศ.2535 (ราชกิจจานุเบกษา, 2537) นกพงอยู่ในลำดับ (order) Passeriformes วงศ์ (family) Sylviidae วงศ์ย่อย (subfamily) Acrocephalinae (เอกลักษณ์, 2555) ทั่วโลกมีนกในวงศ์ย่อยนี้ 36 สกุล 221 สปีชีส์ แต่ประเทศไทยพบเพียง 10 สกุล (เกรียงศักดิ์, 2551) 47 สปีชีส์ (เจษฎา, 2559) จากข้อมูลการสำรวจนกของสถานีวิจัยสัตว์ป่าบึงบอระเพ็ด จังหวัดนครสวรรค์ พบว่านกพงในประเทศไทยมีจำนวนลดน้อยลงเมื่อเทียบกับปีที่ผ่านมา ลักษณะของนกพงโดยส่วนใหญ่เพศผู้และเพศเมียของแต่ละสปีชีส์มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอกเหมือนกัน (sexually monomorphic) ไม่สามารถระบุเพศจากลักษณะภายนอกได้ การระบุเพศนกมีความสำคัญมากสำหรับการศึกษาถึงพฤติกรรมของสัตว์ปีก นิเวศวิทยา อัตราส่วนจำนวนประชากร วิวัฒนาการทางชีววิทยาและทางพันธุศาสตร์ รวมไปถึงการอนุรักษ์นกที่ใกล้สูญพันธุ์ (สุคนธ์ทิพย์ และสายชล, 2549) แม้นกพงจะไม่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ แต่สามารถเป็นดัชนีบ่งชี้ถึงความอุดมสมบูรณ์ของถิ่นที่อยู่อาศัยของสัตว์ป่าในเมืองไทยได้

การระบุเพศนกปัจจุบันมีหลายวิธี เช่น การสังเกตจากลักษณะภายนอก ซึ่งใช้ได้กับนกบางชนิดเท่านั้น หรือการสังเกตพฤติกรรมนก หรือการใช้กล้องส่องตรวจอวัยวะเพศ (Richner, 1998) เป็นต้น ซึ่งวิธีเหล่านี้อาจใช้ได้ในนกตัวเต็มวัยช่วงฤดูผสมพันธุ์เท่านั้น (Prus and Schmutz, 1987) จึงต้องอาศัยเทคนิคทางโมเลกุล โดยใช้เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส (Polymerase chain reaction: PCR) ซึ่งนิยมศึกษาจากยีน *Chromo-Helicase-DNA-Binding* (*CHD*) ที่พบบนโครโมโซมเพศของนก อาศัยหลักการนกเพศผู้มีโครโมโซมเพศเป็น ZZ สามารถเพิ่มปริมาณยีน *CHD* ได้เพียงแถบเดียว คือ แถบของ *CHD-Z* ในขณะที่นกเพศเมียมีโครโมโซมเพศเป็น ZW สามารถเพิ่มปริมาณยีน *CHD* ได้ 2 แถบ คือ แถบของ *CHD-Z* และ *CHD-W* (สุพัตรา และคณะ, 2555; ณิชาภัทร และคณะ, 2556; สมชาติ และดุจฤดี, 2557) ซึ่งวิธีนี้มีข้อดีคือ มีความถูกต้อง แม่นยำ สามารถระบุเพศนกได้ทุกระยะ มีการใช้เทคนิคนี้ในการระบุเพศนกชนิดต่างๆ เช่น นกแก้วบางชนิด (สุพัตรา และคณะ, 2555) นกเงือก นกคูรัสโซ (Miyaki *et al.*, 1998) นกเลิฟเบิร์ด (นำดี และคณะ, 2544) นกคอกคาเทล (Cerit and Avanus, 2007) และ นกปรอดจีน (Chang *et al.*, 2008) เป็นต้น

จากการศึกษาหาปักษีวิทยาโดยการใส่ห่วงขาของสถานีวิจัยสัตว์ป่าบึงบอระเพ็ด จังหวัดนครสวรรค์ นกพงที่พบบ่อยมี 5 สปีชีส์ ได้แก่ นกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น (*Acrocephalus orientalis*)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นกพงคิ้วดำ (*A. bistrigiceps*) นกพงปากหนา (*A. aedon*) นกพงตั๊กแตนอกลาย (*Locustella lanceolata*) และนกพงตั๊กแตนท้ายทอยสีเทา (*L. certhiola*) ดังนั้นจึงสนใจระบุเพศนกทั้ง 5 สปีชีส์นี้ด้วยเทคนิคทางระดับโมเลกุล เพื่อเป็นฐานข้อมูลจำนวนประชากรของนกพงในประเทศไทย นอกจากนั้นแล้ว สถิติการสำรวจนกของสถานีวิจัยสัตว์ป่าบึงบอระเพ็ด จังหวัดนครสวรรค์ มักพบนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่นตัวเดิม (สังเกตจากรหัสห่วงขา) ณ สถานที่เดิมที่เคยสำรวจพบ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่านกชนิดนี้กลับมาที่แหล่งเดิมหรือมีการชักนำพาลูกนกมายังแหล่งอาศัยเดิมในฤดูกาลถัดไป จึงศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น โดยการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในนกนิยมใช้เครื่องหมายทางโมเลกุล Random amplified polymorphic DNA (RAPD), Sequence Related Amplified Polymorphism (SRAP) , Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) เป็นต้น แต่จากงานวิจัยของวิภารัตน์ และคณะ (2558) สามารถใช้เครื่องหมายทางโมเลกุล iPBS (inter Primer Binding Site) จำแนกนกตีนเทียน (*Himantopus himantopus*) กลุ่มนกประจำถิ่นออกจากกลุ่มนกอพยพได้ จึงสนใจนำเครื่องหมายทางโมเลกุล iPBS มาศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น ซึ่งใช้หลักการนำไพรเมอร์เข้าไปสุ่มจับกับดีเอ็นเอเป้าหมายของ Long Terminal Repeat (LTR) บริเวณ retrotransposon ซึ่งเป็นบริเวณที่เกิดการผันแปรทางพันธุกรรมได้ง่าย พบในสิ่งมีชีวิตพวกยูคาริโอตทุกชนิด (โองการ และเฟื่องฟ้า, 2014)

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1) เพื่อระบุเพศของนกพงบางชนิด
2) เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น

1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

การระบุเพศนกใช้เทคนิค PCR เพิ่มปริมาณยีน *CHD* โดยจะศึกษาเฉพาะนกพง 5 สปีชีส์ ได้แก่ นกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น (*Acrocephalus oreintalis*) นกพงคิ้วดำ (*A. distrigiceps*) นกพงปากหนา (*A. aedon*) นกพงตั๊กแตนอกลาย (*Locustella lanceolata*) และนกพงตั๊กแตนท้ายทอยสีเทา (*L. certhiola*) ที่เก็บตัวอย่างบริเวณเขตห้ามล่าสัตว์ป่าบึงบอระเพ็ด ตำบลพระนอน อำเภอเมือง จังหวัดนครสวรรค์ ระหว่างเดือนตุลาคม–พฤศจิกายน พ.ศ.2558 และศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่นด้วยเครื่องหมายทางโมเลกุล iPBS

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1) เป็นฐานข้อมูลด้านเพศของนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น (*Acrocephalus oreintalis*) นกพงคิ้วดำ (*A. distrigiceps*) นกพงปากหนา (*A. aedon*) นกพงตั๊กแตนอกลาย (*Locustella lanceolata*) และนกพงตั๊กแตนท้ายทอยสีเทา (*L. certhiola*)

2) ทราบความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น (*A. oreintalis*)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ลักษณะทั่วไปของนก

นกพงเป็นนกอพยพย้ายถิ่นในช่วงฤดูหนาวนอกฤดูผสมพันธุ์ (เกรียงศักดิ์, 2551) อยู่ในวงศ์ย่อย Acrocephalinae ทั่วโลกมีนกในวงศ์ย่อยนี้ 36 สกุล 221 สปีชีส์ แต่พบในประเทศไทยเพียง 10 สกุล (เกรียงศักดิ์, 2551) 47 สปีชีส์ (เจษฎา, 2559) โดยจะขอกล่าวเฉพาะนกที่นำมาศึกษาในครั้งนี้ จำนวน 5 สปีชีส์ ดังนี้

2.1.1 นกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น

นกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น (*Acrocephalus orientalis*) ชื่อสามัญ Oriental Reed Warbler ลักษณะทั่วไป คือ ลำตัวขนาดใหญ่ ปากล่างมีสีเนื้อแกมส้ม ปลายปากสีคล้ำ คิ้วยาวสีขาว แถบตาดำ ขนลำตัวด้านบนมีสีน้ำตาลแกมเขียวไพล คอและลำตัวด้านล่างสีขาว อกมีขีดสีเทาจาง ด้านข้างลำตัวและก้นมีสีน้ำตาลแกมเหลืองเข้ม บริเวณปลายหางมีสีขาวหรือขาวแกมน้ำตาล ดังรูปที่ 2.1 ขณะเกาะขนปลายปีกยาวกว่าเมื่อเทียบกับปลายขนโคนปีก สำหรับลักษณะเด่นจะมีขนปลายปีกเส้นที่สามยาวกว่าเส้นที่สี่ชัดเจน พบนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่นทุกบริเวณในประเทศไทย แต่พบเฉพาะบางฤดูเท่านั้น (กลุ่มงานข้อมูลสารสนเทศและการสื่อสาร สำนักงานจังหวัดนครสวรรค์, 2558) อาศัยอยู่บริเวณดงหญ้า ป่าละเมาะซึ่งปกติจะหาตัวได้ยาก ส่วนใหญ่จะได้ยินแต่เสียงร้อง (สมศักดิ์, 2557)

รูปที่ 2.1 ลักษณะของนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น
(ที่มา: ถ่ายภาพโดย อรณิช ดีสิทธิเวช, 2558)

2.1.2 นกพงคิ้วดำ

นกพงคิ้วดำ (*Acrocephalus bistrigiceps*) ชื่อสามัญ Black browed Reed Warbler เป็นนกพงขนาดเล็กที่พบบ่อยที่สุดในประเทศ ลักษณะทั่วไป คือ มีคิ้วยาวสีน้ำตาลแกมเหลือง หัวและลำตัวด้านบนมีสีเขียวมะกอก ตะโพกมีสีแกมน้ำตาลแดงกว่าส่วนอื่นๆ ลำตัวด้านล่างมี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สีขาว อกและด้านข้างมีสีน้ำตาลแกมเหลือง ลักษณะเด่นคือ มีแถบข้างหัวเหนือคิ้วสีดำชัดเจนกว่านกพงชนิดอื่น ดังรูปที่ 2.2 มีเสียงร้อง “ชัค-ชัค” พบบริเวณดงหญ้าสูง พื้นที่ชุ่มน้ำ ทุ่งนา พื้นที่เกษตรกรรม และป่าละเมาะ ส่วนใหญ่พบในที่ราบ แต่สามารถพบได้ที่ความสูงถึง 800 เมตร (โอภาส, 2544; จารุจินต์ และคณะ, 2550)

รูปที่ 2.2 ลักษณะของนกพงคิ้วดำ
(ที่มา: ถ่ายภาพโดย อรณิช ดีสิทธิเวช, 2558)

2.1.3 นกพงปากหนา

นกพงปากหนา (*Acrocephalus aedon*) มีชื่อสามัญ Thick-billed Reed Warbler เป็นนกพงขนาดใหญ่ พบได้ในช่วงฤดูหนาว ลักษณะทั่วไป คือ ปากสั้นและหนากว่านกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น ไม่มีคิ้วสีขาวหรือสีน้ำตาลอ่อน แถบตามีสีเข้ม หัวตาและรอบตามีสีน้ำตาลอ่อน คอสีขาว หัวและลำตัวด้านบนมีสีน้ำตาล ปีกด้านข้างสีน้ำตาลแดงแกมส้ม ดังรูปที่ 2.3 มีเสียงร้อง “เต่ก” พบบริเวณป่าละเมาะ ทุ่งหญ้า ส่วนใหญ่พบในพื้นที่ค่อนข้างแห้งแล้ง บริเวณที่ราบถึงบริเวณความสูง 1,525 เมตร (โอภาส, 2544; จารุจินต์ และคณะ, 2550)

รูปที่ 2.3 ลักษณะของนกพงปากหนา
(ที่มา: ถ่ายภาพโดย อรณิช ดีสิทธิเวช, 2558)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.4 นกพงตั๊กแตนอกลาย

นกพงตั๊กแตนอกลาย (*Locustella lanceolata*) ชื่อสามัญ Lanceolated Warbler ลักษณะทั่วไป คือ คล้ายนกพงตั๊กแตนท้ายทอยสีเทา แต่มีขนาดเล็กกว่า คิ้วยาวสีน้ำตาลอ่อน ขนลำตัวสีน้ำตาลแกมเขียวไพล ลำตัวด้านบนและด้านล่างมีลายขีดสีดำกระจาย ขนคลุมใต้หางยาว ดังรูปที่ 2.4 มีเสียงร้อง "อั๋ด-อั๋ด-อั๋ด" อาศัยในพื้นที่ภาคเหนือตอนล่าง พบบริเวณดงหญ้าสูง พื้นที่ชุ่มน้ำ และพื้นที่เกษตรกรรม ตามป่าโปร่ง ชายป่า ที่ราบถึงความสูง 1,800 เมตร (โอภาส, 2544; จารุจินต์ และคณะ, 2550)

รูปที่ 2.4 ลักษณะของนกพงตั๊กแตนอกลาย
(ที่มา: ถ่ายภาพโดย อรณิช ดีสิทธิเวช, 2558)

2.1.5 นกพงตั๊กแตนท้ายทอยสีเทา

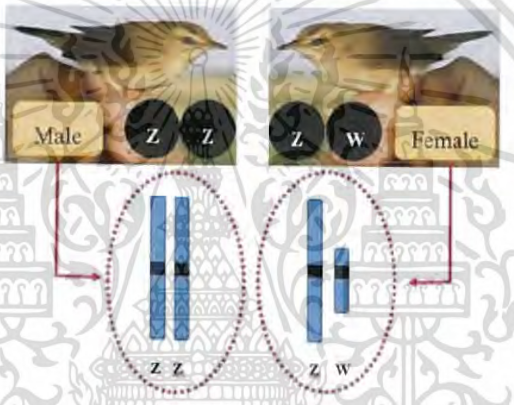
นกพงตั๊กแตนท้ายทอยสีเทา (*Locustella certhiola*) ชื่อสามัญ Pallas's Grasshopper Warbler ลักษณะทั่วไป คือ คิ้วยาวสีขาว ลำตัวด้านบนมีสีน้ำตาล ด้านล่างมีสีขาว มีลายเล็กๆ สีน้ำตาลกระจายอยู่ทั่วตัว หน้าอกและด้านข้างมีสีน้ำตาลค่อนข้างแดง สะโพกมีสีน้ำตาลแดง และมีลายขีดสีดำ หางมีสีน้ำตาลเข้มแกมเทา มีลายขวางสีดำจาง ปลายหางสีขาว ดังรูป 2.5 เสียงร้องคล้ายนกพงตั๊กแตนอกลาย พบบริเวณภาคเหนือตอนล่าง ตามดงหญ้าสูงในพื้นที่ชุ่มน้ำ ป่าชายเลน พบบริเวณที่ราบถึงความสูง 610 เมตร (โอภาส, 2544; จารุจินต์ และคณะ, 2550)

รูปที่ 2.5 ลักษณะของนกพงตั๊กแตนท้ายทอยสีเทา
(ที่มา: ถ่ายภาพโดย อรณิช ดีสิทธิเวช, 2558)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 การระบุเพศนก

นกพงส่วนใหญ่เพศผู้และเพศเมียมีลักษณะสัณฐานภายนอกเหมือนกัน ทำให้ไม่สามารถระบุเพศนกด้วยตาเปล่าได้ ปัจจุบันมีเทคนิคในการระบุเพศนกหลายวิธี เช่น การสังเกตจากลักษณะภายนอก (ใช้ได้กับนกบางชนิดเท่านั้น) การสังเกตพฤติกรรมนก การใช้กล้องส่องตรวจอวัยวะเพศโดยใช้กล้องส่องผ่านทางช่องท้อง (Richner, 1989) เป็นต้น ซึ่งวิธีเหล่านี้อาจใช้ได้ในนกตัวเต็มวัยช่วงฤดูผสมพันธุ์เท่านั้น (Prus and Schmutz, 1987) จึงใช้การวิเคราะห์ระดับโมเลกุล (Fridolfsson and Ellegren, 1999) ซึ่งวิธีนี้สามารถระบุเพศนกได้ทุกระยะ มีความแม่นยำ และมีประสิทธิภาพสูง ยกเว้นนกในกลุ่มนกที่บินไม่ได้ เช่น นกกระจอกเทศ นกอีมู นกช้าง เป็นต้น โดยนกทุกชนิดมีความแตกต่างของโครโมโซมเพศ นกเพศผู้มีโครโมโซม ZZ เป็น homogametic sex และนกเพศเมียมีโครโมโซม ZW เป็น heterogametic sex (Ellegren, 1996; Griffiths *et al.*, 1996) ดังรูปที่ 2.6



รูปที่ 2.6 โครโมโซมเพศของนกเพศผู้ชนิด homogametic sex: ZZ และเพศเมียชนิด heterogametic sex: ZW

การระบุเพศนกนิยมใช้ยีน *Chromo-Helicase-DNA-binding* (*CHD*) สามารถพบได้บนโครโมโซมเพศของนก (Griffiths, 2000) อาศัยพื้นฐานความแตกต่างของความยาวบริเวณ intron ระหว่างโครโมโซมเพศทั้งสองชนิด เทคนิคที่นิยมใช้ในการระบุเพศนก คือ ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส (Polymerase Chain Reaction: PCR) เพื่อเพิ่มปริมาณยีน *CHD* โดยประยุกต์ใช้กับไพรเมอร์พื้นฐานที่นิยมใช้ในการระบุเพศนกมี 3 คู่ไพรเมอร์ ได้แก่ ไพรเมอร์ P2 (5′-TCTGCATCGC-TAAATCCTTT-3′)/P8 (5′-CTCCCAAGGATGAGRAAYTG-3′) (Griffiths *et al.*, 1998) ไพรเมอร์ 1237L (5′-GAG-AAACTGTGCAAAACAG-3′)/1272H (5′-TCCAGAATATCTTCTGCTCC-3′) (Kahn *et al.*, 1998) และไพรเมอร์ 2550F (5′-GTTACTGATTCGTCTACGAGA-3′)/2718R (5′ATTGAAATGATCCAGT-GCTTG-3′) (Fridolfsson and Ellegren, 1999) ใช้ในการระบุเพศนกหลายสปีชีส์ เทคนิคนี้ต้องหาสภาวะที่เหมาะสม โดยเฉพาะการควบคุมอุณหภูมิช่วง annealing (Ta) (Griffiths *et al.*, 1998; Fridolfsson and Ellegren, 1999) หลังจากกระบวนการ PCR ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยวิธี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อิเล็กโทรโฟรีซิส (Electrophoresis) พบว่า เพศผู้ได้ผลิตภัณฑ์ PCR 1 แถบของอัลลีล *CHD-Z* และเพศเมียได้ผลิตภัณฑ์ PCR 2 แถบของอัลลีล *CHD-Z* และ *CHD-W* ดังเช่นการระบุเพศนกหัวโตทรายเล็ก (*Charadrius mongolus*) นกหัวโตทรายใหญ่ (*C. leschenaultii*) และนกหัวโตขาดำ (*C. alexandrinus*) ที่เพิ่มปริมาณยีน *CHD* ด้วยไพรเมอร์ 2550F/2718R โดยใช้ไก่เป็นตัวยืนยันประสิทธิภาพการทดลอง สามารถทราบขนาดของอัลลีล *CHD-Z* และ *CHD-W* ได้ โดยเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบขนาด 50 คู่เบส (ณิชาภัทร และคณะ, 2013) ดังรูปที่ 2.7

รูปที่ 2.7 แสดงผลของผลิตภัณฑ์ PCR ในการระบุเพศนกหัวโตทรายเล็ก นกหัวโตทรายใหญ่ และนกหัวโตขาดำ ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส ใช้อะกาโรสความเข้มข้น 1.5% กำหนดให้ M แทนเพศผู้ และ F แทนเพศเมีย (ณิชาภัทร และคณะ, 2556)

ในการศึกษาเพศในตำแหน่งยีน *CHD* นั้น ไพรเมอร์ที่นิยม คือ P2/P8, 1237L/1272H และ 2550F/2718R ดังที่กล่าวมาแล้ว โดยนำมาใช้ในการระบุเพศนกหลายสปีชีส์ ดังตัวอย่างต่อไปนี้

Griffiths *et al.* (1998) ระบุเพศนก 11 อันดับ 23 วงศ์ จำนวนทั้งหมด 28 สปีชีส์ หนึ่งในนั้นเป็นนก *Acrocephalus baeticatus* ซึ่งเป็นนกในสกุลเดียวกับนกพง โดยใช้ไพรเมอร์ P2/P8 ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส ใช้อะกาโรสความเข้มข้น 3% พบว่า เพศผู้เกิดชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 1 แถบ (*CHD-Z*) และเพศเมียเกิดชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 2 แถบ (*CHD-Z* และ *CHD-W*)

An *et al.* (2007) ทำการระบุเพศไก่ฟ้า (*Phasianus colchicus*) โดยใช้ไพรเมอร์ P2/P8 ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส ใช้อะกาโรสความเข้มข้น 2-2.5% พบว่า เพศผู้เกิดชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 1 แถบ (*CHD-Z*) และเพศเมียเกิดชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 2 แถบ (*CHD-Z* และ *CHD-W*) อัลลีล *CHD-W* มีขนาดใหญ่กว่า *CHD-Z* เล็กน้อย ทั้งสองอัลลีลมีขนาดประมาณ 230-280 คู่เบส

Wang *et al.* (2008) ใช้ไพรเมอร์ 1237L/1272H และ 2550F/2718R ในการระบุเพศนกฮูกในวงศ์ Strigidae ผลการทดลองพบว่า ไพรเมอร์ทั้งสองคู่สามารถระบุเพศนกฮูก Eurasian-scops และ Elegant ได้ แต่สำหรับนกฮูก Brown wood, Tawny fish และ Collared scops สามารถใช้ไพรเมอร์ 2550F/2718R ระบุเพศได้เพียงไพรเมอร์เดียว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Lifjeld *et al.* (2010) ระบุเพศนก *A. palustris*, *A. scirpaceus*, *A. schoenobaenus* โดยใช้ไพรเมอร์ P2/P8 ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR พบว่า *A. palustris* และ *A. scirpaceus* เพศผู้มีอัลลีล *CHD-Z* ขนาด 360 คู่เบส เพศเมียมีอัลลีล *CHD-Z* และ *CHD-W* ขนาด 360 คู่เบส และ 385 คู่เบส ตามลำดับ ส่วนนก *A. schoenobaenus* เพศผู้มีอัลลีล *CHD-Z* ขนาด 354 คู่เบส เพศเมียมีอัลลีล *CHD-Z* และ *CHD-W* ขนาด 354 คู่เบส และ 386 คู่เบส

Vucicevic *et al.* (2013) ศึกษาการระบุเพศนกทั้งหมด 58 สปีชีส์ โดยใช้ไพรเมอร์ P2/P8 และ 2550F/2718R ผลการทดลอง พบว่ามีนก 50 สปีชีส์ ที่ประสบความสำเร็จในการระบุเพศโดยใช้ไพรเมอร์ 2550F/2718R และระบุเพศได้ชัดเจนกว่าการใช้ไพรเมอร์ P2/P8 ซึ่งความแตกต่างของความยาว intron ระหว่าง 2 โครโมโซม (*CHD-Z* และ *CHD-W*) คาดว่าอยู่ในช่วง 150-250 คู่เบส

Gabor *et al.* (2014) ระบุเพศนกใน Superorder Neognathae โดยใช้ไพรเมอร์ P2/P8 ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส ใช้อะกาโรสความเข้มข้น 3.5% พบว่า เพศผู้เกิดชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 1 แถบ ขนาด 378 คู่เบส (*CHD-Z*) และเพศเมียเกิดชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 2 แถบ ขนาด 378 คู่เบส (*CHD-Z*) และ 390 คู่เบส (*CHD-W*) ผลการทดลองสรุปว่าไพรเมอร์ P2/P8 สามารถระบุเพศนกได้ทุกสปีชีส์ในอันดับ Galliformes, Anseriformes, Strigiformes, Passeriformes, Falconiformes และ Psittaciformes

Siripong *et al.* (2015) ระบุเพศนก *Himantopus himantopus* โดยใช้ไพรเมอร์ P2/P8, 1237L/1272H และ 2550F/2718R ผลการทดลอง พบว่า เฉพาะไพรเมอร์ 2550F/2718R เท่านั้นที่สามารถระบุเพศนกตีนเทียนได้ โดยเพศผู้เกิดชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 1 แถบ ขนาด ประมาณ 650 คู่เบส (*CHD-Z*) และเพศเมียเกิดชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 2 แถบ ขนาดประมาณ 650 คู่เบส (*CHD-Z*) และ 500 คู่เบส (*CHD-W*)

Malaitad *et al.* (2015) ระบุเพศนกนางแอ่นบ้าน (*Hirundo rustica*) โดยใช้ไพรเมอร์ P2/P8, 1237L/1272H และ 2550F/2718R ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส ใช้อะกาโรสความเข้มข้น 3% พบว่า ไพรเมอร์ P2/P8 สามารถระบุเพศได้ชัดเจนที่สุด เพศผู้เกิดชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 1 แถบ ขนาด ประมาณ 350 คู่เบส (*CHD-Z*) และเพศเมียเกิดชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 2 แถบ ขนาดประมาณ 350 คู่เบส (*CHD-Z*) และ 400 คู่เบส (*CHD-W*)

สุพัตรา และคณะ (2555) ระบุเพศนกแก้วบางชนิด ได้แก่ *Aratinga solstitialis*, *Myiopsitta monachus* และ *Pyrrhura perlata* โดยใช้ไพรเมอร์ 2550F/2718R ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส ใช้อะกาโรสความเข้มข้น 2% พบว่า เพศผู้เกิดชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 1 แถบ ขนาดประมาณ 650-700 คู่เบส (*CHD-Z*) และเพศเมียเกิดชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 2 แถบ ขนาดประมาณ 650-700 คู่เบส (*CHD-Z*) และ 500 คู่เบส (*CHD-W*)

ณิชาภัทร และคณะ (2556) ระบุเพศนกในสกุลนกหัวโตเล็กจำนวน 3 สปีชีส์ คือ นกหัวโตทรายเล็ก (*Charadrius mongolus*) นกหัวโตทรายใหญ่ (*C. leschenaultii*) และนกหัวโตขาดำ (*C. alexandrinus*) โดยใช้ไพรเมอร์ P2/P8, 1237L/1272H และ 2550F/2718R พบว่าเฉพาะไพรเมอร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2550F/2718R เท่านั้นที่สามารถระบุเพศนกทั้ง 3 สปีชีส์นี้ได้ โดยเพศผู้มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 1 แถบ ขนาดประมาณ 650 คู่เบส (*CHD-Z*) และเพศเมียมีชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 2 แถบ ขนาดประมาณ 650 คู่เบส (*CHD-Z*) และ 450 คู่เบส (*CHD-W*)

สุพัตรา และคณะ (2558ก) ระบุเพศนกปรอดหัวโขน (*Pycnonotus jocosus*) โดยใช้ไพรเมอร์ P2/P8 ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่า เพศผู้เกิดชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 1 แถบ ขนาดประมาณ 350 คู่เบส (*CHD-Z*) และเพศเมียเกิดชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 2 แถบ ขนาดประมาณ 350 คู่เบส (*CHD-Z*) และ 400 คู่เบส (*CHD-W*)

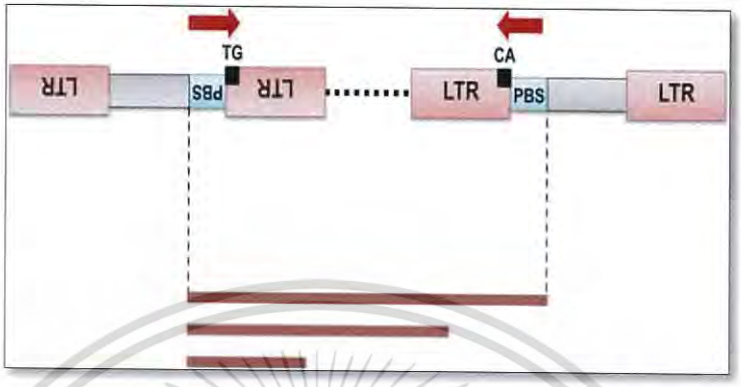
สุพัตรา และคณะ (2558ข) ระบุเพศนกนางนวลแกลบธรรมดา (*Sterna hirundo*) โดยใช้ไพรเมอร์ 2550F/2718R พบว่า เพศผู้เกิดชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 1 แถบ ขนาดประมาณ 650 คู่เบส (*CHD-Z*) และเพศเมียเกิดชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 2 แถบ ขนาดประมาณ 650 คู่เบส (*CHD-Z*) และ 450 คู่เบส (*CHD-W*)

2.3 เครื่องหมายทางโมเลกุล inter Primer Binding Site (iPBS)

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมสามารถศึกษาจากลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกได้เบื้องต้น แต่เฉพาะสิ่งมีชีวิตบางชนิดเท่านั้น (จรัสศรี และคณะ, 2557) ในสิ่งมีชีวิตที่ลักษณะภายนอกคล้ายคลึงกันมาก ไม่สามารถแยกความแตกต่างได้ เช่น นกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น จำเป็นต้องใช้เครื่องหมายทางโมเลกุลในการศึกษาหาความหลากหลายทางพันธุกรรม ซึ่งมีหลายเครื่องหมาย ตัวอย่างเช่น เครื่องหมายทางโมเลกุล iPBS (Kalendar *et al*., 2010), Sequence Related Amplified Polymorphism (SRAP) (Li and Quiros, 2001), Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) (Cocolin and Ercolini, 2008; Giraffa and Neviani, 2001; Vos *et al*., 1995) เป็นต้น เครื่องหมายเหล่านี้มีความสะดวก รวดเร็ว ถูกต้องและแม่นยำ จากงานวิจัยของวิภารัตน์ และคณะ (2558) ทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกตีนเทียน (*Himantopus himantopus*) ด้วยเครื่องหมายทางโมเลกุล iPBS ศึกษานกจำนวน 29 ตัวอย่าง แบ่งตัวอย่างเป็น 6 ลักษณะตามสีขนบริเวณกระหม่อมและท้ายทอย โดยใช้ไพรเมอร์ 2224, 2240, 2251, 2272 และ 2415 ผลการทดลองพบว่า ไม่แสดงความสัมพันธ์กับสีขนบริเวณกระหม่อมและท้ายทอยของนกตีนเทียน แต่สอดคล้องกับฤดูกาลที่เก็บตัวอย่าง โดยสามารถจำแนกนกประจำถิ่นออกจากนกอพยพได้ ในการศึกษาครั้งนี้จึงสนใจใช้เครื่องหมายทางโมเลกุล iPBS ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น เนื่องจากนกพงเป็นนกอพยพเช่นเดียวกับนกตีนเทียน วิธีนี้อาศัยหลักการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR จากการใช้ไพรเมอร์ขนาด 12-18 นิวคลีโอไทด์ เกาะที่ตำแหน่ง Primer Binding Site (PBS) เข้าไปสุ่มจับกับดีเอ็นเอเป้าหมาย Long Terminal Repeat (LTR) บริเวณ retrotransposon ดังรูปที่ 2.8 ซึ่งเป็นบริเวณที่ลำดับเบสของดีเอ็นเอมักเกิดการผันแปรทางพันธุกรรมได้ง่าย พบในสิ่งมีชีวิตในกลุ่มยูคาริโอตทุกชนิด ข้อดีของเทคนิคนี้ คือ ไม่ต้องทราบข้อมูลลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมายมาก่อน ทำได้ง่าย ไม่ซับซ้อน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค่าใช้จ่ายไม่สูง ให้ข้อมูลมาก ใช้ปริมาณดีเอ็นเอน้อยเพียง 25-100 นาโนกรัม (ng) ต่อปฏิกิริยา และให้รูปแบบดีเอ็นเอที่มีความคงตัวสูง เมื่อทำการทดลองซ้ำให้ผลเหมือนเดิม (Kalendaret *et al.*, 2011)



รูปที่ 2.8 แสดงการเข้าเกาะของไพรเมอร์ที่ตำแหน่ง LTR (กำหนดให้ LTR คือ Long Terminal Repeat, PBS คือ Primer Binding Site และ TG และ CA คือลำดับเบสบริเวณ LTR) (ที่มา: http://www.plantmethods.com/content/9/1/6)

นอกจากนี้ยังนำเครื่องหมายทางโมเลกุล iPBS มาประยุกต์ใช้กับสิ่งมีชีวิตต่างๆ เช่น

สุพัตรา และคณะ (2558ข) ศึกษาความหลากหลายของนกนางนวลแกลบธรรมดา (*Sterna hirundo*) จำนวน 14 ตัวอย่าง ด้วยเครื่องหมายทางโมเลกุล iPBS โดยคัดเลือกไพรเมอร์จาก 32 ไพรเมอร์ พบว่า มีเพียง 5 ไพรเมอร์ ได้แก่ 2224, 2230, 2378, 2398 และ 2401 ที่ให้แถบดีเอ็นเอชัดเจนและวิเคราะห์แถบได้ ผลการทดลองจาก Dendrogram สรุปว่าที่ค่า coefficient เท่ากับ 0.86 สามารถแบ่งกลุ่มนกนางนวลแกลบธรรมดาออกเป็น 2 กลุ่ม

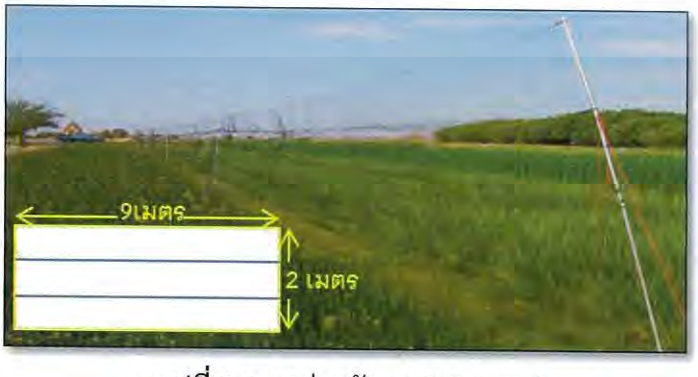
Mehmood *et al.*, (2013) ศึกษาความหลากหลายของฝรั่ง (*Psidium guajava* Linn) จำนวน 19 ตัวอย่าง โดยใช้ไพรเมอร์ 6 ตัว ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของฝรั่ง คือ 2079, 2238, 2241, 2251, 2228 และ 2376 ผลการวิเคราะห์พบว่า ฝรั่งแบ่งเป็น 5 กลุ่ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 ตัวอย่าง

จับนกด้วยวิธีการตั้งตาข่ายดักนก (Mist net) จำนวน 25 ผืน แต่ละผืนมีขนาดความกว้าง 2 เมตร และความยาว 9 เมตร ดังรูปที่ 3.1 วิธีนี้เป็นการดักนกเพื่อการศึกษามากที่สุด เหมาะสำหรับดักนกอพยพ นกป่า และนกชายเลน เพื่อให้นกบาดเจ็บน้อยที่สุด จึงใช้ตาข่ายที่ทำจากเส้นด้ายพิเศษ (กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช, 2553) เมื่อดักจับนกแล้ว ทำการใส่ห่วงขาบันทึกข้อมูลรายละเอียดเกี่ยวกับตัวนกพร้อมถ่ายรูปภาพประกอบ ดำเนินการโดยเจ้าหน้าที่จากสถานีวิจัยสัตว์ป่าบึงบอระเพ็ด ในโครงการการศึกษาปักษีวิทยาโดยการใส่ห่วงขา จากนั้นเก็บตัวอย่างนกเพื่อใช้ในการศึกษาครั้งนี้ โดยเก็บตัวอย่างเลือด หรือขนผลัดของนก หรือเก็บดีเอ็นเอโดยใช้กระดาษ FTA แล้วปล่อยนกคืนสู่ธรรมชาติ ในการเก็บตัวอย่างนกพงบริเวณเขตห้ามล่าสัตว์ป่าบึงบอระเพ็ด ตำบลพระอำเภอเมือง จังหวัดนครสวรรค์ ทำการเก็บจาก 11 สถานที่ ได้แก่ เกาะตาเรือง ทางเข้าประมงเชิงพาณิชย์ เนินระฆัง สวนบัว ทางเข้าเขตห้ามล่า แหลมตาเสง แหลมนา เกาะดร.ยอร์ช ประมงเชิงพาณิชย์ เกาะวัด และคันเหมือง เก็บตัวอย่างนกพงได้จำนวน 100 ตัวอย่าง ประกอบด้วย 5 สปีชีส์ ดังตารางที่ 3.1 และได้รับความอนุเคราะห์ซากนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่นจำนวน 2 ตัวอย่าง จากสถานีวิจัยสัตว์ป่า เพื่อใช้ในการศึกษาครั้งนี้ (กำหนดรหัสเป็น NP09, NP10 และไม่รวมอยู่ในตัวอย่างที่กำลังศึกษาจำนวน 100 ตัวอย่าง) ดังนั้นจึงทำการระบุเพศนกจำนวน 100 ตัวอย่าง และศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น 3 สถานที่ ได้แก่ เกาะตาเรืองจำนวน 5 ตัวอย่าง (NP17, NP18, NP39, NP40, NP41) ทางเข้าประมงเชิงพาณิชย์จำนวน 8 ตัวอย่าง (NP45, NP47, NP48, NP50, NP66, NP67, NP68, NP69) และเนินระฆังจำนวน 2 ตัวอย่าง (NP74, NP75) รวมทั้งหมด 15 ตัวอย่าง เนื่องจากในการเก็บตัวอย่าง 3 สถานที่นี้พบนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่นจำนวนมากกว่าอีก 8 สถานที่



รูปที่ 3.1 ตาข่ายดักนก (Mist net)
(ที่มา: กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช, 2553)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.1 แสดงจำนวนตัวอย่างนกพงแต่ละสปีชีส์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้

สปีชีส์	จำนวน (ตัวอย่าง)
นกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น (*Acrocephalus oreintalis*)	26
นกพงคิ้วดำ (*A. bistrigiceps*)	32
นกพงปากหนา (*A. aedon*)	31
นกพงตั๊กแตนอกลาย (*Locustella lanceolata*)	4
นกพงตั๊กแตนท้ายทอยสีเทา (*L. certhiola*)	7
รวม	100

3.2 วัสดุและอุปกรณ์

3.2.1 Alcohol burner

3.2.2 Autoclave

3.2.3 Autopipette

3.2.4 Centrifuge

3.2.5 Electrophoresis system

3.2.6 Forceps

3.2.7 Glass Plate

3.2.8 Heat box

3.2.9 Hematocrit tube or Capillary tube

3.2.10 Hot air oven

3.2.11 Microwave

3.2.12 Pouncher

3.2.13 Scalpel

3.2.14 Spectrophotometer

3.2.15 Spin down

3.2.16 Syringes เข็มสำหรับเจาะเลือด ขนาด 24Gx1", 25Gx1" และ 26Gx1"

3.2.17 Thermal cycler

3.2.18 Tip

3.2.19 Tube ขนาด 0.2, 1.5 มิลลิลิตร

3.2.20 UV transilluminator

3.2.21 Vortex

3.2.22 Water bath

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 สารเคมี

3.3.1 Absolute ethanol 99.5%

3.3.2 Agarose

3.3.3 DNA ladder ขนาด 1 kb, 100 bp และ 50 bp

3.3.4 DI water

3.3.5 Distillation water

3.3.6 dNTPs

3.3.7 Ethanol 70%

3.3.8 Ethidium bromide

3.3.9 FTA purification reagent

3.3.10 6x Gel loading dye blue

3.3.11 GF-1 Blood DNA Extraction Kit (บริษัท Vivantis)

3.3.12 GF-1 Tissue DNA Extraction Kit (บริษัท Vivantis)

3.3.13 Povidone iodine

3.3.14 Proteinase K

3.3.15 Rnase A

3.3.16 *Taq* DNA polymerase (บริษัท Biolabs)

3.3.17 *2x Taq* master mix (บริษัท Vivantis)

3.3.18 10X TBE buffer

3.3.19 0.1 mM TE buffer เตรียมจาก 10M TE buffer

3.3.20 Primer

3.3.20.1 สำหรับการระบุเพศนก คือ (5'-TCTGCATCGCTAAATCCTTT-3') / P8 (5'-CTCCCAAGGATGAGRAAYTG-3') (Griffiths *et al*., 1998), 1237L (5'-GAGAAACTGTGCAA-AACAG-3') / 1272H (5'-TCCAGAATATCTTCTGCTCC-3') (Kahn *et al*., 1998) และ 2550F (5'-GTTACTGATTCGTCTACGAGA-3') / 2718R (5'-ATTGAAATGATCCAGTGCTTG-3') (Fridolfsson and Ellegren, 1999)

3.3.20.2 สำหรับศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายทางโมเลกุล iPBS เลือกไพรเมอร์ 40 ไพรเมอร์ จากงานวิจัย Kalendar *et al*. (2010) โดยเลือกตามค่า PCR efficient ที่ให้ประสิทธิภาพดีทั้งในพืช (ข้าวบาร์เลย์) และสัตว์ (วัว) เพื่อความสะดวกในการศึกษาครั้งนี้จึงจัดกลุ่มไพรเมอร์เป็น 5 กลุ่ม ตามค่าอุณหภูมิ annealing (Ta) แสดงดังตารางที่ 3.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.2 แสดงกลุ่ม ลำดับเบส และค่า Ta เฉลี่ยของไพรเมอร์ ในเทคนิค iPBS

กลุ่ม	ไพรเมอร์	ลำดับเบส	ค่า Ta (°C)	ค่าเฉลี่ย Ta
1	2074	5'-GCTCTGATACCA-3'	49.6	
	2389	5'-ACATCCTTCCCA-3'	50.0	
	2402	5'-TCTAAGCTCTTGATACCA-3'	50.0	
	2382	5'-TGTTGGCTTCCA-3'	50.5	
	2373	5'-GAACTTGCTCCCGATGCCA-3'	51.0	
	2400	5'-CCCCTCCTTCTAGCGCCA-3'	51.0	50.7
	2398	5'-GAACCCTTGCCGATACCA-3'	51.0	
	2256	5'-GACCTAGCTCTAATACCA-3'	51.0	
	2253	5'-TCGAGGCTCTAGATACCA-3'	51.0	
	2252	5'-TCATGGCTCATGATACCA-3'	51.6	
	2385	5'-CCATTGGGTCCA-3'	51.2	
	2217	5'-ACTTGGATGTCGATACCA-3'	51.4	
2	2277	5'-GGCGATGATACCA-3'	52.0	
	2231	5'-ACTTGGATGCTGATACCA-3'	52.0	
	2392	5'-TAGATGGTGCCA-3'	52.2	
	2375	5'-TCGCATCAACCA-3'	52.5	
	2229	5'-CGACCTGTTCTGATACCA-3'	52.5	
	2230	5'-TCTAGGCGTCTGATACCA-3'	52.9	
	2401	5'-AGTTAAGCTTTGATACCA-3'	53.0	52.7
	2378	5'-GGTCCTCATCCA-3'	53.0	
	2377	5'-ACGAAGGGACCA-3'	53.0	
	2222	5'-ACTTGGATGCCGATACCA-3'	53.0	
	2219	5'-GAACTTATGCCGATACCA-3'	53.0	
	2251	5'-GAACAGGCGATGATACCA-3'	53.2	
	2374	5'-CCCAGCAAACCA-3'	53.5	
3	2083	5'-CTTCTAGCGCCA-3'	54.6	
	2272	5'-GGCTCAGATGCCA-3'	55.0	
	2240	5'-AACCTGGCTCAGATGCCA-3'	55.0	55.1
	2077	5'-CTCACGATGCCA-3'	55.1	
	2224	5'-ATCCTGGCAATGGAACCA-3'	55.4	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.2 (ต่อ)

กลุ่ม	ไพรเมอร์	ลำดับเบส	ค่า Ta (°C)	ค่าเฉลี่ย Ta
3	2232	5'-AGAGAGGCTCGGATACCA-3'	55.4	55.1
4	2238	5'-ACCTAGCTCATGATGCCA-3'	56.0	
	2273	5'-GCTCATCATGCCA-3'	56.5	
	2394	5'-GAGCCTAGGCCA-3'	56.5	56.6
	2242	5'-GCCCCATGGTGGGCGCCA-3'	57.0	
	2220	5'-ACCTGGCTCATGATGCCA-3'	57.0	
5	2295	5'-AGAACGGCTCTGATACCA-3'	60.0	
	2415	5'-CATCGTAGGTGGGCGCCA-3'	61.0	62.2
	2078	5'-GCGGAGTCGCCA-3'	62.8	
	2079	5'-AGGTGGGCGCCA-3'	65.2	

3.4 วิธีการ

3.4.1 การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างเลือด หรือกระดาษ FTA หรือขนของนกพง ในการเก็บตัวอย่างจะเก็บอย่างระมัดระวังเพื่อให้นกบาดเจ็บน้อยที่สุด โดยมีวิธีการเก็บตัวอย่างต่างๆ ดังนี้

3.4.1.1 เลือดนก (Blood)

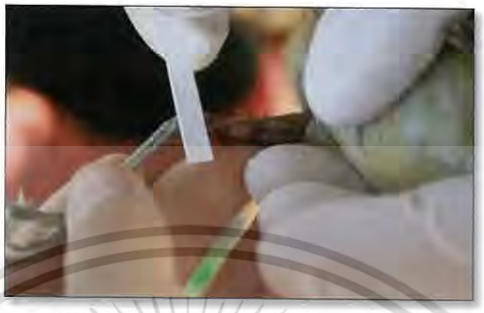
ทำความสะอาดบริเวณขาของนกที่ต้องการเจาะด้วยแอลกอฮอล์ 70% เจาะเลือดจากเส้นเลือดบริเวณขาของนก ใช้เข็มขนาด 24Gx1" หรือ 25Gx1" หรือ 26Gx1" ดังรูปที่ 3.2 ก เก็บเลือดโดยใช้ Hematocrit tube ดังรูปที่ 3.2 ข นำเลือดมาใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 ml ปริมาตรอย่างน้อยประมาณ 25 µl ก่อนปล่อยนกคืนสู่ธรรมชาติต้องห้ามเลือดนกโดยหยด Povidone iodine ลงบนสำลีแล้วกดบริเวณที่เจาะเลือด เมื่อแน่ใจว่าเลือดหยุดแล้วจึงสามารถปล่อยนกได้ เก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ 4 ถึง -20 °C จนกว่าจะนำมาวิเคราะห์

รูปที่ 3.2 (ก) แสดงการเจาะเลือดจากเส้นเลือดบริเวณขาของนก (ข) ใช้ Hematocrit tube เก็บเลือด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.1.2 กระดาษ FTA (FTA Card)

หลังจากเจาะเลือดนกแล้วหากมีปริมาณเลือดน้อย (ไม่สามารถใช้ Hematocrit tube เก็บเลือดได้) ให้ใช้กระดาษ FTA ป้ายเลือด หรือซับด้วยกระดาษ FTA ดังรูปที่ 3.3 จากนั้นนำกระดาษ FTA ที่ได้เก็บใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 ml แล้วเก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิห้องจนกว่าจะนำมาวิเคราะห์



รูปที่ 3.3 แสดงการใช้กระดาษ FTA ป้ายหรือซับเลือด

3.4.1.3 ขนนก (Feather)

เลือกเก็บขนผลัดที่มีปลอกขนโดยใช้ Forceps จับบริเวณโคนปลอกขนแล้วดึงนำมาเก็บใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 ml จากนั้นเติม 70% Alcohol ให้ท่วมขน แล้วเก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิห้องจนกว่าจะนำมาวิเคราะห์

3.4.1.4 ซากนก

ได้รับความอนุเคราะห์ซากนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น จากสถานีวิจัยสัตว์ป่าบึงบอระเพ็ด จังหวัดนครสวรรค์ เพื่อใช้ในการศึกษาครั้งนี้จำนวน 2 ตัว (กำหนดรหัส NP09 และ NP10) เก็บซากนกที่อุณหภูมิ -20 °C จนกว่าจะนำมาวิเคราะห์

3.4.2 การสกัดดีเอ็นเอ

3.4.2.1 การสกัดดีเอ็นเอจากเลือดนก

ใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป GF-1 Blood DNA Extraction Kit โดยเติม Buffer BB ปริมาตร 200 µl ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 ml ที่เก็บเลือดอย่างน้อย 25 µl จากนั้นเติม proteinase K ปริมาตร 20 µl และผสมให้เข้ากันเบาๆ โดยพลิกหลอดไปมา นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นระยะเวลา 1-3 ชั่วโมง (บ่มจนกระทั่งเลือดกับสารละลายผสมเป็นเนื้อเดียวกัน) เมื่อครบเวลาเติม RNase A ปริมาตร 20 µl ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นระยะเวลา 5 นาที เติม 99.5% cool absolute ethanol ปริมาตร 200 µl พลิกหลอดไปมาให้ผสมกันทันที จากนั้นย้ายตัวอย่างลงในคอลัมน์ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,500 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 °C เป็นระยะเวลา 1 นาที จากนั้นเทส่วนใสทิ้ง ล้างคอลัมน์ครั้งที่ 1 ด้วย wash buffer 1 ปริมาตร 500 µl และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,500 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 °C เป็นระยะเวลา 1 นาที จากนั้นเทส่วนใสทิ้ง ล้างคอลัมน์ครั้งที่ 2 ด้วย wash buffer 2 ปริมาตร 500 µl นำไปปั่นเหวี่ยงที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความเร็วรอบ 6,500 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 °C เป็นระยะเวลา 1 นาที จากนั้นเทส่วนใสทิ้ง ล้างคอลัมน์ครั้งที่ 3 ด้วย wash buffer 2 ปริมาตร 500 µl นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,500 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 °C เป็นระยะเวลา 1 นาที จากนั้นเทส่วนใสทิ้ง ทำการระเหยแอลกอฮอล์ออกจากคอลัมน์โดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 9,500 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 °C เป็นระยะเวลา 3 นาที จากนั้นนำคอลัมน์ย้ายลงหลอดทดลองขนาด 1.5 ml หลอดใหม่ ทำการชะดีเอ็นเอออกจากคอลัมน์โดยเติม Elution buffer ปริมาตร 25-50 µl (Elution buffer ต้องมีอุณหภูมิ 65 °C) ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 2 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,500 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 °C เป็นระยะเวลา 1 นาที ทำซ้ำอีกครั้ง และเก็บดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ 4 ถึง -20 °C

3.4.2.2 การสกัดดีเอ็นเอจากขนนก

ใช้ forceps คีบตัวอย่างขนนกออกจาก 70% Ethanol ใส่ลงในเพลทแก้วใช้มีดผ่าตัดตัดบริเวณปลอกขนที่มีเนื้อเยื่อติดอยู่มาสับให้ละเอียด โดยใช้เทคนิคปลอดเชื้อ (Aseptic Techniques) (ระหว่างสับขนอาจมีการเติม TL Buffer เพื่อป้องกันไม่ให้ขนที่สับฟุ้งกระจาย โดยเติมครั้งละ 50 µl) จากนั้นย้ายใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 ml หลอดใหม่ เติม TL Buffer ให้ครบปริมาตร 200 µl จากนั้นเติม Proteinase K ปริมาตร 25 µl และ Lysis Enhancer ปริมาตร 20 µl ผสมสารให้เข้ากันเบาๆ โดยพลิกหลอดไปมานำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นระยะเวลา 1-3 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา เติม RNase A ปริมาตร 20 µl ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นระยะเวลา 10 นาที จากนั้นเติม TB Buffer ปริมาตร 620 µl (ปริมาตรเป็น 2 เท่าของปริมาตรสารที่เติมจากขั้นตอนก่อนหน้า) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นระยะเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลา เติม 99.5% cool absolute ethanol ปริมาตร 200 µl พลิกหลอดไปมาให้ผสมกันทันที จากนั้นดูดสารละลายย้ายใส่คอลัมน์ (ระวังอย่าดูดขนติดไปมาก เพราะขนจะทำให้คอลัมน์ตัน) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว รอบ 6,500 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 °C เป็นระยะเวลา 1 นาที จากนั้นเทส่วนใสทิ้ง ล้างคอลัมน์ด้วย wash buffer ปริมาตร 650 µl และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,500 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 °C เป็นระยะเวลา 1 นาที จากนั้นเทส่วนใสทิ้ง ทำการระเหยแอลกอฮอล์ออกจากคอลัมน์โดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 9,500 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 °C เป็นระยะเวลา 3 นาที จากนั้นนำคอลัมน์ย้ายลงหลอดทดลองขนาด 1.5 ml หลอดใหม่ ทำการชะดีเอ็นเอออกจากคอลัมน์โดยเติม Elution buffer ปริมาตร 25-50 µl (Elution buffer ต้องมีอุณหภูมิ 65 °C) ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 2 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,500 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 °C เป็นระยะเวลา 1 นาที ทำซ้ำอีกครั้ง และเก็บดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ 4 ถึง -20 °C

3.4.2.3 การทำให้ดีเอ็นเอบนกระดาษ FTA บริสุทธิ์

ทำความสะอาด poucher ขนาด 2 mm ด้วย 70% Alcohol นำไปเจาะบนกระดาษ FTA ที่มีตัวอย่างเลือด เลือกเจาะบริเวณที่มีตัวอย่างเลือดบางๆ จากนั้นนำชิ้นกระดาษ FTA ที่เจาะ (2-3 ชิ้น) ใส่ลงในหลอดทดลอง 0.2 ml ทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์โดยการเติม FTA purification reagent ปริมาตร 125 µl จากนั้นดีดหลอดและนำไป vortex ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นระยะเวลา 5 นาที เมื่อครบเวลา ดีดหลอดอีกรอบจนสารละลายเป็นฟองนำไปใส่ heat box ที่มีอุณหภูมิ 65 °C เป็นระยะเวลา 10 นาที แล้วดูดสารละลายออก ทำซ้ำอีกหนึ่งรอบ และหยุดการทำงานของ FTA purification reagent ด้วย 0.1 mM TE buffer ปริมาตร 125 µl ดีดหลอดและนำไป vortex จากนั้นนำไปใส่ heat box ที่มีอุณหภูมิ 65 °C เป็นระยะเวลา 10 นาที (เวลาบ่มให้กระดาษที่มีเลือดอยู่คว่ำลงมาที่น้ำ) เมื่อครบเวลาดูดสารละลายออก ทำซ้ำอีกครั้ง จากนั้นนำกระดาษ FTA ที่ได้ไปทำให้แห้งโดยใส่ใน heat box ที่มีอุณหภูมิ 65 °C เปิดฝาหลอดทดลองไว้ บ่มจนกว่ากระดาษแห้ง ซึ่งสามารถทดสอบการแห้งโดยปิดฝาหลอด แล้วดีดหลอด หากกระดาษเคลื่อนที่ไม่ติดหลอดจึงถือว่าแห้ง

3.4.2.4 การสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อของซากนก

ตัดชิ้นส่วนเนื้อบริเวณขาของนก ดึงหนังและขนออก จากนั้นนำชิ้นเนื้อมาสับให้ละเอียดบนเพลทแก้วโดยใช้เทคนิคปลอดเชื้อ นำเนื้อเยื่อที่สับแล้วใส่หลอดทดลองประมาณ 1 ใน 5 ของความสูงหลอดทดลองขนาด 1.5 ml เติม TL Buffer ปริมาตร 250 µl เติม Proteinase K ปริมาตร 25 µl และเติม Lysis Enhancer ปริมาตร 20 µl ผสมสารให้เข้ากันเบาๆ โดยพลิกหลอดไปมานำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นระยะเวลา 1-3 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา เติม RNase A ปริมาตร 20 µl ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นระยะเวลา 10 นาที จากนั้น เติม TB Buffer ปริมาตร 620 µl (ปริมาตรเป็น 2 เท่าของปริมาตรสารที่เติมจากขั้นตอนก่อนหน้า) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นระยะเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลา เติม 99.5% cool absolute ethanol ปริมาตร 200 µl พลิกหลอดไปมาให้ผสมกันทันที จากนั้นดูดสารละลายย้ายใส่คอลัมน์ (ระวังอย่าดูดขนติดไปมาก เพราะขนจะทำให้คอลัมน์ตัน) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว รอบ 6,500 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 °C เป็นระยะเวลา 1 นาที จากนั้นเทส่วนใสทิ้ง ล้างคอลัมน์ด้วย wash buffer ปริมาตร 650 µl และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,500 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 °C เป็นระยะเวลา 1 นาที จากนั้นเทส่วนใสทิ้ง ทำการระเหยแอลกอฮอล์ออกจากคอลัมน์โดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 9,500 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 °C เป็นระยะเวลา 3 นาที จากนั้นนำคอลัมน์ย้ายลงหลอดทดลองขนาด 1.5 ml หลอดใหม่ ทำการชะดีเอ็นเอออกจากคอลัมน์โดยเติม Elution buffer ปริมาตร 25-50 µl (Elution buffer ต้องมีอุณหภูมิ 65 °C) ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 2 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,500 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 °C เป็นระยะเวลา 1 นาที ทำซ้ำอีกครั้ง และเก็บดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ 4 ถึง-20 °C

3.4.3 การศึกษาคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอ

ตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส อะกาโรสความเข้มข้น 1% ใช้ 3X loading dye ปริมาตร 3 µl ผสมกับตัวอย่างดีเอ็นเอ ปริมาตร 3 µl หยอดลงในหลุมเจล โดยใช้ดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบขนาด 1 กิโลเบส ปริมาตร 2 ไมโครลิตร เป็นตัวเปรียบเทียบ และตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer นำดีเอ็นเอที่สกัดได้ปริมาตร 5 µl ผสมกับน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 495 µl (Dilution Factor = 100) ผสม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ให้เข้ากันด้วย vortex ดูดสารละลายทั้งหมดลงในคิวเวต หาค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และ 280 นาโนเมตร โดย ใช้น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อเป็นค่ามาตรฐาน (Blank) คำนวณหาปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอ จากสูตร ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (ng/ml) = A_{260}×50× Dilution Factor ในการศึกษานี้ใช้ความเข้มข้นดีเอ็นเอในปฏิกิริยา 100 ng/µl หากวัดแล้วความเข้มข้นดีเอ็นเอมากกว่า 100 ng/µl ให้เจือจางดีเอ็นเอด้วย DI water หากวัดแล้วความเข้มข้นดีเอ็นเอน้อยกว่า 100 ng/µl ให้ใส่ดีเอ็นเอปริมาตรเพิ่มขึ้นในปฏิกิริยา

3.4.4 การระบุเพศนก

3.4.4.1 การศึกษาเพศนกโดยผ่าเปิดช่องท้องซากนก

ในการศึกษาเพศโดยดูจากอวัยวะภายในได้รับความอนุเคราะห์จาก คุณเลอสรรค์ วศิโนภาส นิสิตปริญญาเอก ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ให้ความรู้การผ่าเปิดช่องท้องซากนกดูอวัยวะสืบพันธุ์ เพื่อใช้เป็นตัวควบคุมประสิทธิภาพของเทคนิค PCR ในการระบุเพศครั้งนี้

3.4.4.2 การคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการระบุเพศนก

นำตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดเนื้อเยื่อของซากนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น จำนวน 2 ตัวอย่าง (NP09, NP10) เป็นตัวคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการระบุเพศของนกพงจากไพรเมอร์ 3 คู่ (forward primer/reverse primer) คือ P2/P8 (Griffiths *et al.*, 1998) 1237L/1272H (Kahn *et al.*, 1998) และ 2550F/2718R (Fridolfsson and Ellegren, 1999) ด้วยเทคนิค PCR ซึ่งส่วนประกอบสารเคมีในปฏิกิริยา ดังนี้ 2X *taq* master mix ปริมาตร 10 µl, 20 pmole/µl forward primer ปริมาตร 1 µl, 20 pmole/µl reverse primer ปริมาตร 1 µl, 100 ng/µl DNA template ปริมาตร 1 µl, DI water ปริมาตร 7 µl นำเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (thermal cycler) เพื่อเพิ่มปริมาณยีน *CHD* ด้วยสภาวะดังตารางที่ 3.3 หลังจากเสร็จสิ้นปฏิกิริยานำผลิตภัณฑ์ PCR มาตรวจสอบผลด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้อะกาโรสความเข้มข้น 2%

ตารางที่ 3.3 แสดงขั้นตอน อุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบในเทคนิค PCR เพื่อระบุเพศนก

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (วินาที)	จำนวนรอบ
Initial denaturation	95	300	1
Denaturation	95	60	35
Annealing	51-57	60	
Extention	72	60	
Final Extention	72	600	1

(ที่มา: ดัดแปลงจาก Chang. *et al.*, 2008)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.4.3 ระบุเพศตัวอย่างนกด้วยเทคนิคระดับโมเลกุล

ทำการระบุเพศนกพงจำนวน 100 ตัวอย่าง ด้วยไพรเมอร์และอุณหภูมิ annealing (Ta) ที่ให้แถบดีเอ็นเอชัดเจน สามารถระบุเพศได้ กรณีใช้ดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดเลือดหรือ ขน ในการระบุเพศของนก มีส่วนประกอบสารเคมีในปฏิกิริยา PCR ดังนี้ 2X *taq* master mix ปริมาตร 10 µl, 20 pmole/µl forward primer ปริมาตร 3 µl, 20 pmole/µl reverse primer ปริมาตร 3 µl, 100 ng/µl DNA template ปริมาตร 1 µl, DI water ปริมาตร 3 µl

กรณีใช้ดีเอ็นเอบนกระดาษ FTA ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วในการระบุเพศของนก มีส่วนประกอบสารเคมีในปฏิกิริยา PCR ดังนี้ 2X *taq* master mix ปริมาตร 10 µl, 20 pmole/µl forward primer ปริมาตร 3 µl, 20 pmole/µl reverse primer ปริมาตร 3 µl, DI water ปริมาตร 4 µl, กระดาษ FTA ที่ผ่านการทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์แล้ว 1-2 ชิ้น จากนั้นนำเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม เพื่อเพิ่มปริมาณยีน *CHD* ด้วยสภาวะเดียวกับที่ใช้คัดเลือกไพรเมอร์ (ตารางที่ 3.3) หลังจากนั้นนำผลิตภัณฑ์ PCR มาตรวจสอบผลด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้อะกาโรสความเข้มข้น 2%

3.4.5 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายทางโมเลกุล inter Primer Binding Site (iPBS)

3.4.5.1 คัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม

ใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดเนื้อเยื่อของซากนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น (NP10) ในการคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมสำหรับศึกษาความหลากหลายจากไพรเมอร์ 40 ไพรเมอร์ โดยปฏิกิริยา PCR ด้วยเครื่องหมายทางโมเลกุล iPBS ใช้อุณหภูมิ Ta ของแต่ละไพรเมอร์ตามตารางที่ 3.2 คือ อุณหภูมิในช่วง 50.7-62.2 °C ซึ่งส่วนประกอบสารเคมีในปฏิกิริยา ดังนี้ *Taq* polymerase ปริมาตร 0.2 µl, Stand taq buffer ปริมาตร 2 µl, 20 pmole/µl Primer ปริมาตร 1 µl, 1.25 mM Mix dNTPs ปริมาตร 4 µl, $MgCl_2$ ปริมาตร 0.2 µl, DI water ปริมาตร 10.6 µl, 100 ng/µl DNA template ปริมาตร 2 µl นำเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ใช้สภาวะดังตารางที่ 3.4 หลังจากนั้นนำผลิตภัณฑ์ PCR มาตรวจสอบผลด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้อะกาโรสความเข้มข้น 2%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.4 แสดงขั้นตอน อุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายทางโมเลกุล iPBS

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (วินาที)	จำนวนรอบ
Initiation denaturation	95	180	1
Denaturation	95	15	
Annealing	50.7-62.2	60	30
Extention	68	60	
Final extention	72	300	1

(ที่มา: ดัดแปลงจาก Kalendar *et al.*, 2010)

3.4.5.2 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม

เลือกไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอชัดเจน จำนวนแถบมาก แต่ละแถบแยกออกจากกัน เหมาะสำหรับศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมประมาณ 4-5 ไพรเมอร์ หรือมากกว่า นำมาทำปฏิกิริยา PCR กับดีเอ็นเอของตัวอย่างนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่นที่สุ่มจาก 3 สถานที่ จำนวน 15 ตัวอย่าง เนื่องจาก 3 สถานที่นี้สามารถเก็บตัวอย่างนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่นได้จำนวนมาก และเพียงพอในการศึกษาครั้งนี้ ได้แก่ เกาะตาเรือง (NP17, NP18, NP39, NP40, NP41) ทางเข้าประมงเชิงพาณิชย์ (NP45, NP47, NP48, NP50, NP66, NP67, NP68, NP69) และเนินระฆัง (NP74, NP75) ด้วยเครื่องหมายทางโมเลกุล iPBS หลังจากนั้นนำผลิตภัณฑ์ PCR มาตรวจสอบผลด้วยวิธีอิเล็กโทร-โฟรีซิส โดยใช้อะกาโรสความเข้มข้น 2%

3.4.5.3 การแปลผลและวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้โปรแกรม NTSYSpc 2.1X

หลังจากนำผลิตภัณฑ์ PCR มาตรวจสอบผลด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้อะกาโรสความเข้มข้น 2% จะแปลผลจากแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ เปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอแต่ละตัวอย่างที่เกิดขึ้น ณ ตำแหน่งเดียวกัน โดยตัวอย่างใดพบแถบให้คะแนนเป็น 1 ส่วนตัวอย่างใดไม่พบแถบดีเอ็นเอให้คะแนนเป็น 0 กรอกข้อมูลใส่ลงใน Microsoft Excle จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป NTSYSpc 2.1X เพื่อสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ (Dendrogram) โดยเลือกวิธีการจัดแบบ Unweightede Pair Group Method Using Arithmetic Average (UPGMA)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลและการอภิปรายผลการทดลอง

4.1 ผลการระบุเพศนก

4.1.1 ผลการตรวจสอบเพศนกจากซากนก

ตรวจสอบเพศซากนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น จำนวน 2 ตัวอย่าง รหัส NP09 และ NP10 โดยการผ่าเปิดช่องท้องของซากนกเพื่อดูอวัยวะสืบพันธุ์ภายใน หากพบอวัยวะสืบพันธุ์ภายในลักษณะคล้ายพูวงรีสีครีม-เหลือง 2 ชิ้นติดกัน ดังรูปที่ 4.1 ก แสดงลักษณะของเพศผู้ และหากอวัยวะสืบพันธุ์ภายในเป็นถุงกลม 1 ถุง ภายในประกอบด้วยไข่สีขาวขนาดเล็กจำนวนมาก ดังรูปที่ 4.1 ข แสดงลักษณะของเพศเมีย ผลการผ่าเปิดช่องท้องพบว่า รหัส NP09 เป็นนกเพศผู้ และ NP10 เป็นนกเพศเมีย

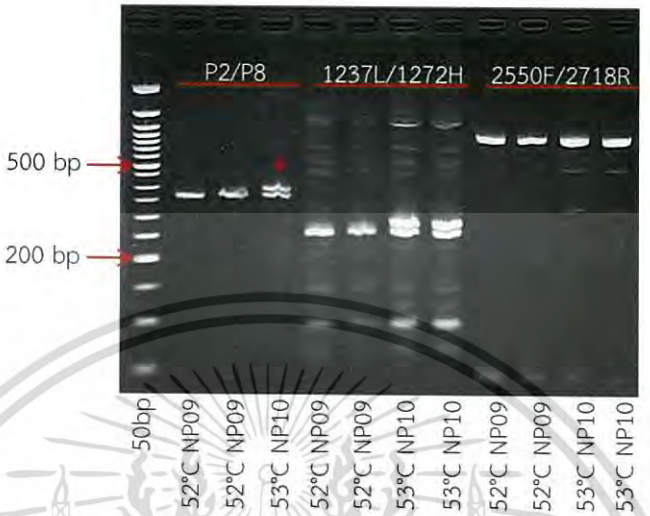
รูปที่ 4.1 แสดงลักษณะอวัยวะสืบพันธุ์ภายใน (ก) เพศผู้ (Testis) (ข) เพศเมีย (Ovary)
(ที่มา: ถ่ายภาพโดย อรณิช ดีสิทธิเวช, 2558)

4.1.2 ผลการเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการระบุเพศของนกด้วยเทคนิค PCR

ใช้ซากนกที่ทราบเพศจากการดูอวัยวะสืบพันธุ์ในข้อ 4.1.1 มาทดสอบหาไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการระบุเพศนก โดยใช้อุณหภูมิ annealing ที่ 52 °C และ 53 °C นำมาทำกับทั้ง 2 ตัวอย่าง (NP09 และ NP10) หลังจากตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสใช้อะกาโรสความเข้มข้น 2% พบว่า ไพรเมอร์ P2/P8 ให้แถบดีเอ็นเอนกเพศผู้ 1 แถบของอัลลีล *CHD-Z* และเพศเมีย 2 แถบของอัลลีล *CHD-Z* และ *CHD-W* ดังรูป 4.2 ช่อง 2-4 ส่วนไพรเมอร์ 1237L/1272H ปรากฏแถบดีเอ็นเออื่นนอกเหนือจากแถบของยีน *CHD* ดังรูป 4.2 ช่องที่ 4-7 และไพรเมอร์ 2550F/2718R ให้แถบดีเอ็นเอแถบเดียวทั้งในตัวอย่างเพศผู้และเพศเมีย ดังรูป 4.2 ช่องที่ 9-12 และจากรูป 4.2 ช่องที่ 1 คือแถบดีเอ็นเอมาตรฐานทราบขนาด 50 คู่เบส ดังนั้นไพรเมอร์ที่เหมาะสมและสามารถระบุเพศนกพงได้ คือ P2/P8 อุณหภูมิ annealing ที่ 53 °C สอดคล้องกับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

งานวิจัยของ Griffiths *et al.* (1998) ใช้ไพรเมอร์ P2/P8 ศึกษาการระบุเพศในนก *Acrocephalus baeticatus* ซึ่งเป็นนกในสกุลเดียวกับนกพง ผลการทดลองพบว่า เพศผู้เกิดชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 1 แถบ (*CHD-Z*) และเพศเมียเกิดชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 2 แถบ (*CHD-Z* และ *CHD-W*)

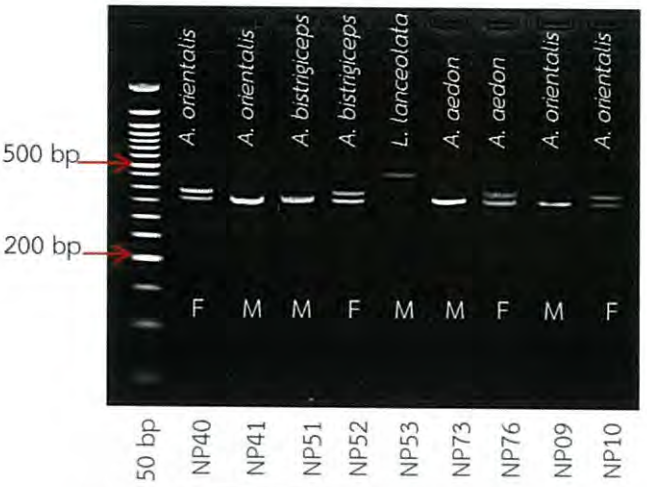


รูปที่ 4.2 ผลการเปรียบเทียบไพรเมอร์ P2/P8, 1237L/1272H และ 2550F/2718R ที่อุณหภูมิ annealing 52 °C และ 53 °C จากตัวอย่างซากนกเพศผู้ (NP09) และเพศเมีย (NP10) และแถบดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบขนาด 50 คู่เบส

4.1.3 ผลการระบุเพศนกด้วยเทคนิคระดับโมเลกุล

ใช้ไพรเมอร์ P2/P8 อุณหภูมิ annealing ที่ 53 °C ในการระบุเพศนกพงจำนวน 100 ตัวอย่าง หลังจากตรวจสอบผลผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่า เมื่อเปรียบเทียบขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่ปรากฏของนกพงในสกุล *Acrocephalus* ได้แก่ นกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น นกพงคิ้วดำ นกพงปากหนา และนกสกุล *Locustella* ได้แก่ นกพงตั๊กแตนอกลาย และนกพงตั๊กแตนท้ายทอย-สีเทา กับแถบดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 50 คู่เบส สามารถทราบขนาดของแถบดีเอ็นเอตัวอย่างได้ ดังรูปที่ 4.3 ผลการระบุเพศของนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น (NP40, NP41) นกพงคิ้วดำ (NP51, NP52) นกพงตั๊กแตนอกลาย (NP53) นกพงปากหนา (NP73, NP76) ซากนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่นเพศผู้ (NP09) เพศเมีย (NP10) โดยพบว่านกสกุล *Acrocephalus* มีขนาดอัลลีล *CHD-Z* ประมาณ 370 คู่เบส และขนาดอัลลีล *CHD-W* ประมาณ 390 คู่เบส สอดคล้องกับงานวิจัยของ Lifjeld และคณะ (2010) ใช้ไพรเมอร์ P2/P8 ศึกษาการระบุเพศนกสกุล *Acrocephalus* คือ *A. palustris*, *A. scirpaceus* และ *A. schoenobaenus* พบว่า อัลลีล *CHD-Z* มีขนาด 360 คู่เบส และ *CHD-W* มีขนาด 385 คู่เบส ส่วนนกสกุล *Locustella* มีขนาดของอัลลีล *CHD-Z* ประมาณ 420 คู่เบส และ *CHD-W* ประมาณ 450 คู่เบส ซึ่งยังไม่มีการศึกษาการระบุเพศนกในสกุลนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.3 แสดงผลการระบุเพศนกด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้ไพรเมอร์ P2/P8 จากตัวอย่างทั้งหมด 9 ตัวอย่าง เปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 50 คู่เบส กำหนดให้ M แทนเพศผู้ และ F แทนเพศเมีย

จากการระบุเพศตัวอย่างนกพงทั้งหมด 5 สปีชีส์ จำนวน 100 ตัวอย่าง พบว่า สามารถระบุเพศนกได้จำนวน 88 ตัวอย่าง คิดเป็น 88% แบ่งเป็นเพศผู้ 57 ตัว คิดเป็น 64.77% เพศเมีย 31 ตัว คิดเป็น 35.23% สัดส่วนนกเพศผู้มากกว่านกเพศเมีย คิดเป็นอัตราส่วนเพศผู้ต่อเพศเมีย 2:1 และไม่สามารถระบุเพศนกได้จำนวน 12 ตัวอย่าง คิดเป็น 12% ซึ่งผลการระบุเพศนกพงแต่ละสปีชีส์แสดงดังตารางที่ 4.1 สาเหตุของการระบุเพศไม่ได้ เนื่องจากนกบางตัวไม่พบขนผลัด และขนาดลำตัวเล็กทำให้ได้ตัวอย่างเลือดปริมาณไม่เพียงพอต่อการวิเคราะห์ และในบางตัวอย่างเก็บตัวอย่างโดยใช้กระดาษ FTA อาจป้ายเลือดปริมาณมากเกินไป ไม่สามารถทำกระดาษ FTA ให้บริสุทธิ์ได้ จึงไม่สามารถระบุเพศได้

ตารางที่ 4.1 แสดงผลการระบุเพศนกพงแต่ละสปีชีส์จำนวน 100 ตัวอย่าง

สปีชีส์	จำนวน (ตัว)			รวม
	เพศผู้	เพศเมีย	ไม่สามารถระบุเพศได้	
นกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น	13	13	0	26
นกพงคิ้วดำ	24	8	0	32
นกพงปากหนา	11	9	11	31
นกพงตั๊กแตนอกลาย	4	0	0	4
นกพงตั๊กแตนท้ายทอยสีเทา	5	1	1	7
รวม	57	31	12	100

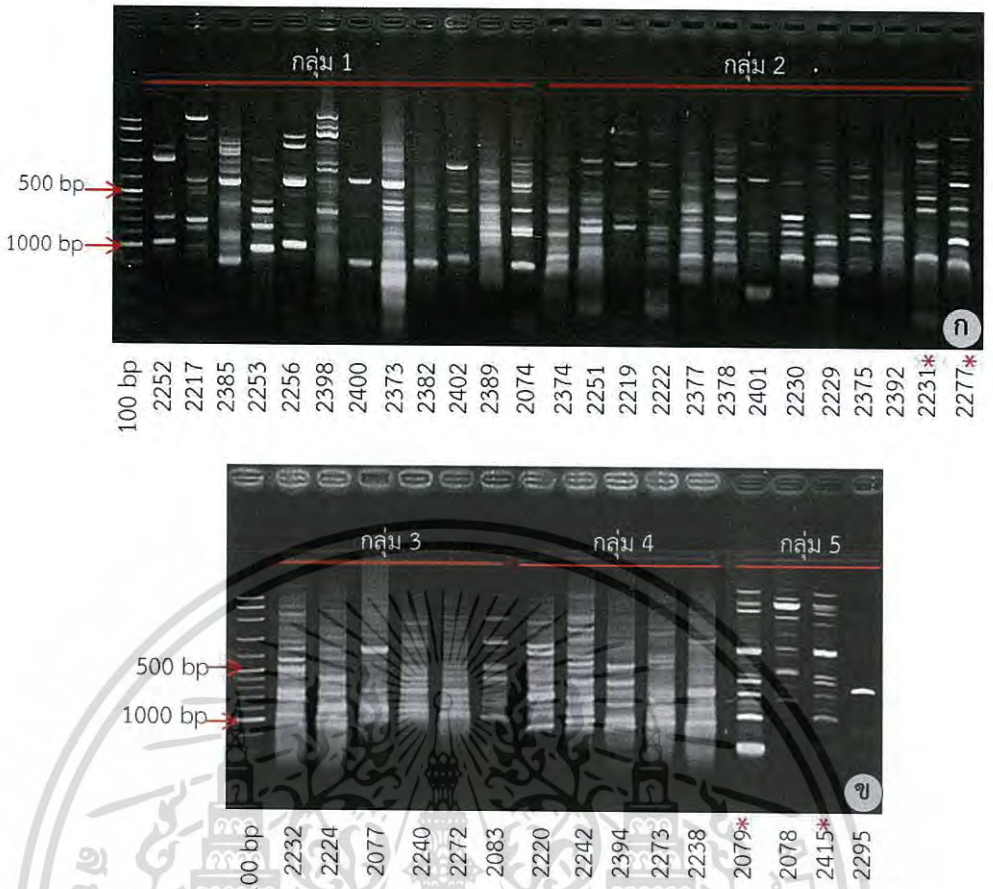
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายทางโมเลกุล inter Primer Binding site (iPBS)

4.2.1 ผลการเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมสำหรับการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม

ในการศึกษาครั้งนี้ทำการคัดเลือกไพรเมอร์จำนวน 40 ไพรเมอร์ จากงานวิจัยของ Kalendar และคณะ (2010) โดยคัดเลือกตามค่า PCR efficiency ที่มีประสิทธิภาพทั้งในพืชและสัตว์ เพื่อให้สะดวกในการศึกษาจึงจัดกลุ่มไพรเมอร์ตามอุณหภูมิ annealing ดังตารางที่ 3.1 ใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้จากซากนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่นเพศเมีย (NP10) เป็นตัวคัดเลือกไพรเมอร์ โดยปฏิกิริยา PCR ด้วยเครื่องหมายทางโมเลกุล iPBS จากนั้นตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสอะกาโรสความเข้มข้น 1% เมื่อใช้ไพรเมอร์กลุ่ม 1 (Ta = 50.7 °C) และกลุ่ม 2 (Ta = 52.7 °C) จะปรากฏแถบดีเอ็นเอดังรูปที่ 4.4 ก เมื่อใช้ไพรเมอร์กลุ่ม 3 (Ta = 55.1 °C) กลุ่ม 4 (Ta = 56.6 °C) และกลุ่ม 5 (Ta = 62.2 °C) จะปรากฏแถบดีเอ็นเอดังรูปที่ 4.4 ข โดยทำการแบ่งลักษณะของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏเป็น 4 ลักษณะ ได้แก่ ลักษณะที่ 1 ให้แถบดีเอ็นเอไม่ชัดเจน เช่น ไพรเมอร์ 2220, 2242, 2224 และ 2077 เป็นต้น ลักษณะที่ 2 ให้แถบดีเอ็นเอชัดเจน แต่จำนวนแถบน้อย เช่น ไพรเมอร์ 2252, 2400, 2219 และ 2401 เป็นต้น ลักษณะที่ 3 ให้แถบดีเอ็นเอชัดเจน จำนวนแถบมาก แต่แถบไม่แยกออกจากกัน เช่น ไพรเมอร์ 2217, 2074 และ 2398 เป็นต้น ลักษณะที่ 4 ให้แถบดีเอ็นเอชัดเจน จำนวนแถบมาก แต่ละแถบแยกออกจากกัน เช่น 2231, 2277 และ 2079 เป็นต้น ซึ่ง 3 ลักษณะแรกเป็นลักษณะที่ไม่เหมาะสำหรับการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น ส่วนลักษณะที่เหมาะสม คือ ลักษณะที่ 4 เท่านั้น ดังนั้นจากการคัดเลือกไพรเมอร์ทั้งหมด 40 ไพรเมอร์ พบว่ามีเพียง 4 ไพรเมอร์ ได้แก่ 2231, 2277, 2079 และ 2415 ที่ให้แถบดีเอ็นเอเหมาะสำหรับการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่นต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

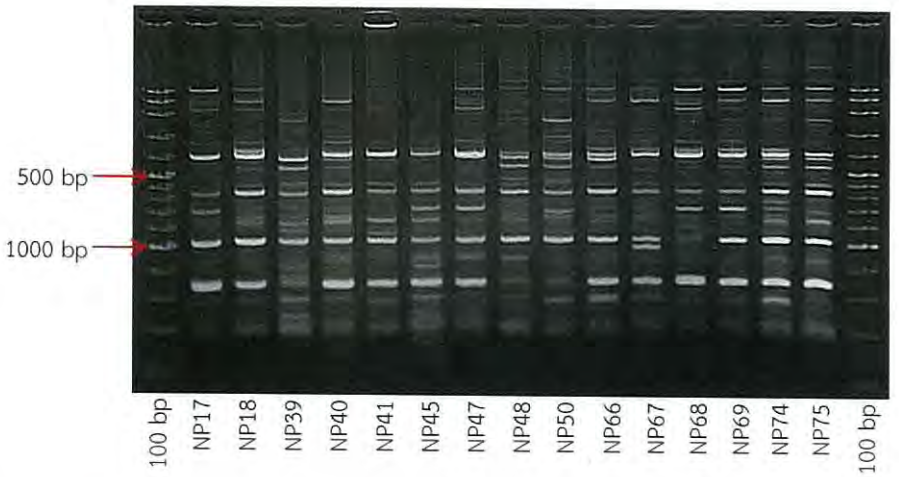


รูปที่ 4.4 แสดงลักษณะแถบดีเอ็นเอการคัดเลือกไพรเมอร์สำหรับศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายทางโมเลกุล iPBS ของนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น โดยใช้ไพรเมอร์ 5 กลุ่ม จำนวน 40 ไพรเมอร์ เทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐานนาด 100 คู่เบส

4.2.2 ผลการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น

จากการเก็บตัวอย่างบริเวณเขตห้ามล่าสัตว์ป่าบึงบอระเพ็ด 11 สถานที่ มีเพียง 3 สถานที่ที่สามารถเก็บตัวอย่างนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่นได้จำนวนมากและเพียงพอในการศึกษาครั้งนี้ จึงสุ่มตัวอย่างนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่นจาก 3 สถานที่ จำนวนทั้งหมด 15 ตัวอย่าง ได้แก่ เกาะตาเรืองจำนวน 5 ตัวอย่าง (NP17, NP18, NP39, NP40, NP41) ทางเข้าประมงเชิงพาณิชย์จำนวน 8 ตัวอย่าง (NP45, NP47, NP48, NP50, NP66, NP67, NP68, NP69) และเนินระฆังจำนวน 2 ตัวอย่าง (NP74, NP75) นำทั้ง 15 ตัวอย่างมาทำปฏิกิริยา PCR กับไพรเมอร์ที่เลือกไว้ 4 ไพรเมอร์ดังข้อ 4.2.1 จากนั้นตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส แต่ละตัวอย่างจะปรากฏแถบดีเอ็นเอแตกต่างกัน ดังรูปที่ 4.5 แสดงตัวอย่างแถบดีเอ็นเอการศึกษาความหลากหลายพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายโมเลกุล iPBS เมื่อใช้ไพรเมอร์ 2079 ของตัวอย่างนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น 15 ตัวอย่าง พบว่า แต่ละตัวอย่างให้แถบดีเอ็นเอที่ใกล้เคียงกัน แต่ไม่เหมือนกัน แสดงให้เห็นถึงความหลากหลาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



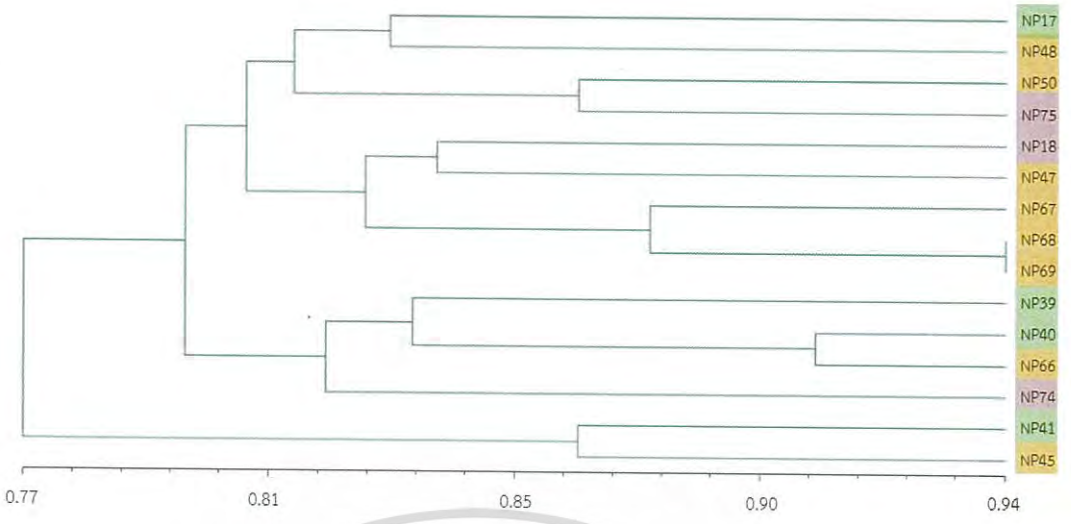
รูปที่ 4.5 แสดงแถบดีเอ็นเอการศึกษาความหลากหลายพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายทางโมเลกุล iPBS ของนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น ของตัวอย่างนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่นจำนวน 15 ตัวอย่าง เมื่อใช้ไพรเมอร์ 2079 เทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐานนาด 100 คู่เบส

หลังจากตรวจสอบผลผลิตภัณฑ์ PCR แล้ว สามารถศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมได้โดยให้ค่าคะแนนแถบทุกตัวอย่าง ณ ขนาดแถบดีเอ็นเอเดียวกันพร้อมกัน หากตัวอย่างใดเกิดแถบให้คะแนนเป็น 1 หากตัวอย่างใดไม่เกิดแถบให้คะแนนเป็น 0 เรียกการให้คะแนนแบบนี้ว่า binary นำค่าคะแนนเหล่านี้ไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTSYSpc 2.1X และสร้างออกมาเป็นแผนภูมิความสัมพันธ์ (Dendrogram) โดยเลือกวิธีการจัดแบบ Unweightede Pair Group Method Using Arithmetic Average (UPGMA)

4.2.3 วิเคราะห์ผลความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรม NTSYSpc 2.1X

การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้โปรแกรม NTSYSpc 2.1X เมื่อเปรียบเทียบในกลุ่มนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น 15 ตัวอย่าง (NP17, NP18, NP39, NP40, NP41, NP45, NP47, NP48, NP50, NP66, NP67, NP68, NP69, NP74 และ NP75) ปรากฏค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์หรือความใกล้ชิดกัน (similarity coefficient) อยู่ระหว่าง 0.7203-0.9407 ดังแสดงในภาคผนวก ค นกที่มีความใกล้ชิดกันมากที่สุด คือ รหัส NP68 และ NP69 มีค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ 0.9407 นกที่มีความแตกต่างกันมากที่สุด คือ รหัส NP17 และ NP74 มีค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ 0.7203 ซึ่งแสดงว่านกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่นมีความหลากหลาย แสดงถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น และที่ค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ 0.80 สามารถแบ่งนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่นได้ 3 กลุ่ม พบว่าไม่มีความสัมพันธ์กับสถานที่ที่เก็บตัวอย่าง ดังรูปที่ 4.6 แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ระหว่างนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่นในแต่ละสถานที่ กรอบสีเขียว คือตัวอย่างนกจากสถานที่เกาะตาเรือง กรอบสีส้ม คือตัวอย่างนกจากสถานที่ทางเข้าประมงเชิงพาณิชย์ และกรอบสีม่วง คือตัวอย่างนกจากสถานที่เนินระฆัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.6 แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ (Dendrogram) ของนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่นจำนวน 15 ตัวอย่าง ด้วยโปรแกรม NTSYSpc 2.1X เลือกวิธีการจัดแบบ Unweightede Pair Group Method Using Arithmetic Average (UPGMA) กำหนดให้ แทนตัวอย่างนกจากเกาะตาเรือง แทนตัวอย่างนกจากทางเข้าประมงเชิงพาณิชย์ แทนตัวอย่างนกจากเนินระฆัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

นกพงเพศผู้และเพศเมียในแต่ละสปีชีส์มีลักษณะสัณฐานเหมือนกัน ดังนั้นจึงไม่สามารถระบุเพศจากลักษณะภายนอกได้ จึงใช้เทคนิค PCR เพิ่มปริมาณยีน *CHD* โดยใช้ไพรเมอร์ P2/P8 (Ta = 53°C) ในการระบุเพศนกพง 2 สกุล จำนวน 5 สปีชีส์ คือ นกสกุล *Acrocephalus* ได้แก่ นกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น (*A. orentalis*) นกพงคิ้วดำ (*A. bistrigiceps*) และนกพงปากหนา (*A. aedon*) เพศผู้มีอัลลีล *CHD-Z* เพียงอัลลีลเดียวขนาดประมาณ 370 คู่เบส เพศเมียมีอัลลีล *CHD-Z* และ *CHD-W* ขนาดประมาณ 370 คู่เบส และ 390 คู่เบส ตามลำดับ ส่วนนกสกุล *Locustella* ได้แก่ นกพงตั๊กแตนอกลาย (*L. lanceolata*) และนกพงตั๊กแตนท้ายทอยสีเทา (*L. certhiola*) เพศผู้มีอัลลีล *CHD-Z* ขนาดประมาณ 420 คู่เบส เพศเมียมีอัลลีล *CHD-Z* และ *CHD-W* ขนาดประมาณ 420 คู่เบส และ 450 คู่เบส ตามลำดับ ในการเก็บตัวอย่างนกพงบริเวณสถานที่วิจัยสัตว์ป่าบึงบอระเพ็ด ตำบลพระนอน อำเภอเมือง จังหวัดนครสวรรค์ จำนวนทั้งหมด 100 ตัวอย่าง สามารถระบุเพศนกได้จำนวน 88 ตัวอย่าง คิดเป็น 88% แบ่งเป็นเพศผู้ 57 ตัว คิดเป็น 64.77% เพศเมีย 31 ตัว คิดเป็น 35.23% สัดส่วนนกเพศผู้มากกว่านกเพศเมีย และไม่สามารถระบุเพศนกได้จำนวน 12 ตัวอย่าง คิดเป็น 12%

สำหรับการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่นจาก 3 สถานที่ คือ เกาะตาเรือง ทางเข้าประมงเชิงพาณิชย์ และเนินระฆัง จำนวนทั้งหมด 15 ตัวอย่าง ด้วยเครื่องหมายทางโมเลกุล iPBS โดยศึกษาจากไพรเมอร์ทั้งหมด 40 ไพรเมอร์ มีไพรเมอร์เพียง 4 ไพรเมอร์ คือ ไพรเมอร์ 2231, 2277, 2079 และ 2415 ที่เหมาะสำหรับการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น ความหลากหลายทางพันธุกรรมมีค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ (Similarity coefficiency) ระหว่าง 0.77-0.94 ที่ค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ 0.80 สามารถแบ่งนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่นเป็น 3 กลุ่ม ซึ่งไม่สอดคล้องกับสถานที่ที่เก็บตัวอย่าง

5.2 ข้อเสนอแนะ

ควรทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อยืนยันชนิดสิ่งมีชีวิต และศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequence) ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในจำนวนตัวอย่างที่มากขึ้นและใช้เครื่องหมายทางโมเลกุลอื่นๆ ร่วมด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กฎกระทรวง กำหนดให้สัตว์ป่าบางชนิดเป็นสัตว์ป่าคุ้มครอง พ.ศ. 2546, (2546, 10 สิงหาคม) ราชกิจจานุเบกษา. 120. 74ก., 58-115.

กลุ่มงานข้อมูลสาระสนเทศและการสื่อสารสำนักงานจังหวัดนครสวรรค์. 2558. **นกพงใหญ่พันธุ์-ญี่ปุ่น**. [online]. เข้าถึงได้จาก : http://123.242.166.4/webnkw/nsinfo/birddata.

เกรียงศักดิ์ ศรีบัวรอด. 2551. **การศึกษาชนิด และประชากรของนกบริเวณป่าชายเลนในภาคใต้ตอนบนของประเทศไทย**. กรุงเทพฯ : กลุ่มวิจัยสัตว์ป่า สำนักอนุรักษ์สัตว์ป่า กรมอุทยาน-แห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช

จรัสศรี นวลศรี, กรกช นาคคนอง และกษมา เชิงฉลาด. 2557. "การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของมะม่วงหิมพานต์ในภาคใต้ ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาของผลเทียม และเครื่องหมายอาร์เอพีดี." *แก่นเกษตร*. 42(3) : 151-156.

จารุจินต์ นภีตะภัฏ, กานต์ เลขะกุล และวัชระ สงวนสมบัติ. 2550. **นกเมือง-ไทย**. กรุงเทพฯ : คณะบุคคล นายแพทย์บุญส่ง เลขะกุล.

เจษฎา. 2559. **นกในประเทศไทย**. [Online]. เข้าถึงได้จาก : http://pirun.ku.ac.th/~b5310302271/นกที่พบในประเทศไทย.html.

นำดี แซ่เฮง, เฉลิมชาติ สมเกิด, ดุสิต คราวะพงษ์, ปรมินทร์ วินิจฉัยกุล, เพิ่มศักดิ์ วัฒกนารา และประพฤกษ์ ตั้งมั่นคง. 2544. "การตรวจแยกเพศนกโดยใช้เทคนิค Polymerase Chain reaction." *วารสารสัตวแพทย์*. 11(3) : 1-8.

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

วิภารัตน์ ศิริพงษ์. 2558. "การระบุเพศและความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกในสกุลตีนเทียน." วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

สุคนธ์ทิพย์ จันทนะ และสายชล แซ่อื้อ. 2549. "การจำแนกเพศนกสวยงามด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์." วิทยาศาสตรบัณฑิต.ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และการประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม, ณิชาภัทร ชอบอาภรณ์, ตฤณเศรษฐ์ วีระพันธุ์, นาถสุดา พุทธรักษ์ และอนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม. 2555. "การระบุเพศในนกแก้วบางชนิด." *วารสารสมาคมพันธุศาสตร์แห่งประเทศไทย*. 5(2) : 194-202.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

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

สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม, ทิพวรรณ คำแสน, ธงชาติ ปลอดอ่อน, ธนวรรณ พงศ์พฤกษา และไกรรัตน์ เอี่ยมอำไพ. 2558. "การระบุเพศและความหลากหลายของนกนางนวลแกลบธรรมดา (*Sterna hirundo*)." หน้า 226-231. ใน **การประชุมวิชาการพันธุศาสตร์แห่งชาติ ครั้งที่ 19**. ขอนแก่น : โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

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

สมศักดิ์. 2557. **Oriental Reed Warbler (*Acrocephalus orientalis*).** [online]. เข้าถึงได้จาก : http://burongtani.oas.psu.ac.th/bird-story.

เอกลักษณ์ คันศร. 2555. **อนุกรมวิธานของนกกลุ่ม Reed และ Bush Warbler ในประเทศไทย.** [online]. เข้าถึงได้จาก : http://www.bcst.or.th/document2012.

โองการ วณิชาชีวะ และเฟื่องฟ้า สีสร้อย. 2557. "การสร้างรูปแบบดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องหมายเอสอาร์เอพี และไอพีบีเอสของไผ่รวกสยาม." *วารสารคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์*. 3(1) : 45-56.

โอภาส ขอบเขตต์. 2544. **นกในเมืองไทยเล่มที่ ๕**. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์สารคดี.

An, J. Lee, M.Y. Min, M.S. Lee, M.H. and Lee, H. 2007. "A molecular genetic approach for species identification of mammals and sex determination of birds in a forensic case of poaching from South Korea." *Forensic Science International*. (167) : 59-61.

Anciaes, M. and Lama, S.N.D. 2002. "Sex identification of Pin-Tailed Mankins (*Ilicura militaris*: Pipridae) using the polymerase chain reaction and its application to behavioral studies." *The Neotropical Ornithological Society*. (13) : 159-165.

Bird of Thailand: Siam Avifauna. 2558. **นกพงคี้วดำ Black browed Reed Warbler.** [online]. เข้าถึงได้จาก : http://www.birdsofthailand.org/bird/black-browed-reed warbler.

Cerit, H. and Avanus, K. 2007. "Sex identification in avian species using DNA typing methods." *World Poult Sci J* 63 : 91–99.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Chang, H.W. Gu, D.L. Su, S.H. Chang, C.C. Cheng, C.A. Huang, H.W. Yao, C.T. Chou, T.C. Chuang, L.Y. and Cheng. C.C. 2008. "High-throughput gender identification of Accipitridae eagles with real-time PCR using TaqMan probe." *Theriogenology*. (70) : 83-90.

Cohen, B.L. Baker, A.J. Blechschmidt, K. Dittmann, D.L. Furness, R.W. Gerwin, J.A. Helbig, A.J. Korte, J.D. Marsness, H.D. Gerwin, J.A. Helbig, A.J. Korte, J.D. Marshall, H.D. Palma, R.L. Peter, H.U. Ramli, siebold, R.I. Willcox, M.S. Wilson, R.H and Zink, R.M. 1997. "Enigmatic phylogeny of skuas (Aves: Stercorariidae)." *Proceedings of the royal society B* 264 : 181-190.

Ellegren, H. 1996. "First gene on the avian W chromosome (CHD) provides a tag for universal sexing of non-ratite birds." *Proc Roy Soc Biol Sci*. 263 (1377) : 1635–1641.

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

Gabor, M. Miluchova, M. Trakovicka, A. Hrncar, C. and Radosova, E. 2014. "Sex Determination of Superorder Neognathae (class *Aves*) by Molecular Genetics Methods." *Scientific papers: Animal Science and Biotechnologies*. 47(1) : 69-72.

Griffiths, R. Daan, S. Dijkstra, C. 1996. "Sex identification in birds using two CHD genes." *Proc Royal Soc Biol Sci*. 263 : 1251–1256.

Griffiths, R. Double, M.C. Orr, K. and Dawson, R.J.G. 1998. "A DNA test to sex most birds." *Mol Ecol*. 7 : 1071–1075.

Griffiths, R. 2000. "Sex identification in birds." *Semin Avian Exotic Pet Med*. 9 : 14–26.

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

Kalendar, R. Antonlus, K. Smykal, P. and Schulman, A.H. 2010. "iPBS: a universal method for DNA fingerprinting and retrotransposon isolation." *Theor Appl Genet*. (121) : 1419-1430.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Li, G. and Quiros, C.F. 2001. "Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in Brassica." *Theoretical and Applied Genetics*. 2(103) : 455-461.

Lifjeld, J.T. Marthinsen G. Myklebust, M. Dawson, D.A. Johnsen, A. 2010. "A wild Marsh Warbler x Sedge Warbler hybrid (*Acrocephalus palustris* x *A. schoenobaenus*) in Norway documented with molecular markers." *Journal of Ornithol*. 151 : 513-517.

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.

Mehmood, A. Muhammad, J.J. Ahmad, S. Ahmad, R. 2013. "Evaluation of genetic diversity in open pollinated guava by iPBS primers." *Pakistan Journal of Agricultural Sciences* 50(4) : 591-597.

Miyaki, C.Y. Griffiths, R. Orr, K. Nahum, L.A. Pereira, S.L. and Wajntal, A. 1998. Sex identification of parrots, toucans and curassows by PCR: Perspectives for wild and captive population studies. *Zoo Biol* 17: 415–423.

Plains-wanderer. 2553. **นกกระจิบหญ้าสีน้ำตาล**. [online]. เข้าถึงได้จาก : http://www.oknation.net/blog/plains-wanderer/2010/09/05/entry-1.

Prus, S.E. and Schmutz, S.C. 1987. "Comparative efficiency and accuracy of surgical andcytogenetic sexing in Psittacines." *Avian Diseases*. 31(2) : 420-424.

Riaz, M. 2011. "iPBS: a universal method for DNA fingerprinting and retrotransposon isolation." *Theor Appl Genet*. (121) : 1419-1430.

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Vucicevic, M. Stevanov, P.M. Stevanovic, J. Bosnjak, J. Gajic, B. Aleksic, N. and Stanimirovic, Z. 2013. "Sex determination in 58 bird species and evaluation of CHD gene as a universal molecular marker in bird sexing." *Zoo Biology*. (32) : 269-276.

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. 2008. "Sex identification of owls (Family Strigidae) using oligonucleotide microarrays." *Journal of Heredity*. 99(2) : 187-192.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

ตารางภาคผนวกที่ ก-1 แสดงรหัสห่วงขา ชนิดนก และผลการระบุเพศนกพงด้วยไพรเมอร์ P2/P8 ของตัวอย่างนกพงจำนวน 100 ตัวอย่าง

เกาะตาเรือง จังหวัดนครสวรรค์			
รหัสที่ใช้ในการวิเคราะห์	รหัสห่วงขา	ชนิดของนก	ผลการวิเคราะห์เพศ
NP11	3A14651	พงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น	เมีย
NP12	3A14655	พงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น	เมีย
NP13	3A14652	พงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น	ผู้
NP14	3A14659	พงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น	ผู้
NP15	3A14653	พงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น	ผู้
NP16	3A14654	พงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น	ผู้
NP17	3A14658	พงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น	ผู้
NP18	3A14656	พงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น	ผู้
NP19	3A14657	พงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น	ผู้
NP20	A20187	พงคิ้วดำ	ผู้
NP21	A22073	พงคิ้วดำ	ผู้
NP22	A22072	พงคิ้วดำ	ผู้
NP23	A22071	พงคิ้วดำ	ผู้
NP24	A22070	พงคิ้วดำ	ผู้
NP25	A23715	พงคิ้วดำ	ผู้
NP26	A22069	พงคิ้วดำ	ผู้
NP27	A22066	พงคิ้วดำ	เมีย
NP28	A22067	พงคิ้วดำ	ผู้
NP29	A22068	พงคิ้วดำ	ผู้
NP30	A22075	พงคิ้วดำ	ผู้
NP31	A22076	พงคิ้วดำ	ผู้
NP32	A22078	พงคิ้วดำ	ผู้
NP33	A20954	พงคิ้วดำ	ผู้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก (ต่อ)

ตารางภาคผนวกที่ ก-1 (ต่อ)

รหัสที่ใช้ในการวิเคราะห์	รหัสห่วงขา	ชนิดของนก	ผลการวิเคราะห์เพศ
NP34	A22074	พงคิ้วดำ	ผู้
NP35	3A18078	พงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น	ผู้
NP36	3A14660	พงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น	เมีย
NP37	2A42684	พงตั๊กแตนอกลาย	ผู้
NP38	A22079	พงคิ้วดำ	เมีย
NP39	3A14661	พงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น	ผู้
NP40	3A14662	พงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น	เมีย
NP41	3A14663	พงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น	เมีย
NP91	3A18240	นกพงปากหนา	ไม่สามารถระบุได้
ทางเข้าประมงเชิงพาณิชย์ จังหวัดนครสวรรค์			
NP42	2A42686	พงตั๊กแตนท้ายทอยสีเทา	ผู้
NP43	A22080	พงคิ้วดำ	เมีย
NP44	A22081	พงคิ้วดำ	เมีย
NP45	3A14664	พงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น	เมีย
NP46	2A42687	พงตั๊กแตนอกลาย	ผู้
NP47	3A16234	พงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น	ผู้
NP48	3A16384	พงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น	ผู้
NP49	A26602	พงคิ้วดำ	ผู้
NP50	3A14665	พงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น	เมีย
NP51	A26601	พงคิ้วดำ	ผู้
NP52	A22082	พงคิ้วดำ	เมีย
NP53	2A42688	พงตั๊กแตนอกลาย	ผู้
NP54	A26604	พงคิ้วดำ	ผู้
NP55	A26605	พงคิ้วดำ	เมีย
NP56	A26606	พงคิ้วดำ	ผู้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก (ต่อ)

ตารางภาคผนวกที่ ก-1 (ต่อ)

รหัสที่ใช้ในการวิเคราะห์	รหัสห่วงขา	ชนิดของนก	ผลการวิเคราะห์เพศ
NP57	A26603	พงคิ้วดำ	ผู้
NP58	A26608	พงคิ้วดำ	ผู้
NP59	A19846	พงคิ้วดำ	ผู้
NP60	3A14666	พงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น	เมีย
NP61	2A42689	พงตั๊กแตนท้ายทอยสีเทา	เมีย
NP62	A26607	พงคิ้วดำ	เมีย
NP63	A26610	พงคิ้วดำ	ผู้
NP64	A26609	พงคิ้วดำ	เมีย
NP65	A26611	พงคิ้วดำ	ผู้
NP66	3A14667	พงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น	เมีย
NP67	3A14668	พงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น	เมีย
NP68	3A14670	พงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น	เมีย
NP69	3A14669	พงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น	เมีย
NP70	A26612	พงคิ้วดำ	ผู้
NP71	3A29816	พงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น	เมีย
เนินระฆัง จังหวัดนครสวรรค์			
NP73	3A18313	พงปากหนา	ผู้
NP74	3A16444	พงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น	ผู้
NP75	3A18314	พงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น	ผู้
สวนบัว จังหวัดนครสวรรค์			
NP76	3A18318	พงปากหนา	เมีย
NP77	2A36882	พงตั๊กแตนท้ายทอยสีเทา	ผู้
NP101	3A18377	พงปากหนา	ผู้
NP102	3A18375	พงปากหนา	ไม่สามารถระบุได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก (ต่อ)

ตารางภาคผนวกที่ ก-1 (ต่อ)

รหัสที่ใช้ในการวิเคราะห์	รหัสห่วงขา	ชนิดของนก	ผลการวิเคราะห์เพศ
ทางเข้าเขตห้ามล่า จังหวัดนครสวรรค์			
NP79	3A18225	พงปากหนา	เมีย
NP80	3A18216	พงปากหนา	เมีย
NP81	3A18217	พงปากหนา	ไม่สามารถระบุได้
NP82	3A18224	พงปากหนา	ไม่สามารถระบุได้
NP103	3A18410	พงปากหนา	ผู้
NP104	3A18417	พงปากหนา	เมีย
NP105	3A18418	พงปากหนา	ผู้
NP106	2A36896	พงตั๊กแตนท้ายทอยสีเทา	ผู้
NP107	3A18407	พงปากหนา	เมีย
แหลมตาเส็ง จังหวัดนครสวรรค์			
NP83	3A18263	พงปากหนา	ไม่สามารถระบุได้
NP84	3A18264	พงปากหนา	ไม่สามารถระบุได้
NP85	3A18266	พงปากหนา	ผู้
NP86	3A18267	พงปากหนา	ผู้
NP87	2A36876	พงตั๊กแตนท้ายทอยสีเทา	ผู้
NP109	3A18266	พงปากหนา	ผู้
แหลมนา จังหวัดนครสวรรค์			
NP88	3A18304	พงปากหนา	ไม่สามารถระบุได้
NP89	2A36879	พงตั๊กแตนท้ายทอยสีเทา	ไม่สามารถระบุได้
เกาะ ดร.ยอร์ช			
NP90	3A18226	พงปากหนา	ไม่สามารถระบุได้
NP95	3A18334	พงปากหนา	เมีย
NP98	3A18342	พงปากหนา	ผู้
ประมงเชิงพาณิชย์ จังหวัดนครสวรรค์			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก (ต่อ)

ตารางภาคผนวกที่ ก-1 (ต่อ)

รหัสที่ใช้ในการวิเคราะห์	รหัสห่วงขา	ชนิดของนก	ผลการวิเคราะห์เพศ
NP92	3A18140	พงปากหนา	ไม่สามารถระบุได้
NP93	3A18144	พงปากหนา	เมีย
NP94	3A18323	พงปากหนา	ไม่สามารถระบุได้
NP99	2A36846	พงตั๊กแตนท้ายทอยสีเทา	ผู้
NP100	2A36891	พงตั๊กแตนอกลาย	ผู้
NP111	3A18440	พงปากหนา	ผู้
NP112	3A18446	พงปากหนา	เมีย
NP113	3A18448	พงปากหนา	ผู้
เกาะวัด จังหวัดนครสวรรค์			
NP96	3A18335	พงปากหนา	ไม่สามารถระบุได้
NP97	3A18336	พงปากหนา	ผู้
คันเหมือง จังหวัดนครสวรรค์			
NP108	3A18327	พงปากหนา	เมีย

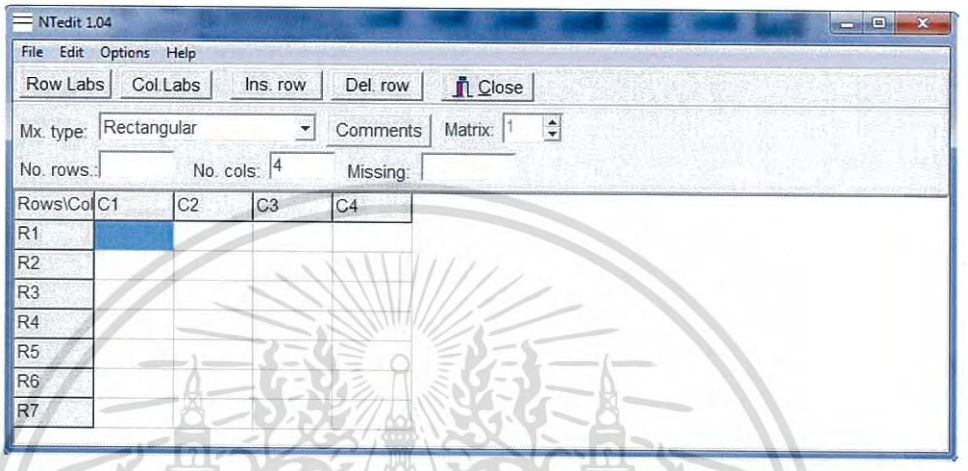
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

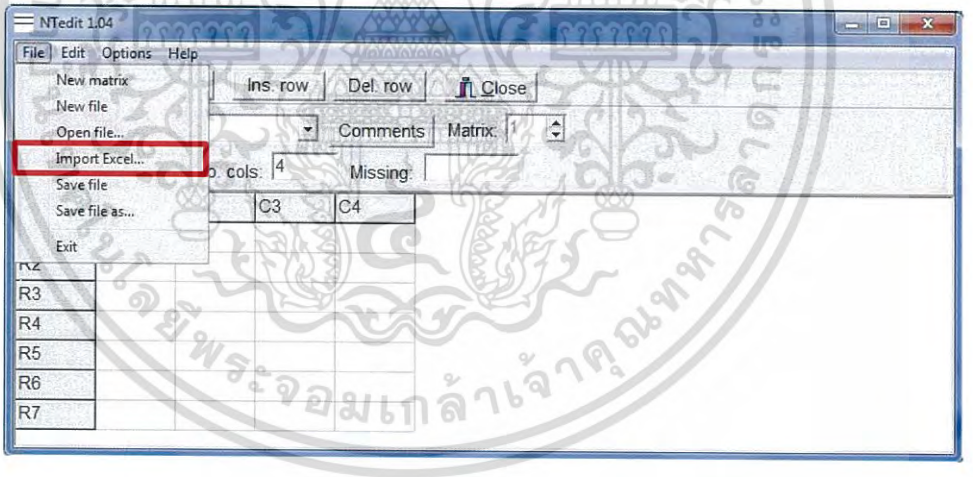
วิธีการใช้โปรแกรม

การวิเคราะห์ผลความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยการสร้าง Tree แสดงความสัมพันธ์ของตัวอย่างนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น 15 ตัวอย่าง ของทั้ง 4 ไพรเมอร์ ด้วยโปรแกรม NTSYSpc 2.1X

1.เปิดโปรแกรม NTedit 1.04

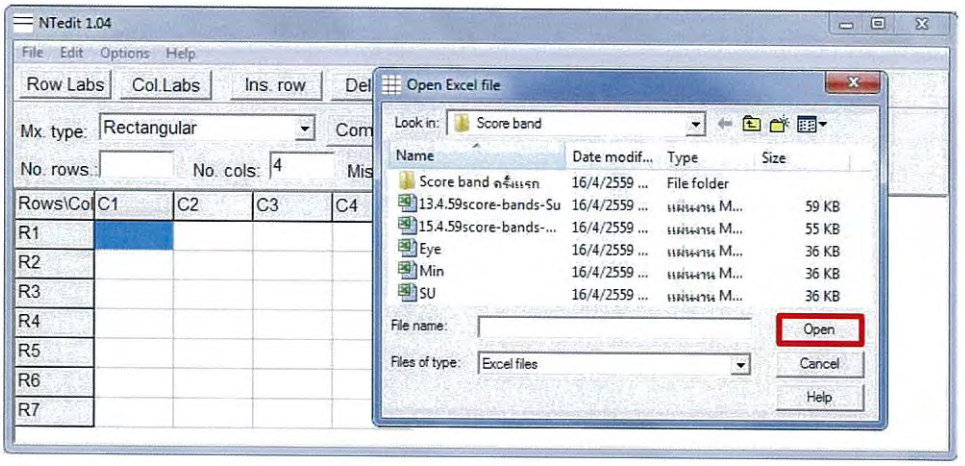


2. กด File เลือก Import Excel



3. เลือกไฟล์ .xls ที่พร้อมใช้งาน จากนั้นกด open

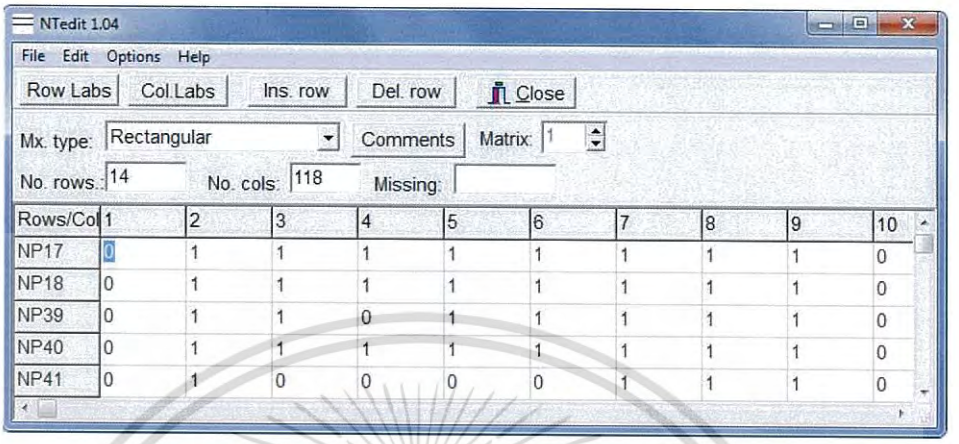
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



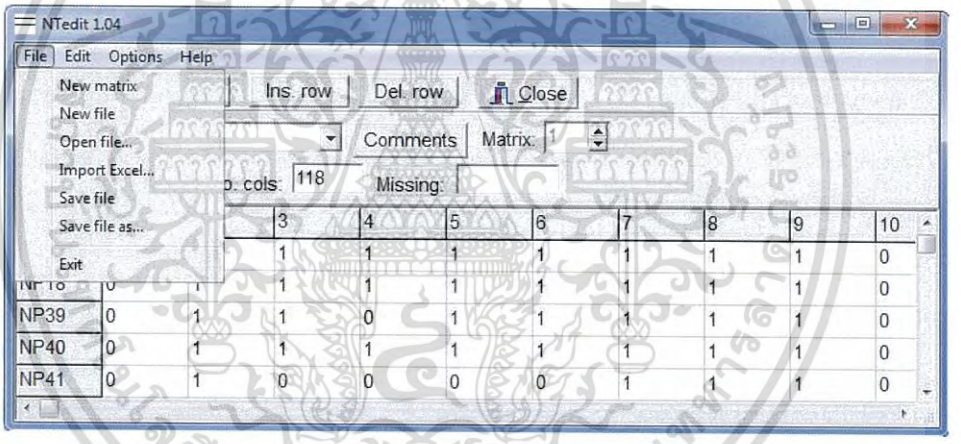
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข (ต่อ)

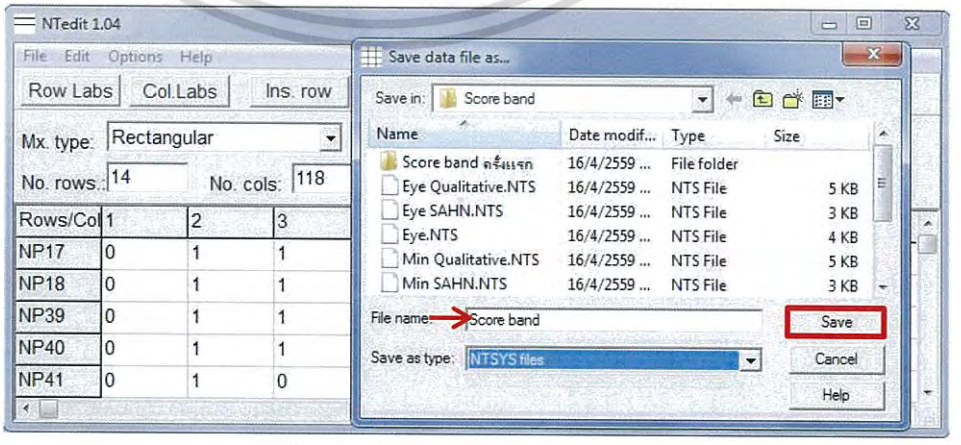
4. โปรแกรมเปิดไฟล์งานที่สร้างจาก Microsoft Excel



5. กด File เลือก Save file as



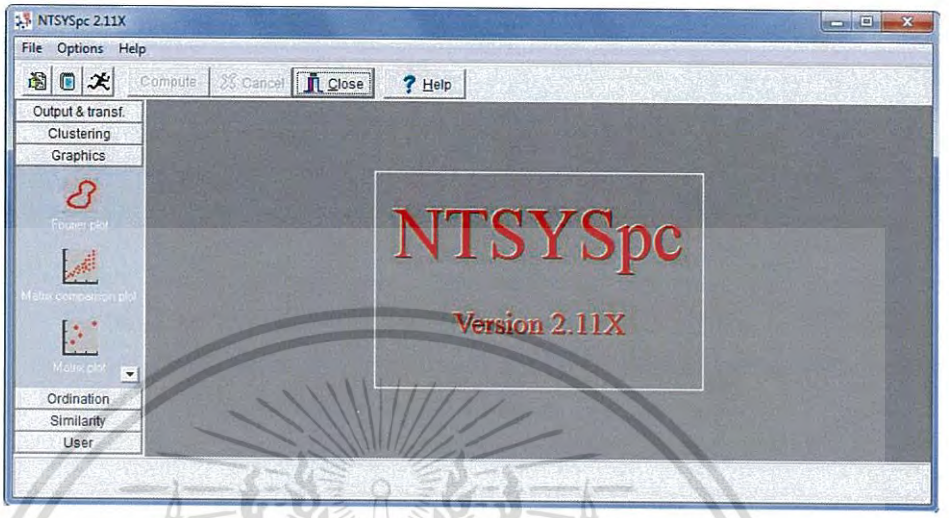
6. ใส่ชื่อไฟล์ที่ต้องการบันทึกในช่องที่ลูกศรชี้ บันทึกไฟล์เป็น .NTS แล้วกด Save



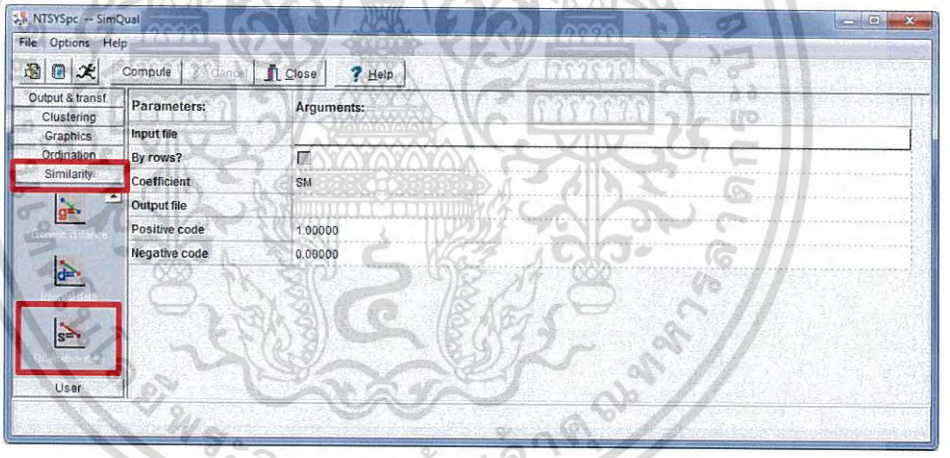
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข (ต่อ)

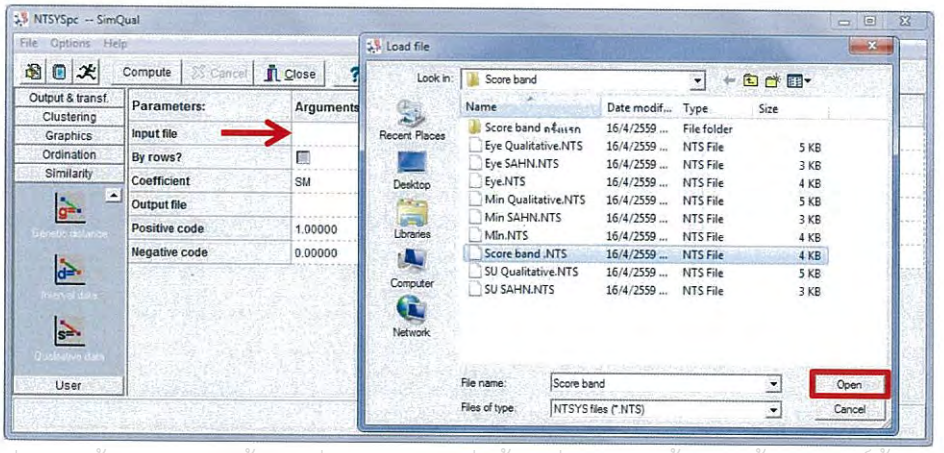
7. เปิดโปรแกรม NTSYSpc 2.1X



8. กด Similarity เลือก Qualitative data



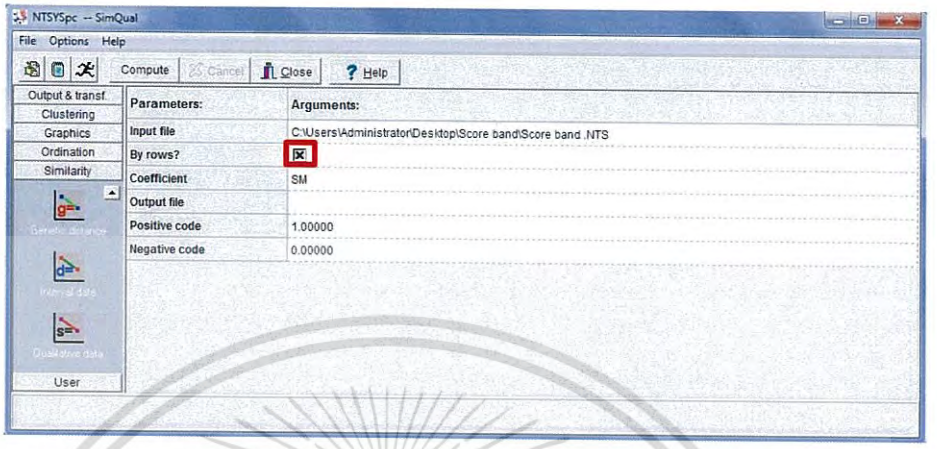
9. กด input file เลือกไฟล์ .NTS ที่พร้อมใช้งาน กด open



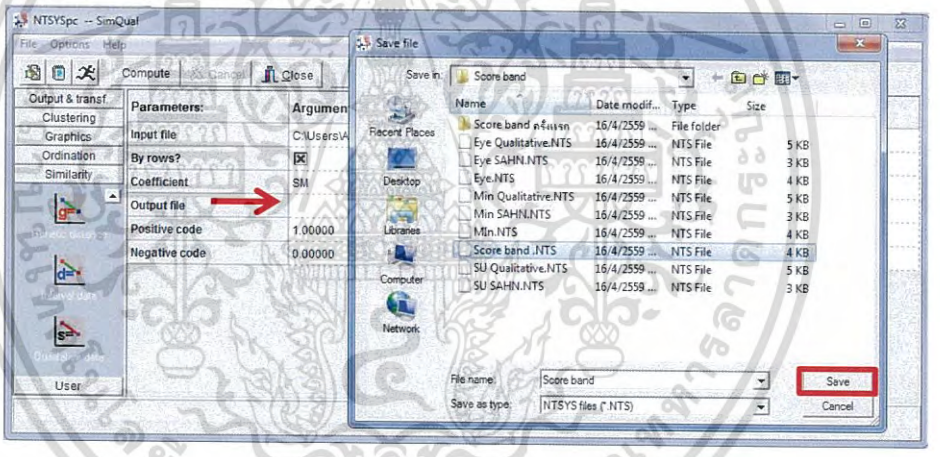
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข (ต่อ)

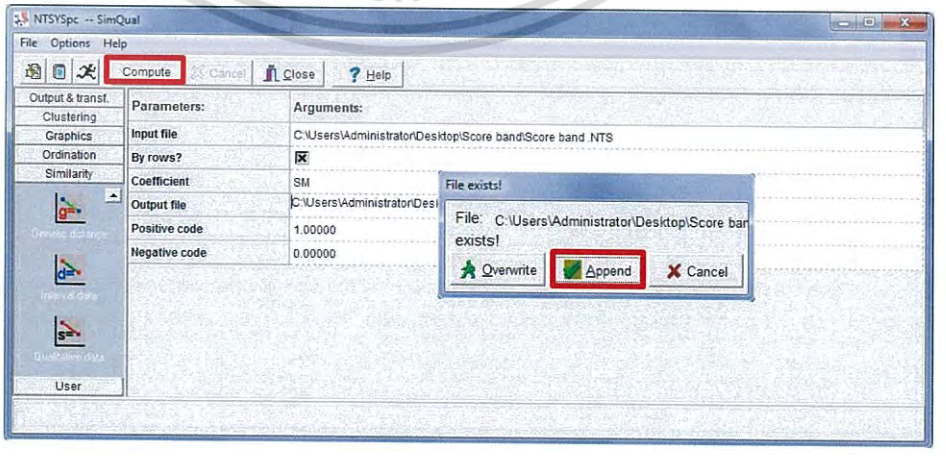
10. เลือก By rows? คลิกให้ขึ้นเครื่องหมาย x



11. คลิก Output file ตั้งชื่อไฟล์ใหม่ กด Save



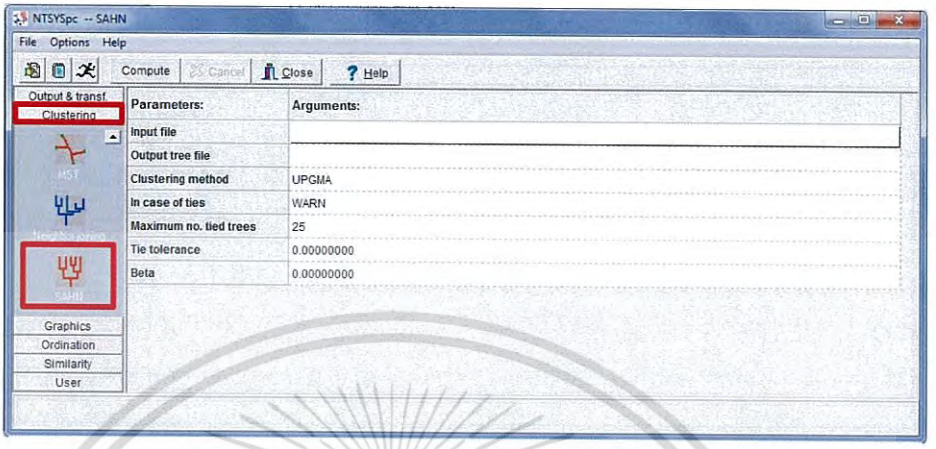
12. กด compute แล้วเลือก Append



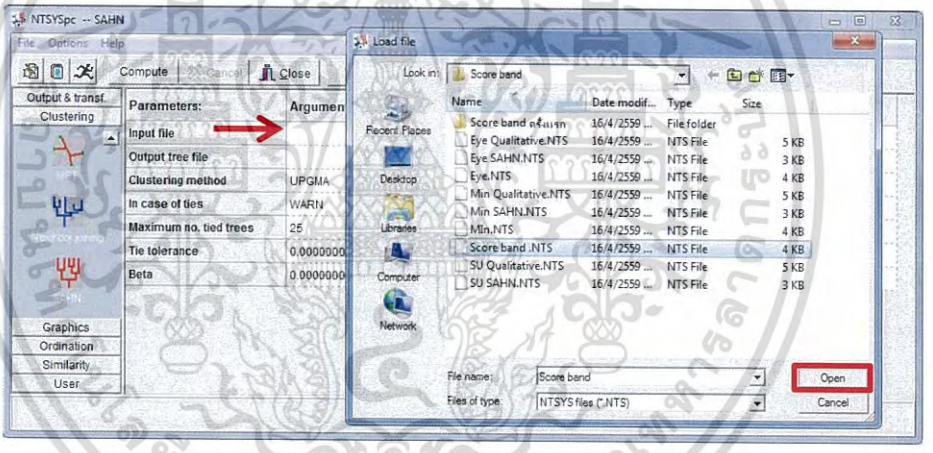
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข (ต่อ)

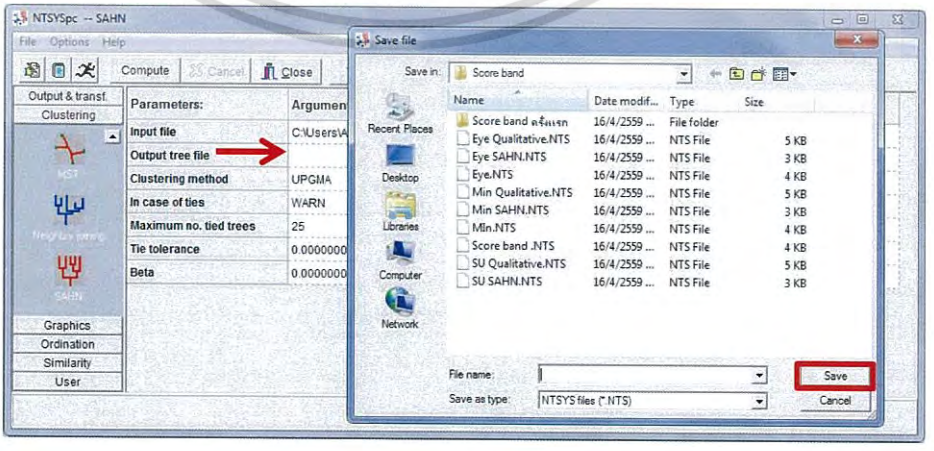
13. กด Clustering เลือก SAHN



14. กด input file เลือกไฟล์ .NTS ที่ผ่านขั้นตอน Qualitative data กด open



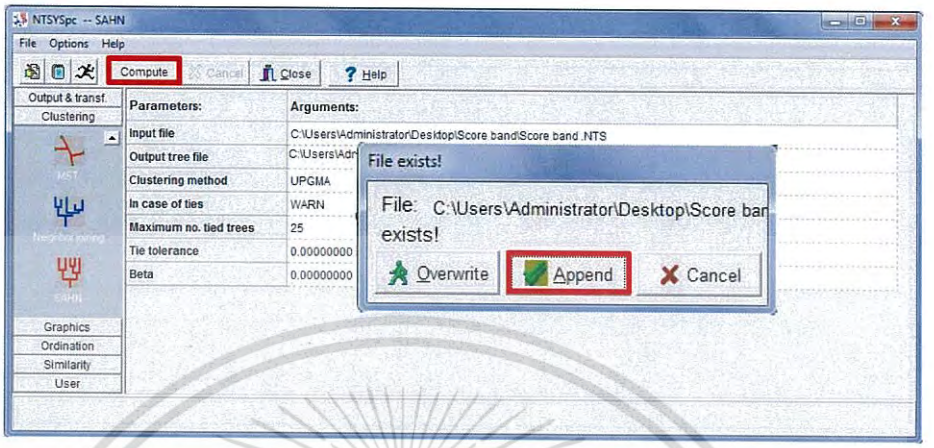
15. กด output file ตั้งชื่อไฟล์ใหม่ .NTS กด Save



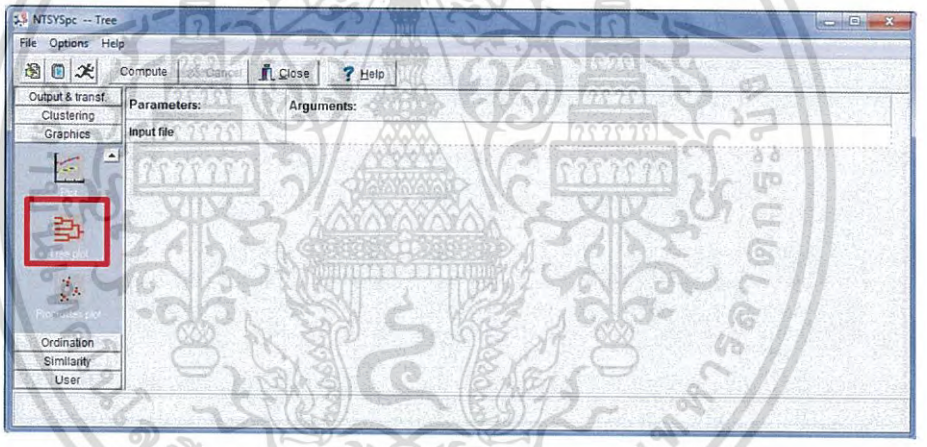
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข (ต่อ)

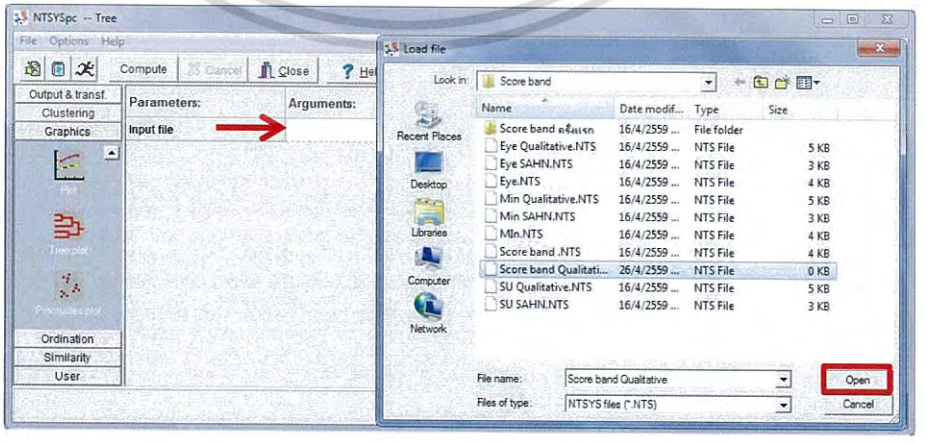
16. กด Compute จากนั้นกด Append



17. กด Graphics เลือก Tree plot



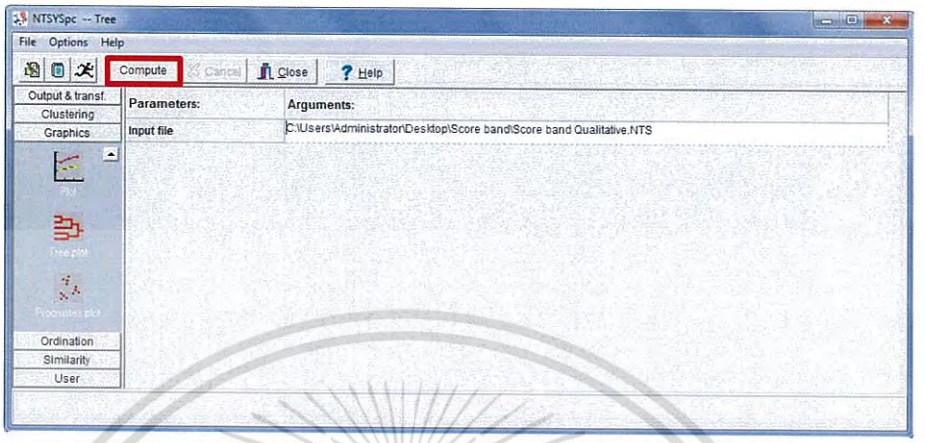
18. กด input file เลือกไฟล์ .NTS ที่ผ่านขั้นตอน SAHN แล้วกด open



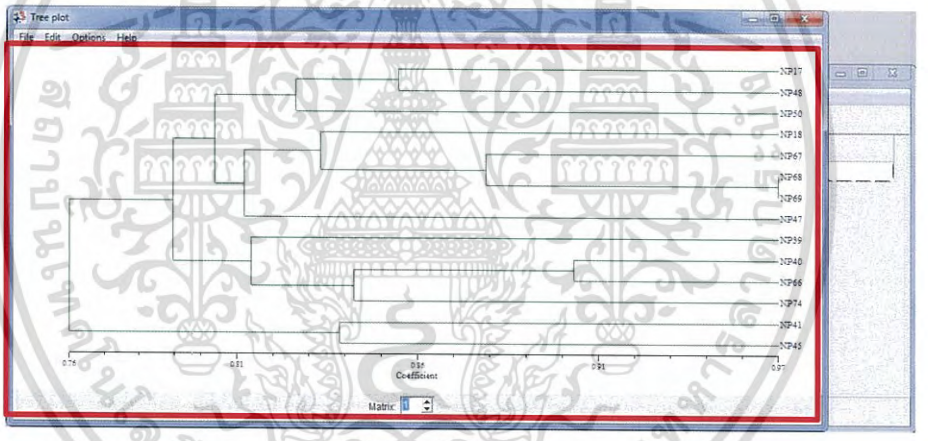
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข (ต่อ)

19. กด Compute



20. โปรแกรมจะแสดงแผนภาพแสดงความสัมพันธ์ของตัวอย่างออกมาเป็น Tree



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

ตารางภาคผนวกที่ ค-1 แสดงค่า Similarity coefficient ของแผนภาพแสดงความสัมพันธ์นกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น 15 ตัวอย่าง ด้วยโปรแกรม NTSYSpc 2.1X

	NP17	NP18	NP39	NP40	NP41	NP45	NP47	NP48	NP50	NP66	NP67	NP68	NP69	NP74	NP75
NP17	1.0000														
NP18	0.8305	1.0000													
NP39	0.7458	0.8305	1.0000												
NP40	0.7627	0.8136	0.8136	1.0000											
NP41	0.8305	0.8305	0.7797	0.7966	1.0000										
NP45	0.7458	0.7458	0.7966	0.7458	0.8644	1.0000									
NP47	0.7712	0.8390	0.7542	0.7712	0.7712	0.7542	1.0000								
NP48	0.8305	0.8305	0.8136	0.7797	0.7797	0.7458	0.8051	1.0000							
NP50	0.8220	0.8220	0.7881	0.8390	0.7712	0.6864	0.7458	0.8390	1.0000						
NP66	0.7712	0.8220	0.8559	0.9068	0.7881	0.7881	0.7797	0.7881	0.8475	1.0000					
NP67	0.8220	0.8220	0.7712	0.8220	0.8051	0.7712	0.7966	0.8051	0.8305	0.8305	1.0000				
NP68	0.8305	0.8475	0.7627	0.7966	0.7966	0.7288	0.8220	0.7966	0.8220	0.8220	0.8898	1.0000			
NP69	0.7881	0.8390	0.7712	0.8051	0.7542	0.7203	0.8305	0.8220	0.8305	0.8136	0.8644	0.9407	1.0000		
NP74	0.7203	0.8051	0.7881	0.8220	0.7542	0.7373	0.7797	0.7712	0.7797	0.8475	0.7797	0.7881	0.8136	1.0000	
NP75	0.7881	0.7881	0.7712	0.8390	0.7542	0.7203	0.7966	0.8051	0.8644	0.8136	0.8136	0.7712	0.7797	0.8305	1.0000

ภาคผนวก ง

1. การเตรียมสารละลาย

1.1 Stock 10X TBE Buffer ปริมาตร 1000 ml

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

นำสารที่ชั่งมาละลายน้ำกลั่นปริมาตร 1000 ml ปรับ pH ให้ได้ 8.0 จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อโดยใช้ autoclave อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที เมื่อนำมาใช้งานต้องเจือจางให้ได้ความเข้มข้นเป็น 1X TBE Buffer โดยดูด 10X TBE Buffer ปริมาตร 50 ml ผสมกับน้ำกลั่นปริมาตร 450 ml

1.2 Stock 10 mM TE Buffer ปริมาตร 100 ml

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

นำสารที่ช่งมารวมกันแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 100 ml ปรับ pH ให้ได้ 8.0 จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อโดยใช้ autoclave อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที เมื่อนำมาใช้งานต้องเจือจางให้ได้ความเข้มข้นเป็น 0.1 mM TE Buffer โดยดูด 10 mM TE Buffer ปริมาตร 40 µl ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 40 ml

2. การเตรียมสารในเทคนิค PCR

2.1 การเตรียม ไพรเมอร์ ความเข้มข้น 20pmol/µl

ดูดไพรเมอร์ที่มีความเข้มข้น 100 µmol/L ปริมาตร 4 µl ใส่ DI Water 16 µl

3. การเตรียมอะกาโรสเจล (W/V)

- หากต้องการเตรียมอะกาโรสเจลความเข้มข้น 1% ชั่งผงอะกาโรสเจล 0.2 กรัม ผสมกับ 1X TBE Buffer 20 ml
- หากต้องการเตรียมอะกาโรสเจลความเข้มข้น 2% ชั่งผงอะกาโรสเจล 0.4 กรัม ผสมกับ 1X TBE Buffer 20 ml

นำไปให้ความร้อนจนผงวุ้นละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นเทใส่ลงในถาดเตรียมเจลที่มีหวี ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อให้เจลเกิดการแข็งตัว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง (ต่อ)

4. การเตรียมเอธิเดียมโบรไมด์ (EtBr)

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้