การระบุเพศและการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม ของนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่นด้วยเทคนิคทางโมเลกุล

SEXING AND GENETIC DIVERSITY OF *Acrocephalus orientalis*

วรรณิภา วิศว์วิสุทธิ์
วิภาวดี กองสุข
วุฒิชัย พงศาปาน

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2559

การระบุเพศและการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่นด้วยเทคนิคทางโมเลกุล

SEXING AND GENETIC DIVERSITY OF *Acrocephalus orientalis*

วรรณิภา วิศว์วิสุทธิ์
วิภาวดี กองสุข
วุฒิชัย พงศาปาน

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2559

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

SEXING AND GENETIC DIVERSITY OF *Acrocephalus orientalis*

WANNIPHA WISVISUT
VIPAWADEE KONGSUK
WUTTICHAI PONGSAPAN

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENT FOR
THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE (BIOTECHNOLOGY)
DEPARTMENT OF BIOLOGY, FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2016

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การระบุเพศและการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่นด้วยเทคนิคทางโมเลกุล Sexing and genetic diversity of *Acrocephalus orientalis*
ชื่อนักศึกษา	นางสาววรรณิภา วิศว์วิสุทธิ์ รหัสนักศึกษา 56050903 นางสาววิภาวดี กองสุข รหัสนักศึกษา 56050911 นายวุฒิชัย พงศาปาน รหัสนักศึกษา 56050915
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา	ชีววิทยา
ปีการศึกษา	2559
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	คุณไกรรัตน์ เอี่ยมอำไพ

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) ประจำปีการศึกษา 2559

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

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การระบุเพศและการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่นด้วยเทคนิคทางโมเลกุล
ชื่อนักศึกษา	นางสาววรรณิภา วิศว์วิสุทธิ์ รหัสนักศึกษา 56050903
	นางสาววิภาวดี กองสุข รหัสนักศึกษา 56050911
	นายวุฒิชัย พงศาปาน รหัสนักศึกษา 56050915
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา	ชีววิทยา
คณะ	วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
ปีการศึกษา	2559
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	คุณไกรรัตน์ เอี่ยมอำไพ

บทคัดย่อ

นกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น (*Acrocephalus orientalis*) จัดอยู่ในกลุ่มของนกประเภท Sexually monomorphic ซึ่งนกเพศผู้และเพศเมียจะมีลักษณะสัณฐานภายนอกที่เหมือนกัน ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อระบุเพศนก และศึกษาความหลากหลายของนก *A. orientalis* ด้วยเทคนิคระดับโมเลกุล โดยเก็บตัวอย่างนกทั้งหมดจำนวน 103 ตัว จากบริเวณเขตห้ามล่าสัตว์ป่าบึงบอระเพ็ด จังหวัดนครสวรรค์ นำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในตำแหน่งยีน *Chromo-Helicase-DNA binding* (*CHD*) ด้วยไพรเมอร์ P2/P8 สามารถระบุเพศได้ จำนวน 101 ตัว โดยเป็นเพศผู้จำนวน 42 ตัว เพศเมียจำนวน 59 ตัว และไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้จำนวน 2 ตัว และเมื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างเพศกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา ได้แก่ น้ำหนัก ความยาวปีก ความยาวปาก ความยาวหัวปาก ความยาวหน้าแข้ง และความยาวหาง พบว่า การวิเคราะห์น้ำหนักควบคู่กับความยาวปีก เป็นลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่เหมาะสมที่สุดในการระบุเพศนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น โดยมีความผิดพลาดเพียง 10.10 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่นจำนวน 29 ตัวอย่าง ด้วยเครื่องหมายทางโมเลกุล inter Primer Binding Site (iPBS) จากการคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมจำนวน 6 ไพรเมอร์ (2074, 2402, 2253, 2252, 2251 และ 2242) ที่ให้แถบดีเอ็นเอชัดเจนและหลากหลาย เมื่อสร้าง dendrogram ด้วยวิธี UPGMA ที่ค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.79 สามารถแบ่งกลุ่มตัวอย่างได้ 3 กลุ่ม ซึ่งไม่แสดงความสัมพันธ์กับสถานที่ เดือนที่เก็บตัวอย่าง และอายุของนก

คำสำคัญ : การระบุเพศ ความหลากหลายทางพันธุกรรม นกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น เทคนิค iPBS

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Sexing and genetic diversity of *Acrocephalus orientalis*
Students	Miss Wannipha Wisvisut Student ID 56050903
	Miss Vipawadee Kongsuk Student ID 56050911
	Mr. Wuttichai Pongsapan Student ID 56050915
Degree	Bachelor of Science (Biotechnology)
Department	Biology
Faculty	Science
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)
Academic Year	2016
Advisor	Asst. Prof. Dr. Supattra Poeaim
Co-advisor	Mr. Krairat Eiamampai

Abstract

The Oriental reed warbler (*Acrocephalus orientalis*) is a sexually monomorphic bird which male and females are identical in appearance. So, this research aimed to identify the gender and study genetic diversity of *A. orientalis* using molecular technique. One hundred and three bird samples were trapped from the Bueng Boraphet Non Hunting Area, Nakhon Sawan province. For sex identification, *Chromo-Helicase DNA binding* (*CHD*) gene was amplified using P2/P8 primers. In a total of 103 samples, 42 males and 59 females were determined, whereas *CHD* gene of the remaining 2 samples could not be amplified by PCR. In addition, samples were recorded their morphology : weight, wing length, bill length, head to bill length, tarsus length and tail length. Weight combination with wing length data are the best morphological characteristics in identifying gender which have 10.10%. Including, the genetic diversity of 29 samples *A. orientalis* using inter Primer Binding Site (iPBS). Six iPBS primers (2074, 2402, 2253, 2252, 2251 and 2242) were able to amplify DNA fragments and produced reproducible fragments with polymorphism bands which were selected for analysis. The similarity coefficients were used to construct a UPGMA dendrogram. The cluster analysis was classified the samples into three major groups at similarity coefficients 0.79 which is not related with place, time and bird age.

Keywords : Sexing, Genetic diversity, Oriental reed warbler, iPBS technique

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษในหัวข้อเรื่องการระบุเพศนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่นด้วยเทคนิคทางโมเลกุล ประสบความสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี เนื่องจากได้รับความช่วยเหลือจากบุคคลที่มีพระคุณดังต่อไปนี้

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ ที่คอยให้ความรู้ คำแนะนำ ให้คำปรึกษาและชี้แนะแนวทางการแก้ไขปัญหา รวมทั้งตรวจทานทำให้โครงงานพิเศษเล่มนี้มีความสมบูรณ์มากขึ้น

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม ประธานกรรมการ ที่ช่วยให้คำแนะนำและแก้ไขโครงงานพิเศษให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณคุณไกรรัตน์ เอี่ยมอำไพ หัวหน้าสถานีวิจัยสัตว์ป่าบึงบอระเพ็ด จังหวัดนครสวรรค์ รวมทั้งเจ้าหน้าที่ของสถานีวิจัยสัตว์ป่าบึงบอระเพ็ดทุกท่านที่คอยให้ความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างและให้ความรู้เกี่ยวกับนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่นเป็นอย่างดี

ขอขอบพระคุณ อาจารย์พรชัย หลายพสุ อาจารย์ประจำภาควิชาสถิติ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่คอยให้คำแนะนำและช่วยเหลือเกี่ยวกับการแปรผลโปรแกรมทางสถิติ

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาชีววิทยา ที่อำนวยความสะดวกในด้านอุปกรณ์เครื่องมือทางวิทยาศาสตร์ ขอบคุณเพื่อนๆ พี่และน้องทุกคนที่ให้กำลังใจ ให้คำปรึกษาและคอยให้ความช่วยเหลือตลอดการทำโครงงานพิเศษ

สุดท้ายนี้คณะผู้จัดทำขอขอบพระคุณ บิดา มารดา และบุคคลในครอบครัวที่สนับสนุนและให้กำลังใจตลอดการทำโครงงานพิเศษครั้งนี้ จนสามารถสำเร็จได้อย่างที่คาดหวังไว้ หากโครงงานพิเศษเล่มนี้มีความผิดพลาดประการใดทางผู้จัดทำกราบขออภัยมา ณ ที่นี้ด้วย

วรรณิภา วิศว์วิสุทธิ์
วิภาวดี กองสุข
วุฒิชัย พงศาปาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ข
กิตติกรรมประกาศ ..... ค
สารบัญ ..... ง
สารบัญตาราง ..... ฉ
สารบัญรูป ..... ช
คำย่อและสัญลักษณ์ ..... ซ
บทที่ 1 บทนำ 1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ 1
1.2 วัตถุประสงค์ 2
1.3 ขอบเขต 2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 3
2.1 ลักษณะทั่วไปของนก 3
2.2 โครโมโซมเพศของสัตว์ปีก 4
2.3 วิธีการเก็บตัวอย่าง 5
2.4 การระบุเพศด้วยเทคนิคทางโมเลกุล 6
2.5 การระบุเพศนกในภาคสนามโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา 9
2.6 เครื่องหมายทางโมเลกุล inter Primer Binding Site (iPBS) 10
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย 12
3.1 ตัวอย่าง 12
3.2 สารเคมี 12
3.3 วัสดุและอุปกรณ์ 14
3.4 วิธีการ 14
3.4.1 การเก็บตัวอย่าง 14
3.4.2 การสกัดดีเอ็นเอ 15
3.4.2.1 การสกัดดีเอ็นเอจากเลือดนก 15
3.4.2.2 การสกัดดีเอ็นเอจากกระดาษ FTA 16
3.4.3 การระบุเพศนกด้วยเทคนิคระดับโมเลกุล 16
3.4.4 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายทางโมเลกุล inter Primer Binding Site (iPBS) 17
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล 18
4.1 ผลการเก็บตัวอย่างนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น 18
4.2 ผลการระบุเพศนกด้วยเทคนิคทางโมเลกุล 18
4.3 ผลการหาความสัมพันธ์ระหว่างเพศและลักษณะทางสัณฐานวิทยา 19

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

4.4 ผลศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายทางโมเลกุล inter Primer Binding Site (iPBS) 25
4.4.1 ผลการเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมสำหรับการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม 25
4.4.2 ผลการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น 27
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 30
5.1 สรุปผลการวิจัย 30
5.2 ข้อเสนอแนะ 30
เอกสารอ้างอิง 31
ภาคผนวก 36
ภาคผนวก ก 37
ภาคผนวก ข 45
ภาคผนวก ค 64
ภาคผนวก ง 65

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

2.1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการระบุเพศนก 7
3.1 การแบ่งกลุ่มของไพรเมอร์ตามค่า Ta ที่ใช้ในเทคนิค iPBS 13
3.2 ขั้นตอน อุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในการระบุเพศด้วยเทคนิคระดับโมเลกุล 16
3.3 อุณหภูมิ Ta ของแต่ละไพรเมอร์ที่ใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายเทคนิคระดับโมเลกุล 17
3.4 ขั้นตอน อุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายทางโมเลกุล iPBS 17
4.1 เดือน สถานที่ จำนวนที่เก็บตัวอย่าง และจำนวนที่นำมาศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม 18
4.2 ลักษณะ ข้อสันนิษฐาน ค่าความผิดพลาดในการทำนายเพศด้วยน้ำหนักหรือความยาวปีก 23
4.3 ลักษณะ ข้อสันนิษฐาน ค่าความผิดพลาดในการทำนายเพศด้วยน้ำหนักและความยาวปีก 23
4.4 ผลการระบุเพศตามแบบจำลองโดยอาศัยข้อมูลน้ำหนัก ความยาวปีก น้ำหนักและความยาวปีก 24
4.5 จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่นด้วยเทคนิค iPBS จากไพรเมอร์จำนวน 6 ไพรเมอร์ 28

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	ลักษณะของนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น	4
2.2	ลักษณะโครโมโซมเพศในสัตว์ปีก	5
2.3	ลักษณะของกระดาษ FTA	6
2.4	PCR products ในการระบุเพศนกนางแอ่นบ้านด้วยไพรเมอร์ P2/P8 ใช้อะกาโรสความเข้มข้น 3% กำหนดให้ M แทนเพศผู้ และ F แทนเพศเมีย	8
2.5	การเข้าเกาะของไพรเมอร์ที่ตำแหน่ง Primer Binding Site (PBS)	11
3.1	สีตาของนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่นในแต่ละช่วงวัย	12
3.2	วิธีการเก็บตัวอย่างเลือด (ก) การเจาะเลือดจากเส้นเลือดบริเวณขาของนก (ข) ใช้ Hematocrit tube ดูดเลือด (ค-ง) การใช้กระดาษ FTA ป้ายเลือด	15
4.1	การระบุเพศนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่นด้วยไพรเมอร์ P2/P8 โดยใช้ 2% อะกาโรสเจลในการแยกเพศ เลนที่ 1 คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 50 คู่เบส เลนที่ 2-11คือตัวอย่างนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่นที่นำมาศึกษาM คือ เพศผู้ F คือ เพศเมีย	19
4.2	การวิเคราะห์ Cluster Dendrogram ที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม R x64 3.4.0 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเพศกับความยาวปีก	20
4.3	การวิเคราะห์ Cluster Dendrogram ที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม R x64 3.4.0 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเพศกับน้ำหนัก	21
4.4	การวิเคราะห์ Cluster Dendrogram ที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม R x64 3.4.0 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเพศกับความยาวหาง	22
4.5	ลักษณะแถบดีเอ็นเอการคัดเลือกไพรเมอร์สำหรับการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายทางโมเลกุล iPBS ของนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น (ก) ไพรเมอร์ 2251 (ข) ไพรเมอร์ 2402 (ค) ไพรเมอร์ 2253 (ง) ไพรเมอร์ 2252 (จ) ไพรเมอร์ 2251 (ฉ) ไพรเมอร์ 2242	26
4.6	ดีเอ็นเอโปรไฟล์ของนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่นที่ได้จากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายทางโมเลกุล iPBS (ก) ไพรเมอร์ 2074 (ข) ไพรเมอร์ 2251 (ค) ไพรเมอร์ 2253	27
4.7	แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ (Dendrogram) ของนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่นจำนวน 29 ตัวอย่างด้วยโปรแกรม NTSYSpc 2.1x เลือกวิธีจัดแบบ Unweightede Pair Group Method	29

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำย่อและสัญลักษณ์

คำย่อ	ความหมาย
bp	คู่เบส
CHD gene	ยีน *Chromo-Helicase-DNA binding*
CHD-W	ยีน *CHD* ที่อยู่บนโครโมโซม W
CHD-Z	ยีน *CHD* ที่อยู่บนโครโมโซม Z
iPBS	inter Primer Binding Site Technique
kb	กิโลเบส
LTR	Long Terminal Repeat
M	โมลาร์
ml	มิลลิลิตร
mM	มิลลิโมลาร์
ng	นาโนกรัม
NP	รหัสตัวอย่างของนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น
PCR	Polymerase Chain Reaction
pmole	พิโคโมล
Ta	Optimal Annealing Temperature
µl	ไมโครลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

การสำรวจและการเก็บข้อมูลประชากรนกที่อพยพมายังประเทศไทยนั้น จะทำการเก็บข้อมูลด้านสัณฐานวิทยา ได้แก่ เพศ การวัดขนาดต่างๆที่สำคัญของนกแต่ละตัว เช่น ความยาวปาก ความยาวปีก ความยาวหางและน้ำหนัก ซึ่งนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น (*Acrocephalus orientalis*) ก็จัดเป็นหนึ่งในนกอพยพ โดยอยู่ในอันดับ Passeriformes วงศ์ Acrocephalidae สกุล *Acrocephalus* ลักษณะทั่วไปของนกชนิดนี้ จะมีปากล่างสีเนื้อแกมส้มปลายปากคล้ำ คิ้วยาวสีขาว แถบตาดำ ขนลำตัวด้านบนน้ำตาลแกมเขียวไพล คอและลำตัวด้านล่างขาว อกมีขีดสีเทาจางๆ สีข้างและก้นน้ำตาลแกมเหลืองเข้ม ปลายหางมีแต้มขาวหรือขาวแกมน้ำตาล มีถิ่นอาศัยในพื้นที่ภาคเหนือตอนล่างของประเทศไทย มักพบบริเวณดงหญ้าสูงในพื้นที่ชุ่มน้ำ ทุ่งนา พื้นที่เกษตรกรรม และพื้นที่ป่าละเมาะใกล้น้ำ ที่ราบถึงความสูง 950 เมตร (โอภาส, 2559) โดยนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่นจัดเป็นสัตว์ป่าคุ้มครองตามบัญชีสัตว์ป่าคุ้มครอง (ราชกิจจานุเบกษา, 2546) จากลักษณะทางสัณฐานวิทยานกเพศผู้และเพศเมียจะมีลักษณะภายนอกที่เหมือนกัน (Sexually monomorphic) ทำให้เกิดปัญหาการระบุเพศในภาคสนาม จึงจำเป็นต้องอาศัยเทคนิคทางโมเลกุลช่วยในการระบุเพศ เพื่อศึกษาความแตกต่างทางลักษณะสัณฐานวิทยาต่อไป ในการกำหนดเพศนกจากโครโมโซมเพศ นกเพศผู้มีโครโมโซมแบบ Homogametic sex (ZZ) นกเพศเมียมีโครโมโซมแบบ Heterogametic sex (ZW) ซึ่งโครโมโซมเพศมีตำแหน่งของยีน *Chromo-Helicase-DNA binding* (*CHD*) จึงอาศัยหลักการความแตกต่างของความยาวบริเวณ Intron ของยีน *CHD* ระหว่างโครโมโซม Z (*CHD-Z*) กับโครโมโซม W (*CHD-W*) มาใช้ในการระบุเพศในระดับโมเลกุลได้ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (polymerase chain reaction: PCR technique) (Dubiec and Neubauer, 2006) โดยใช้ไพรเมอร์ P2/P8 (Griffiths *et al.*, 1998)

ในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อระบุเพศและศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น ซึ่งจากการศึกษาปักษีวิทยาโดยการใส่ห่วงขาของสถานีวิจัยสัตว์ป่าบึงบอระเพ็ด จังหวัดนครสวรรค์ นกพงที่พบส่วนใหญ่มี 5 สปีชีส์ ได้แก่ นกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น (*Acrocephalus orientalis*) นกพงคิ้วดำ (*A. bistrigiceps*) นกพงปากหนา (*A. aedon*) นกพงตั๊กแตนอกลาย (*Locustello lanceo*) นกพงตั๊กแตนท้ายทอยสีเทา (*L. certhiola*) โดยพบนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่นและนกพงคิ้วดำมากกว่าชนิดอื่น ซึ่งมักพบนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่นตัวเดิม (สังเกตจากรหัสห่วงขา) ณ สถานที่เดิมที่เคยสำรวจพบ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่านกชนิดนี้กลับมาที่แหล่งเดิมหรือมีการนำพาลูกนกมายังแหล่งอาศัยเดิมในฤดูกาลถัดไป ดังนั้นจึงสนใจทำการศึกษาการระบุเพศนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น และศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น โดยการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในนกนิยมใช้เครื่องหมายทางโมเลกุล Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), Sequence Related Amplified Polymorphism (SRAP) , Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) เป็นต้น และจากงานวิจัยของวิลาวัณย์ และคณะ (2558) ได้ใช้เครื่องหมายทางโมเลกุล iPBS (inter Primer Binding Site) ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่นจำนวน 3 สถานที่ ในบริเวณเขตห่ามล่าสัตว์ป่าบึงบอระเพ็ด จังหวัดนครสวรรค์ ในงานวิจัยครั้งนี้จึงสนใจนำเครื่องหมายทางโมเลกุล iPBS มาศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม และเพิ่มจำนวนตัวอย่างเพื่อยืนยันความถูกต้อง รวมถึงมีการใช้เทคนิคนี้กันอย่างแพร่หลายในพืช เช่น ไผ่รวกสยาม ซึ่งจะมีหลักการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์จากการใช้รูปแบบของไพรเมอร์ที่มีขนาด 12-18 นิวคลีโอไทด์บริเวณ tRNA เข้าไปสุ่มจับกับดีเอ็นเอเป้าหมายของ Long Terminal Repeat (LTR) บริเวณ Retrotransposon ซึ่งเป็นบริเวณที่เกิดการผันแปรทางพันธุกรรมได้ง่าย พบในสิ่งมีชีวิตพวกยูคาริโอตทุกชนิด ข้อดีของเทคนิคนี้ คือ ผู้วิจัยไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมายก่อน ทำได้ง่าย ไม่ซับซ้อน ให้ข้อมูลมาก ค่าใช้จ่ายไม่สูง ใช้ปริมาณดีเอ็นเอน้อย 25-100 นาโนกรัมต่อปฏิกิริยา และให้รูปแบบดีเอ็นเอที่ความคงตัวสูง (โองการ และเฟื่องฟ้า, 2557)

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1) เพื่อระบุเพศของนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่นด้วยเทคนิคทางโมเลกุล
2) เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างเพศและลักษณะทางสัณฐานวิทยา
3) เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

ศึกษาและเก็บตัวอย่างนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น (*Acrocephalus orientalis*) ในบริเวณเขตห้ามล่าสัตว์ป่าบึงบอระเพ็ด จังหวัดนครสวรรค์ ทั้งหมด 3 สถานที่ คือ แหลมตาเสง เกาะตาเรือง และทางเข้าประมงเชิงพาณิชย์ ระหว่างเดือนพฤศจิกายน พ.ศ.2559 ถึงเดือนมกราคม พ.ศ.2560 ระบุเพศนกโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ที่ตำแหน่งยีน *CHD* เปรียบเทียบกับการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่นด้วยเครื่องหมายทางโมเลกุล iPBS

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1) เป็นฐานข้อมูลทางด้านเพศของนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น
2) สามารถระบุเพศในภาคสนามได้ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา
3) ทราบความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

บึงบอระเพ็ดจัดเป็นพื้นที่ชุ่มน้ำขนาดใหญ่และสำคัญที่สุดของพื้นที่ราบลุ่มภาคกลาง (ส่วนอนุรักษ์สัตว์ป่า กรมป่าไม้กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2542) จัดเป็นทะเลสาบน้ำจืดขนาดใหญ่ มีพื้นที่ประมาณ 212.4 ตารางกิโลเมตร ที่คงซึ่งความหลากหลายทางชีวภาพ อุดมสมบูรณ์ทั้งในด้านทรัพยากรพืชและสัตว์ ทำให้บึงบอระเพ็ดเป็นพื้นที่ชุ่มน้ำที่มีความสำคัญระดับนานาชาติ เป็นแหล่งที่อยู่อาศัยของนกมากมายหลายประเภททั้งนกประจำถิ่น (Resident bird) และนกอพยพ (Migratory bird) ทำให้ความหลากหลายของชนิดนกมีสูง โดยเฉพาะในระหว่างที่มีการอพยพย้ายถิ่นชั่วคราวของนกจากภูมิภาคที่มีอากาศเย็น รวมทั้งสิ้นประมาณ 187 ชนิด (Species) 11 อันดับ (Order) 43 วงศ์ (Family) และ 14 สกุล (Genus) (โอภาส, 2541)

นกประจำถิ่น หมายถึง นกที่อาศัย หากิน สร้างรัง วางไข่ เลี้ยงลูกอ่อน และดำรงชีวิตอยู่ในบึงบอระเพ็ดตลอดทั้งปี ส่วนนกอพยพ คือนกที่อพยพเข้ามาอาศัยอยู่ในบึงบอระเพ็ดเพียงระยะเวลาหนึ่งแล้วอพยพกลับสู่ถิ่นเดิม ส่วนใหญ่จะอพยพในช่วงฤดูหนาว ซึ่งไม่พบการทำรังและวางไข่แต่อย่างใด รวมทั้งนกที่อาศัยอยู่ในบึงเพียงชั่วขณะก่อนที่จะอพยพไปยังที่อื่นหรือเรียกว่านกอพยพผ่าน (Bird of passage migrant) นอกจากนี้ยังรวมถึงนกที่อพยพมาทำรังและวางไข่ในบึงบอระเพ็ด (โอภาส, 2541; ส่วนอนุรักษ์สัตว์ป่า กรมป่าไม้กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2542) ซึ่งนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่นก็จัดเป็นหนึ่งในนกอพยพเช่นกัน

2.1 ลักษณะทั่วไปของนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น

มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Acrocephalus orientalis* ชื่อชนิดมาจากคำในภาษาละติน คือ orientalis แปลว่าทิศตะวันออก (รากศัพท์ภาษาละตินคือ orient, -al หรือ orientis แปลว่าทิศตะวันออก) ความหมายคือ “นกในซีกโลกตะวันออก” พบครั้งแรกที่ประเทศญี่ปุ่น King *et al.*; Lekagul and Round (1991) ใช้ชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Acrocephalus arundinaceus* (Linnaeus, 1758) ส่วน Deignan (1963); Ali and Ripley (1973) ใช้ชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Acrocephalus arundinaceus* (*Temminck* and *Schlegel*, 1847) ซึ่งเท่ากับว่า orientalis เป็นเพียงชนิดย่อยหนึ่ง อย่างไรก็ตาม Sibley and Monroe (1990); Inskipp *et al.*, (1996) ยกฐานะจากชนิดย่อยเป็นชนิด และใช้ชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Acrocephalus arundinaceus* สำหรับนกที่ใช้ชื่อสามัญ Great Reed Warbler ซึ่งกระจายพันธุ์ในยุโรปแอฟริกาและเอเชียไมเนอร์ ไม่น่าจะปรากฏในประเทศไทย และใช้ชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Acrocephalus orientalis* สำหรับนกที่ใช้ชื่อสามัญภาษาอังกฤษว่า Oriental Reed Warbler ซึ่งกระจายพันธุ์ในเอเชียตะวันออกรวมทั้งประเทศไทย

ลักษณะทั่วไปเป็นนกขนาดเล็ก 20 เซนติเมตร แต่มีขนาดใหญ่กว่านกพงชนิดอื่น ลำตัวด้านบนสีน้ำตาล คิ้วสีเนื้อ หัวตาสีเนื้อ ลำตัวด้านล่างสีขาวแกมสีเนื้อบางส่วนมีลายแต้มเหลือง สีข้างสีน้ำตาลปกติคอหอยตอนล่างและอกตอนบนมีลายแถบและลายขีดเล็กๆ ภายในปากสีชมพู ขนปลายปีก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เส้นที่ 10 แคบและแหลม เส้นที่ 9 ยาวกว่าเส้นที่ 6 ขนหางคู่นอกปกติสั้นกว่า 14 มิลลิเมตร และสั้นกว่าขนหางคู่กลาง ดังแสดงดังรูปที่ 2.1

อุปนิสัยและอาหารพบตามป่ากก ป่าหญ้า ป่าละเมาะ และทุ่งโล่ง ปกติใกล้กับแหล่งน้ำในระดับพื้นราบ บางครั้งพบตามกิ่งของไม้พุ่ม มักพบอยู่โดดเดี่ยวหรือเป็นคู่มักมองไม่ค่อยเห็นตัวนอกจากได้ยินเสียงร้อง เพราะมักกระโดดไปมาระหว่างพุ่มหญ้า กก หรือพืชต่างๆที่ค่อนข้างรกทึบ อาหาร ได้แก่ แมลงและตัวหนอน การผสมพันธุ์ ไม่มีรายงานการทำรังวางไข่ในประเทศไทย สถานภาพ เป็นนกอพยพมาช่วงนอกฤดูผสมพันธุ์ พบบ่อยและปริมาณมาก พบทุกภาค กฎหมายจัดเป็นสัตว์ป่าคุ้มครอง (โอภาส, 2544)

รูปที่ 2.1 ลักษณะของนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น
(ที่มา: ถายภาพโดย วิภาวดี กองสุข, 2559)

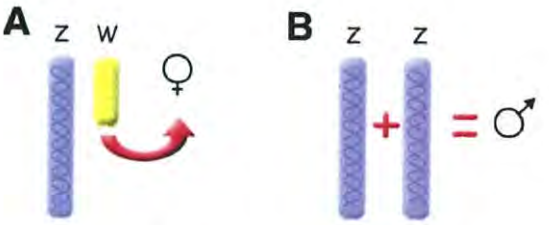
2.2 โครโมโซมเพศในสัตว์ปีก

ในการจัดแบ่งกลุ่มนกแบบง่ายๆ จะใช้การจัดกลุ่มนกโดยอาศัยลักษณะร่วมของนกที่ปรากฏให้เห็นภายนอก สำหรับในทางวิทยาศาสตร์ นักชีววิทยาใช้หลักอนุกรมวิธาน ในการจัดจำแนกกลุ่มและชนิดของนกเช่นเดียวกับสิ่งมีชีวิตทุกชนิดบนโลก โดยอาศัยหลักฐานทางการวิวัฒนาการ (Phylogeny) โดยสิ่งมีชีวิตที่มาจากสายวิวัฒนาการพวกเดียวกัน จะมีลักษณะทางอนุกรมวิธาน (Taxonomic character) เหมือนกันหรือคล้ายคลึงกัน ส่วนสิ่งมีชีวิตที่มาจากสายพัฒนาการต่างกัน จะมีลักษณะทางอนุกรมวิธานต่างกัน ปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์ได้จัดหมวดหมู่ของนกขึ้นใหม่ ซึ่งเป็นการจัดหมวดหมู่ทางชีวเคมี (Biochemical Classification) โดยนำผลจากการวิเคราะห์ยีน (Gene) คือ DNA ของนกชนิดต่างๆ มาเปรียบเทียบกัน จนทำให้ทราบถึงวิวัฒนาการของ DNA ของนกชนิดต่างๆ และทำให้ทราบถึงความใกล้ชิดหรือห่างไกลของเชื้อสายนกชนิดต่างๆด้วย (สมาคมอนุรักษ์นกและธรรมชาติแห่งประเทศไทย, 2550)

โครโมโซมเพศของสัตว์ปีกที่ควบคุมลักษณะเพศ จะมีความแตกต่างจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม คือ โครโมโซมของสัตว์ปีกเพศผู้จะมีโครโมโซมเพศที่เหมือนกันคือ ZZ ส่วนในสัตว์ปีกเพศเมียจะมีโครโมโซมเพศที่แตกต่างกันคือ ZW ในลักษณะการกำหนดเพศนี้ก็จะแตกต่างจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โดยเซลล์อสุจิของสัตว์ปีกนั้นจะมีโครโมโซมเป็น Z โครโมโซมเหมือนกันหมด ในขณะที่ไข่ของสัตว์ปีก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จะมีโครโมโซมที่แตกต่างกันคือ ครึ่งหนึ่งของไข่จะมี Z โครโมโซม ส่วนอีกครึ่งหนึ่งจะเป็น W โครโมโซม (ธนากร, 2546)



รูปที่ 2.2 ลักษณะโครโมโซมเพศในสัตว์ปีก
(ที่มา: Ellegren, 2001)

การระบุเพศนกจากการตรวจสอบตำแหน่งยีนต่างๆที่อยู่บนโครโมโซมเพศโดยอาศัยเทคนิคทางโมเลกุลมาประยุกต์ใช้ซึ่งตำแหน่งยีนที่สามารถระบุเพศนกได้ยกตัวอย่างเช่น ยีนตำแหน่ง 0.6 kb EcoRI (EE0.6) (Ogawa *et al.* 1997) ยีน *RAS p21 protein activator 1* (*RASA1*) (Li *et al.* 2012) และยีน *Nipped-B homolog* (*NIPBL*) (Suh *et al.* 2011) แต่ยีนที่นิยมใช้ในการระบุเพศนก คือ ยีน *Chromo-Helicase-DNA binding* หรือยีน *CHD* เป็นส่วนของโปรตีนอนุรักษ์ซึ่งสันนิษฐานกันว่าทำหน้าที่เป็นโครงสร้าง Chromatin โดยพบว่าหนู *Drosophila* และยีสต์มีลักษณะควบคุมเพียง Homologues เดียว ส่วนในสัตว์ปีกนั้นจะมีลักษณะที่แตกต่างกันออกไป โดยพบว่าจะควบคุมทั้งสอง Homologues (กนกรัตน์ และคณะ, 2550)

จากที่ได้ทราบกันมาแล้วว่าในนกเพศผู้จะมีโครโมโซมเพศแบบเดียวกัน (ZZ) แต่ในเพศเมียจะเป็นแบบ heterogametic (ZW) การระบุเพศสามารถทำได้โดยการตรวจสอบโครโมโซม W หรือลำดับเบสของดีเอ็นเอที่แสดงออกบนโครโมโซม W (Tone *et al.*, 1984) โดยต่อมาได้มีการพบอัลลีล *CHD-W* ที่อยู่บนโครโมโซม W ตรงตำแหน่งแขนข้างยาวในเพศเมีย ในส่วนของอัลลีล *CHD-Z* นั้นจะพบได้ได้บนโครโมโซมเพศ Z ทั้งในเพศเมียและเพศผู้ ซึ่งตำแหน่งยีนดังกล่าวที่พบนี้มีประโยชน์ที่จะสามารถนำมาใช้ในการจำแนกเพศได้ (Griffiths and Korn. 1997; Griffiths *et al.*, 1998)

2.3 วิธีการเก็บตัวอย่าง

วิธีการเก็บตัวอย่างในนกเพื่อนำมาทำการตรวจแยกเพศ โดยทั่วไปการเก็บตัวอย่าง มีอยู่ 2 วิธีหลักๆ คือ แบบที่มีการกระทำกับสัตว์ (Invasive) เป็นการเก็บตัวอย่างที่ต้องมีการจับ ควบคุมสัตว์ ได้แก่ตัวอย่างเลือด ขน และแบบที่ไม่กระทำกับสัตว์หรือที่ไม่ก่อให้เกิดอันตรายแก่ตัวสัตว์ (Non-invasive) คือ การเก็บตัวอย่างที่ไม่ต้องมีการควบคุมบังคับนก ได้แก่ ตัวอย่างปัสสาวะ มูล และของเสียในเปลือกไข่ เป็นต้น โดยในแต่ละวิธีก็พบว่ามีข้อดีข้อเสียที่แตกต่างกันไป (กนกรัตน์ และคณะ, 2550) โดยดีเอ็นเอที่สกัดจากขนมีปริมาณค่อนข้างน้อย อาจไม่เพียงพอต่อการวิเคราะห์ทางโมเลกุลในการระบุเพศ (Taberlet *et al.*, 1999) งานวิจัยนี้จึงเลือกใช้ตัวอย่างจากเลือดเพื่อต้องการความแม่นยำ และปราศจากการปนเปื้อน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Dubiec and Neubaure (2006) กล่าวไว้ว่าในการสกัดดีเอ็นเอจากเลือดของนกนั้นจะนิยมเจาะเลือดตรงบริเวณปีก (Wing vein) หรือจากขา (Leg vein) ซึ่งขึ้นอยู่กับอายุของนกหรือสายพันธุ์ โดยที่ตัวอย่างของเลือดที่เก็บมาได้ต้องเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิต่ำ และควรนำมาวิเคราะห์โดยทันที ซึ่งมักจะเติมสารป้องกันที่ช่วยในการสลายตัวของดีเอ็นเอ หรืออีกวิธีเป็นวิธีการใช้กระดาษ FTA (Whatman international) กระดาษดังกล่าวจะมีส่วนผสมของสารเคมีไว้เพื่อป้องกันการเติบโตของแบคทีเรียและป้องกันการสลายตัวของดีเอ็นเอด้วย ข้อดีคือ สามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องแต่ไม่สามารถเก็บไว้เป็นเวลานานได้

กระดาษ FTA (Fast Technology Analysis Card) เป็นกระดาษที่พัฒนาขึ้นโดย Whatman ซึ่งเป็นวิธีการใหม่ที่มีความรวดเร็วสำหรับการเก็บตัวอย่าง การทำให้บริสุทธิ์และการวิเคราะห์ดีเอ็นเอจากตัวอย่างทางชีวภาพ รวมทั้งเลือด เนื้อเยื่อ พลาสมิด ส่วนต่างๆของพืชและจุลินทรีย์ (Hide *et al.*, 2003; Lampel *et al.*, 2004; Whatman Inc. FTA Protocols, 2002) ซึ่งกระดาษ FTA มีศักยภาพในการเก็บและรักษาสภาพของดีเอ็นเอ (Lucky *et al.*, 2011) โดยเฉพาะอย่างยิ่งในการเก็บตัวอย่างภาคสนามที่ไม่มีสิ่งอำนวยความสะดวกเหมือนกับในห้องปฏิบัติการ กระดาษ FTA มีการเคลือบด้วยสารเคมีเพื่อกักเก็บดีเอ็นเอรักษาเสถียรภาพ ระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องป้องกันดีเอ็นเอจากเอนไซม์นิวคลีเอส รังสียูวี และการย่อยสลายโดยจุลินทรีย์และฟังไจ (Fujita and Kubo, 2006; Smith and Burgoyne, 2004) กระดาษ FTA สามารถใช้กับงานได้หลากหลาย เช่น สถาบันนิติเวช การวิเคราะห์ STR (Short-Tamdem-Repeats) การตรวจสอบสารเสพติด อณูชีววิทยาด้านจีโนม ศึกษาด้านชีวโมเลกุล

รูปที่ 2.3 ลักษณะของกระดาษ FTA
(ที่มา : http://www.sigmaaldrich.com)

ในการสกัดดีเอ็นเอนั้นปัจจุบันมีการให้เลือกใช้ได้หลายวิธี รวมทั้งชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูปที่มีคุณภาพสูงให้เลือกใช้มากขึ้น ซึ่งการจะเลือกใช้วิธีการใดก็ขึ้นอยู่กับความเหมาะสมของแต่ละห้องปฏิบัติการ (กนกรัตน์ และคณะ, 2550)

2.4 การระบุเพศด้วยเทคนิคทางโมเลกุล

ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสหรือพีซีอาร์เป็นเทคนิคที่ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายโดยไม่จำเป็นต้องทำให้ DNA ดังกล่าวบริสุทธิ์ก่อน การทำพีซีอาร์คือการสังเคราะห์ DNA โดยใช้เอนไซม์ DNA polymerase ซ้ำหลายๆรอบ เพื่อให้ได้ DNA ปริมาณเพิ่มขึ้นเป็นทวีคูณ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยอาศัย DNA ต้นแบบเป็นจุดเริ่มต้นและมีเอนไซม์พวก DNA polymerase ช่วยทำให้สาย DNA ยาวออกไป โดยเลือกจับเอานิวคลีโอไทด์ตัวใดตัวหนึ่งใน 4 ชนิด dATP, dGTP, dCTP, dTTP เข้ามาต่อเป็นเบสคู่สมกับ DNA สายต้นแบบ (Template) ส่วนประกอบต่างๆ ในการเพิ่มปริมาณ DNA มีดังนี้คือ DNA ต้นแบบ (Template DNA), Thermostable DNA Polymerase, Deoxynucleotide Triphosphate (dNTPs) ทั้ง 4 ชนิด, Oligonucleotide primer อย่างน้อย 1 คู่ และบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมปริมาณ DNA จะเพิ่มมากขึ้นได้ ต้องอาศัยปฏิกิริยาที่ต่อเนื่องหลายๆรอบ ซึ่งแต่ละรอบจะประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ

1. ขั้นตอน Denaturation : เป็นขั้นตอนการทำให้ DNA สายคู่แยกเป็นสายเดี่ยว โดยอาศัยความร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 90-95 องศาเซลเซียส
2. ขั้นตอน Primer annealing : เป็นขั้นตอนที่มีการลดอุณหภูมิลงมาที่ประมาณ 45-60 องศาเซลเซียส เพื่อให้ไพรเมอร์สามารถเกาะติดกับ DNA ต้นแบบตรงบริเวณลำดับเบสคู่สม
3. ขั้นตอน Primer extension : เป็นขั้นตอนการขยายสาย DNA โดยการต่อลำดับนิวคลีโอไทด์เข้าที่ปลาย 3' ของ Primer แล้วมีการขยายสาย DNA สายใหม่จากทิศทาง 5' ไป 3' โดยอาศัยเอนไซม์ Thermostable DNA polymerase เช่น *Taq* polymerase ซึ่งปกติใช้อุณหภูมิอยู่ในช่วง 70-75 องศาเซลเซียส

ถ้าพิจารณาสาย DNA ที่เพิ่มขึ้น โดยเริ่มจากสาย DNA ต้นแบบ 1 คู่ เมื่อสิ้นสุดรอบที่ 1 จะได้สาย DNA เป็น 2 คู่ เมื่อทำเช่นนี้หลายๆรอบของ PCR DNA ก็จะเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่าของทุกๆรอบ ลักษณะทวีคูณเป็น 2^n เมื่อ n เป็นจำนวนรอบของปฏิกิริยา ดังนั้นถ้าปฏิกิริยาดำเนินไปได้ 20 รอบ จะได้ DNA 2^{20} ชุด หรือมีปริมาณของ DNA ประมาณ 1 ล้านเท่า (จริยา และคณะ, 2540) การประยุกต์ใช้เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสกับไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน *CHD* นิยมใช้ 3 คู่ไพรเมอร์ ดังตารางที่ 2.1

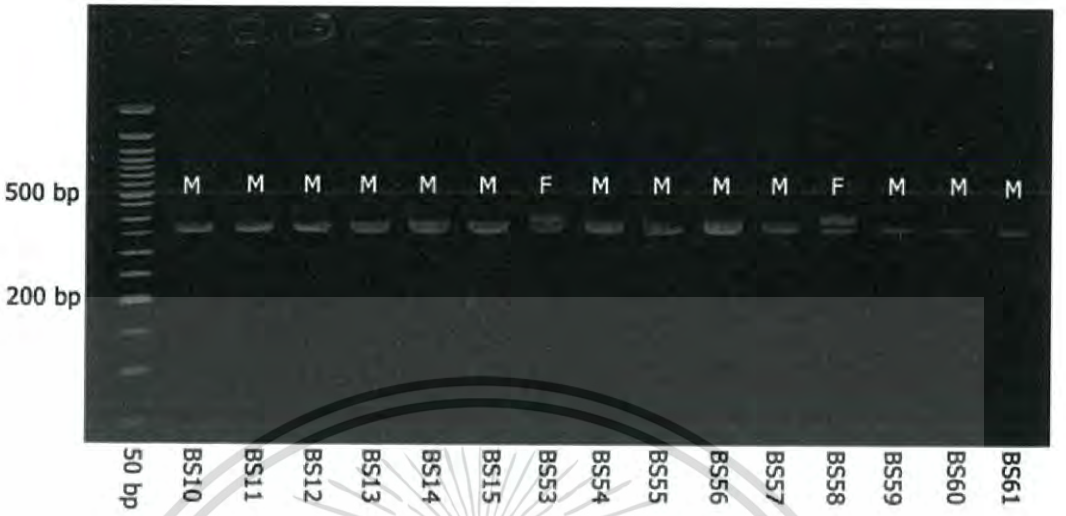
ตารางที่ 2.1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการระบุเพศนก

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	เอกสารอ้างอิง
P2	5'-TCTGCATCGCTAAATCCTTT-3'	Griffiths et al., 1998
P8	5'-CTCCCA AGGATGAGRAAYTG-3'	
2550F	5'-GTTACTGATTCGTCTACGAGA-3'	Fridolfsson and Ellegren, 1999
2718R	5'-ATTGAAATGATCCAGTGCTTG-3'	
1237L	5'-GAGAAACTGTGCAAAACAG-3'	Kahn et al., 1998
1272H	5'-TCCAGAATATCTTCTGCTCC-3'	

เมื่อตรวจสอบ PCR product ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟริซิส พบว่าเพศผู้เกิด 1 แถบ (ZZ) เพศเมียเกิด 2 แถบ (ZW) จากงานวิจัยของ Malaitad *et al,*. 2015 ทำการระบุเพศของนกนางแอ่นบ้าน (*Hirundo rustica Linnaeus*) ซึ่งเป็นนกที่อยู่ในอันดับเดียวกับนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่นโดยเทคนิคทางโมเลกุลซึ่งใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 3 คู่ไพรเมอร์ คือ ไพรเมอร์ P2/P8 ไพรเมอร์ 1237L/1272H และไพรเมอร์ 2550F/2718R เมื่อวิเคราะห์ผลด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟริซิสพบว่าไพรเมอร์ P2/P8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แสดงความแตกต่างอย่างเห็นได้ชัดระหว่างอัลลีล *CHD-Z* และ *CHD-W* โดยเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 50 คู่เบส ดังรูปที่ 2.4



รูปที่ 2.4 PCR products ในการระบุเพศนกนางแอ่นบ้านด้วยไพรเมอร์ P2/P8 ใช้อะกาโรสความเข้มข้น 3% กำหนดให้ M แทนเพศผู้ และ F แทนเพศเมีย (Malaitad *et al.*, 2015)

ในการศึกษาการระบุเพศนกโดยใช้ตำแหน่งยีน *CHD* ด้วยวิธีทางโมเลกุล ดังที่กล่าวมาแล้ว สามารถนำมาใช้ระบุเพศนกอื่นๆได้ ดังงานวิจัยตัวอย่างต่อไปนี้

Itoh *et al.*, (2001) ได้มีการนำเทคนิคพีซีอาร์ มาใช้ในการตรวจเพศในสัตว์ปีก โดยอาศัยความแตกต่างของโครโมโซมเพศ ซึ่งลักษณะโครโมโซมเพศแบบ ZW เป็นเพศเมีย และลักษณะโครโมโซมเพศ ZZ เป็นเพศผู้ โดยเทคนิคนี้สามารถใช้ตรวจเพศนกได้เฉพาะบางชนิดเท่านั้น

Thammakarn *et al.*, (2007) ระบุเพศนกด้วยวิธีพีซีอาร์จากตัวอย่างเลือดของนกแก้วปากขอบางชนิด ได้แก่ กรีนชีกคอนัวร์ (*Pyrrhura molinea*) ซัลคอนัวร์ (*Aratinga solstitialis*) โรเซลล่า (*Platycercus spp.*) นกแก้วอเมซอน (*Amezona spp.*) คองโกอาฟริกันเกรย์ (*Psittacus erithacus erithacus*) และบลูแอนโกลด์มาคอว์ (*Ara ararauna*) โดยใช้ไพรเมอร์ P2/NP/MP ที่ออกแบบโดยอาศัยความแตกต่างระหว่างอัลลีล *CHD-W* และ *CHD-Z* ผลการทดสอบพบว่า ไพรเมอร์ดังกล่าวให้ผลแตกต่างกันอย่างชัดเจนระหว่างนกเพศผู้และเพศเมียในนกกรีนชีกคอนัวร์ ซัลคอนัวร์ โรเซลล่าและนกแก้วอเมซอน แต่ไพรเมอร์ดังกล่าวไม่สามารถระบุเพศนกชนิดคองโกอาฟริกันเกรย์และบลูแอนโกลด์มาคอว์ได้

Griffiths *et al.*, (1998) ได้มีการใช้วิธีพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์เพียงคู่เดียว คือ P2 (5'-TCTGCATCGCTAAATCCTTT-3') และ P8 (5'CTCCCAAGGATGAGRAAYTG-3') โดยทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของ Intron ตรงตำแหน่ง Homologous ในยีนบนโครโมโซมเพศทั้งสองยีนก็คือ อัลลีล *CHD-W* และอัลลีล *CHD-Z* จากนั้นนำผลมาตรวจสอบด้วย Gel electrophoresis ผลพบว่าเพศผู้จะพบ 1 แถบที่เป็นส่วนของอัลลีล *CHD-Z* และในเพศเมียพบ 2 แถบ ซึ่งเป็นในส่วนของอัลลีล *CHD-W* ในการทดลองครั้งนี้ได้ทดลองแยกเพศนกทั้งหมด 28 สายพันธุ์ สามารถทำการแยกเพศได้ถึง 27 สายพันธุ์ หนึ่งในนั้นคือ *Acrocephalus baeticatus*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซึ่งเป็นนกที่อยู่ในสกุลเดียวกับนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น โดยพบว่ามี 1 สายพันธุ์ที่ไม่สามารถทำการแยกเพศก็คือนกกระจอกเทศ (*Struthio camelus*)

Vucicevic *et al.*, (2013) ระบุเพศนก 58 สปีชีส์ โดยใช้ไพรเมอร์ P2/P8 และไพรเมอร์ 2550F/2718R พบว่าไพรเมอร์ 2550F/2718R สามารถระบุเพศนกได้ 50 สปีชีส์ และระบุได้ชัดเจนกว่าไพรเมอร์ P2/P8 ความแตกต่างของความยาว Intron ของยีน *CHD-Z* และ *CHD-W* อยู่ในช่วง 150 ถึง 250 คู่เบส

สมชาติ และดุจฤดี (2557) ได้ตรวจสอบขนาดและลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณยีน *CHD* ด้วยไพรเมอร์ P2/P8 ในนกปรอดหัวโขนที่ทราบเพศแล้ว จำนวน 20 ตัว ซึ่งผลที่ได้ตรงกับเพศของนกที่ทราบเพศแล้ว 100 เปอร์เซ็นต์

สุพัตรา และคณะ (2558) ได้ศึกษาการระบุเพศนกนางนวลแกลบธรรมดา (Common Tern: *Sterna hirundo*) ซึ่งเป็นนกประเภท sexually monomorphic คือ เพศผู้และเพศเมียมีลักษณะภายนอกเหมือนกัน โดยการจำแนกเพศด้วยเทคนิคทางโมเลกุล ในการระบุเพศจะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยคู่ไพรเมอร์ 2550F/2718R ที่ตำแหน่งยีน *CHD* (*Chromo-Helicase-DNA binding*) จากตัวอย่างนกนางนวลแกลบธรรมดา 32 ตัวอย่าง สามารถระบุเป็นเพศเมีย 19 ตัวอย่าง และเพศผู้ 13 ตัวอย่าง

สุพัตรา และคณะ (2558) ได้ศึกษาการระบุเพศนกหัวโตทรายเล็ก (*Charadrius mongolus*) ซึ่งเป็นนกชายเลนที่อพยพเข้ามาประเทศไทยในช่วงนอกฤดูผสมพันธุ์ มีลักษณะขนภายนอกยากต่อการระบุเพศ เมื่อนำมาระบุเพศนกด้วยไพรเมอร์ 2550F/2718R ที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบางส่วนของยีน *CHD* พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ในทุกตัวอย่าง และให้ความแตกต่างระหว่างขนาดชิ้นดีเอ็นเออย่างชัดเจน จากตัวอย่างจำนวน 46 ตัว พบเพศเมียจำนวน 22 ตัว และเพศผู้จำนวน 24 ตัว

2.5 การระบุเพศนกในภาคสนามโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

การระบุเพศนกสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การวิเคราะห์ฮอร์โมน (Eason *et al.*, 2001) หรือการส่องกล้องเพื่อตรวจดูอวัยวะเพศ (Risser, 1971) อย่างไรก็ตามเทคนิคเหล่านี้มีราคาแพง ต้องใช้ระยะเวลานาน บางครั้งอาจทำให้นกได้รับบาดเจ็บ ซึ่งผู้ที่ปฏิบัติงานต้องได้รับการฝึกฝนและมีการใช้เครื่องมือที่มีความพิเศษ (Edgington, 1989) ปัจจุบันได้มีการใช้เทคนิคในระดับโมเลกุลในการระบุเพศนกซึ่งเป็นวิธีที่ให้ผลที่แม่นยำและรวดเร็วกว่าวิธีที่กล่าวมาข้างต้น (Wenqing *at el.*, 2011) ในงานวิจัยนี้จึงได้มีการศึกษาโดยใช้เทคนิคในระดับโมเลกุลเปรียบเทียบไปกับการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาในการระบุเพศเพื่อลดการบาดเจ็บของนก ค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ และดูว่าการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถใช้ได้จริงในภาคสนาม โดยตัวอย่างงานวิจัยการศึกษาการระบุเพศนกโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยามีดังต่อไปนี้

Kennerley and Pearson (2010) ได้ทำการศึกษาลักษณะของนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น พบว่า นกเพศผู้มีสัดส่วนทางกายภาพมากกว่าเพศเมีย เช่น ความยาวหางประมาณ 71.8-77.0 มิลลิเมตร เพศเมียยาวประมาณ 64.6-70.7 มิลลิเมตร ความยาวปากของเพศผู้ยาวประมาณ 19.8-23.1 มิลลิเมตร เพศเมียยาวประมาณ 19.2-21.4 มิลลิเมตร ความยาวหน้าแข้งของเพศผู้ยาวประมาณ 28.5-30.2 มิลลิเมตร เพศเมียยาวประมาณ 25.4-28.1 มิลลิเมตร ความยาวปีกเพศผู้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ยาวประมาณ 81-87 มิลลิเมตร เพศเมียยาวประมาณ 76-82 มิลลิเมตร ซึ่งส่วนมากนกที่มีการผลัดขนแล้วจะสามารถระบุเพศได้โดยใช้ความยาวปีก

Nisbet and Medway (1972) รายงานการศึกษานกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น ในประเทศมาเลเซีย นกเพศผู้จะมีความยาวปีกมากกว่า 83 มิลลิเมตร ส่วนเพศเมียจะมีความยาวปีกต่ำกว่า 82 มิลลิเมตร

Jakubas *et al*., (2011) ได้ทำนายเพศของนก *Acrocephalus schoenobaenus* ซึ่งเป็นนกที่อยู่ในสกุลเดียวกับนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น โดยทำการวัดลักษณะทางสัณฐานวิทยาของนกที่ยังไม่โตเต็มวัยจำนวน 273 ตัว แต่ละตัวจะทำการวัดความยาวปีก ความยาวหาง ความยาวหัวถึงหาง ความยาวปาก ความหนาของปาก ความสูงของปาก ความกว้างของหน้าแข้งและความยาวของกรงเล็บ พบว่าความยาวปีกและปากเป็นลักษณะที่ดีที่สุดสำหรับการระบุเพศ ซึ่งเดิมมีการใช้ความยาวปีกและความยาวหาง

Kaluszewicz *et al*., (2013) ได้ทำการระบุเพศของนก *Locustella luscinioides* ซึ่งเป็นนกที่อยู่ในอันดับ Passeriformes เป็นอันดับเดียวกับนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น โดยวัดลักษณะทางสัณฐาน-วิทยา คือ ความยาวปีก ความยาวหาง ความยาวหัวถึงปาก ความยาวปาก ความหนาของปาก ความยาวหน้าแข้ง และความยาวกรงเล็บของนกทั้งหมด 224 ตัว (ตัวเต็มวัย 64 ตัวและยังไม่โตเต็มวัย 161 ตัว) เปรียบเทียบกับการวิเคราะห์ทางโลเลกุล พบว่าลักษณะที่ดีที่สุดที่นำมาใช้ในการระบุเพศนกที่ยังไม่โตเต็มวัย คือ ความยาวปีก ความยาวปาก ความยาวหัวถึงปาก และความยาวกรงเล็บ ซึ่งลักษณะที่ดีที่สุดที่ใช้ในการคาดเดาเพศของนกตัวเต็มวัย คือ ความยาวปีกและความยาวปาก

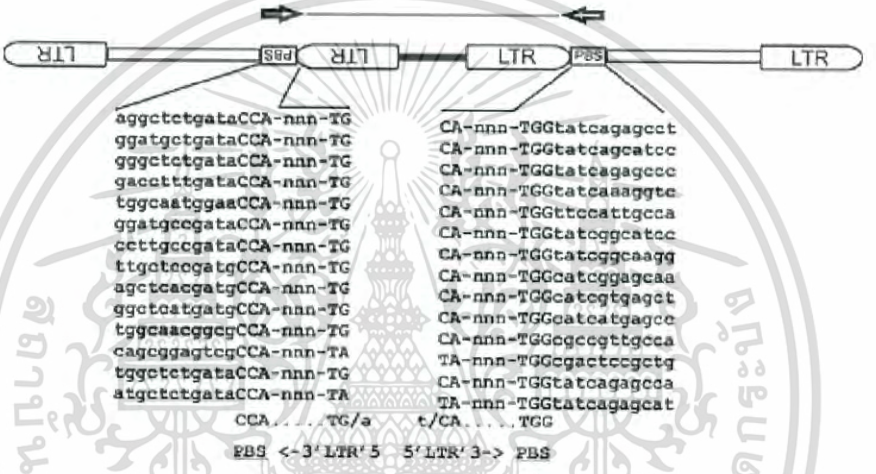
2.6 เครื่องหมายทางโมเลกุล inter Primer Binding Site (iPBS)

เครื่องหมายดีเอ็นเอ หมายถึง ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ใช้เป็นเครื่องหมายติดตามหน่วยพันธุกรรมหรือยีนของสิ่งมีชีวิต และสามารถถ่ายทอดไปยังรุ่นลูกหลานได้ สิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดในแต่ละสายพันธุ์ มีการจัดเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลดีเอ็นเอที่เป็นเอกลักษณ์และมีความแตกต่าง (Polymorphisms) ของลำดับเบสในโมเลกุลดีเอ็นเอ จึงทำให้สิ่งมีชีวิตมีความแตกต่างกันและสามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอได้ เครื่องหมายดีเอ็นเอมีหลายประเภทเช่น RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), STS (Sequence Tagged Sites), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphisms), (Single Nucleotide Polymorphisms) SSR (Simple Sequence Repeats) หรือ microsatellites และ iPBS (inter Primer Binding Site) เป็นต้น โดยในปัจจุบันได้มีการพัฒนาเทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR) จึงมีการใช้ประโยชน์จากเทคนิคดังกล่าวเพื่อการทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprinting) ของสิ่งมีชีวิตด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดต่างๆ ซึ่งเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะในสิ่งมีชีวิตจะมีความเหมาะสมอย่างยิ่งในการใช้ระบุชนิดสิ่งมีชีวิต การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอประกอบด้วยขั้นตอนต่างๆ คือ การสกัดดีเอ็นเอ การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอในหลอดทดลองด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดต่างๆ จากนั้นนำ PCR product ที่เพิ่มปริมาณได้มาแยกขนาดด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟริซิส (Gel electrophoresis) ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้สามารถนำมาใช้ประโยชน์หลายด้าน เช่น การระบุสายพันธุ์หรือชนิดของสิ่งมีชีวิต เพื่อศึกษาวิวัฒนาการและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเลือกใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ และคุณสมบัติของเครื่องหมายดีเอ็นเอแต่ละประเภท (จุฑาพร, 2555)

วิธีนี้อาศัยการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR จากการใช้ไพรเมอร์ขนาด 12-18 นิวคลีโอไทด์ เกาะที่ตำแหน่ง Primer Binding Site (PBS) เข้าไปสุ่มจับกับดีเอ็นเอเป้าหมาย Long Terminal Repeat (LTR) บริเวณ Retrotransporson ซึ่งเป็นบริเวณที่ลำดับเบสของดีเอ็นเอมักเกิดการแปรผันทางพันธุกรรมได้ง่าย พบในสิ่งมีชีวิตกลุ่มยูคาริโอต แสดงดังรูปที่ 2.5 โดยข้อดีของเทคนิคนี้คือ ผู้วิจัยไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลเกี่ยวกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอเป้าหมายก่อน ทำได้ง่ายไม่ซับซ้อน ให้ข้อมูลมาก ค่าใช้จ่ายไม่สูง และให้รูปแบบดีเอ็นเอที่มีความคงตัวสูง (Kalendar *et al.*, 2010)



รูปที่ 2.5 การเข้าเกาะของไพรเมอร์ที่ตำแหน่ง Primer Binding Site (PBS)
(ที่มา: Kalendar *et al.*, 2010)

นอกจากนี้ยังนำเครื่องหมายทางโมเลกุล iPBS มาประยุกต์ใช้ในนกสายพันธุ์ต่างๆ เช่น จากงานวิจัยของ วิภารัตน์ และคณะ (2558) ได้ทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกตีนเทียน (*Himantopus himantopus*) ด้วยเครื่องหมายทางโมเลกุล iPBS สามารถจำแนกนกอพยพออกจากนกประจำถิ่นได้ และจากงานวิจัยของ วิลาวัณย์ และคณะ (2558) ได้ทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่นซึ่งจัดอยู่ในอันดับเดียวกับนกปรอทหัวโขนด้วยเครื่องหมายทางโมเลกุล iPBS ศึกษานกจำนวน 15 ตัวอย่าง โดยใช้ไพรเมอร์ 2231, 2277, 2079 และ 2415 ผลของการใช้ไพรเมอร์ 2079 ในตัวอย่างของนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น 15 ตัวอย่าง พบว่าแต่ละตัวอย่างให้แถบที่ใกล้เคียงกันแต่ไม่เหมือนกัน ในการศึกษาครั้งนี้จึงสนใจใช้เครื่องหมายทางโมเลกุล iPBS มาศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น เนื่องจากเป็นนกชนิดเดียวกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 ตัวอย่าง

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการเก็บตัวอย่างนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่นบริเวณเขตห้ามล่าสัตว์ป่าบึงบอระเพ็ด ตำบลพระนอน อำเภอเมือง จังหวัดนครสวรรค์ ใช้ตัวอย่างจากการศึกษาปักษีวิทยา โดยการใส่ห่วงขา ใช้วิธีตั้งตาข่ายดักนก (Mist net) ซึ่งเป็นเครื่องมือที่นิยม และมีความสำคัญในการศึกษาความหลากหลายทางชนิดพันธุ์ ขนาดของประชากร เป็นต้น โดยจะใช้ตาข่ายจำนวนทั้งหมด 25 ผืน แต่ละผืนมีความกว้าง 2 เมตร และความยาว 10 เมตร ตาข่ายที่ใช้มักจะทำจากไนลอนหรือโพลีเอสเตอร์ เมื่อดักนกได้แล้วทำเครื่องหมายด้วยวิธีใส่ห่วงขานก ห่วงขานั้นเป็นโลหะผสมมีน้ำหนักเบา เป็นแผ่นโค้งหลายขนาด แต่จะไม่มีความคมที่เป็นอันตรายต่อนก จะมีการระบุชื่อหน่วยงาน เมือง ประเทศ ขนาดห่วงขา ลำดับที่ของห่วงขา และจะทำการบันทึกลักษณะต่างๆ ของตัวนก เช่น น้ำหนัก ไขมัน ความยาวปีก ความยาวปาก ความยาวหัวปาก ความหนาปาก ความยาวหน้าแข้ง และความยาวหาง (กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช, 2553) รวมถึงการสังเกตลักษณะสีม่านตาของนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่นที่แตกต่างกันของแต่ละช่วงวัย คือ นกที่มีอายุ 1 ปี (1Y) จะมีสีของม่านตาเป็นสีเทา นกที่มีอายุ 2 ปี (2Y) จะมีสีของม่านตาเป็นสีน้ำตาล และนกที่มีอายุมากกว่า 2 ปีหรือตัวเต็มวัยจะมีสีของม่านตาเป็นสีน้ำตาลแดง (สถานีวิจัยสัตว์ป่าบึงพอระเบ็ด, ติดต่อส่วนตัว) แสดงดังรูปที่ 3.1 ซึ่งจากงานวิจัยของ Kennerley and Pearson (2010) สามารถระบุอายุของนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น โดยแบ่งเป็น 2 ช่วง คือ นก 1 ปี จะมีสีของม่านตาเป็นสีเทา ส่วนนกตัวเต็มวัยจะมีสีของม่านตาเป็นสีน้ำตาลแดง หลังจากนั้นทำการเก็บตัวอย่างเลือด และเก็บดีเอ็นเอโดยใช้กระดาษ FTA แล้วปล่อยนกคืนสู่ธรรมชาติ ในการเก็บตัวอย่างนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่นจาก 3 สถานที่ ได้แก่ แหลมตาเสึง เกาะตาเรือง และทางเข้าประมงเชิงพาณิชย์ ในช่วงเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2559 ถึง เดือนมกราคม พ.ศ. 2560

รูปที่ 3.1 สีตาของนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่นแต่ละช่วงวัย (ก) อายุ 1 ปี (ข) อายุ 2 ปี (ค) อายุ 3 ปี (ที่มา: ถ่ายภาพโดย วิภาวดี กองสุข, 2559)

3.2 สารเคมี

3.2.1 99.5 % Absolute ethanol

3.2.2 Agarose

3.2.3 DNA ladder ขนาด 1 kb 50 bp และ 100 bp

3.2.4 DI water

3.2.5 Distillation water

3.2.6 dNTPs

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.7 Ethidium bromide

3.2.8 70% Ethanol

3.2.9 FTA purification reagent

3.2.10 6X Gel loading dye blue (บริษัท Biolab)

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

3.2.12 $MgCl_2$

3.2.13 Nuclease free water

3.2.14 Proteinase K

3.2.15 Rnase A

3.2.16 10X Standard taq reaction buffer

3.2.17 *Taq* DNA polymerase

3.2.18 2X *Taq* master mix (บริษัท Vivantis)

3.2.19 10X TBE buffer

3.2.20 0.1 มิลลิเมตร TE buffer เตรียมจาก 10M TE buffer

3.2.21 ไพรเมอร์

3.2.21.1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการระบุเพศนกคือ P2 (5'-TCTGCATCGCTAAATCCTTT-3') / P8 (5'-CTCCCAAGGATGAGRAAYTG-3') (Griffiths *et al.*, 1998)

3.2.21.2 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายทางโมเลกุล iPBS เลือกไพรเมอร์ 15 ไพรเมอร์จากทั้งหมด 40 ไพรเมอร์ (วิลาวัณย์ และคณะ, 2558) ซึ่งสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอทำให้แถบดีเอ็นเอปรากฏอย่างชัดเจน ในการศึกษาครั้งนี้จึงจัดกลุ่มไพรเมอร์เป็น 3 กลุ่ม ตามค่า Ta แสดงดังตารางที่ 3.1 เพื่อให้ง่ายและสะดวกในการคัดเลือกไพรเมอร์

ตารางที่ 3.1 การแบ่งกลุ่มของไพรเมอร์ตามค่า Ta ที่ใช้ในเทคนิค iPBS (ดัดแปลงจาก Kalendar *et al.*, 2010)

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	ค่า Ta (°C)	กลุ่มไพรเมอร์
2074	5'-GCTCTGATACCA-3'	49.6	กลุ่มที่ 1 เฉลี่ย 50.0 °C
2402	5'-TCTAAGCTCTTGATACCA-3'	50.0	
2253	5'-TCGAGGCTCTAGATACCA-3'	51.0	
2256	5'-GACCTAGCTCTAATACCA-3'	51.0	
2217	5'-ACTTGGATGTCGATACCA-3'	51.4	
2252	5'-TCATGGCTCATGATACCA-3'	51.6	กลุ่มที่ 2 เฉลี่ย 52.6 °C
2375	5'-TCGCATCAACCA-3'	52.5	
2378	5'-GGTCCTCATCCA-3'	53.0	
2222	5'-ACTTGGATGCCGATACCA-3'	53.0	
2230	5'-TCTAGGCGTCTGATACCA-3'	52.9	
2251	5'-GAACAGGCGATGATACCA-3'	53.2	กลุ่มที่ 3 เฉลี่ย 55.1 °C
2374	5'-CCCAGCAAACCA-3'	53.5	
2083	5'-CTTCTAGCGCCA-3'	54.6	
2242	5'-GCCCCATGGTGGGCGCCA-3'	57.0	
2220	5'-ACCTGGCTCATGATGCCA-3'	57.0	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 วัสดุและอุปกรณ์

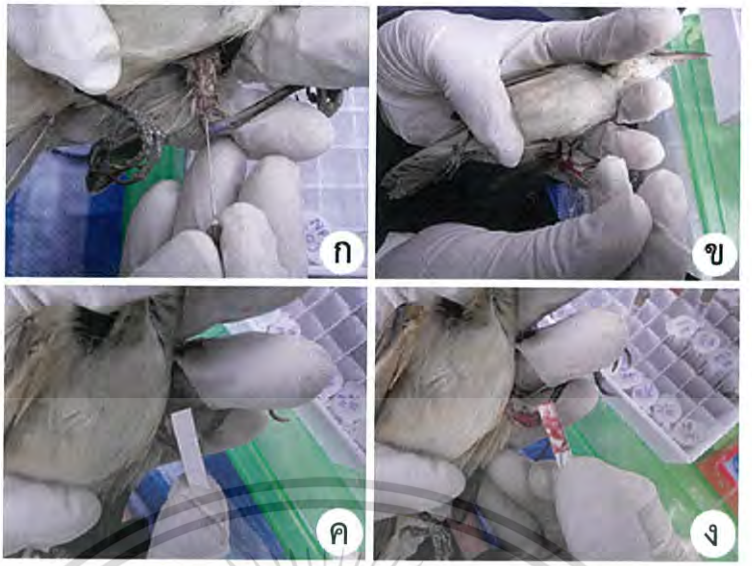
3.3.1 Autoclave
3.3.2 Autopipette
3.3.3 Centrifuge
3.3.4 Electrophoresis system
3.3.5 Forceps
3.3.6 FTA card
3.3.7 Heat box
3.3.8 Hematocrit tube
3.3.9 Microwave
3.3.10 Poucher
3.3.11 Spin down
3.3.12 Syringes ขนาด 26G×1"
3.3.13 Thermal cycler
3.3.14 Tip
3.3.15 Tube ขนาด 0.2 ml และ 1.5 ml
3.3.16 Vortex
3.3.17 Water bath
3.3.18 UV Transilluminator
3.3.19 Spectrophotometer

3.4 วิธีการ

3.4.1 การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างเลือดของนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น โดยในการเก็บตัวอย่างจะทำอย่างระมัดระวังเพื่อให้นกบาดเจ็บน้อยที่สุด โดยมีวิธีการเก็บตัวอย่าง คือ ใช้แอลกอฮอล์ 70% เช็ดบริเวณขาของนกเพื่อทำความสะอาด โดยเจาะเส้นเลือดบริเวณขาของนกด้วยเข็มขนาด 26G×1" เก็บเลือดโดยใช้ Hematocrit tube แสดงดังรูปที่ 3.2 ก-ข แล้วนำเลือดมาใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 ml ปริมาตรอย่างน้อย 25 µl แล้วนำตัวอย่างเลือดไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 ถึง -20 องศาเซลเซียส จากนั้นใช้กระดาษ FTA ป้ายเลือดบริเวณขาของนก แสดงดังรูปที่ 3.2 ค-ง นำกระดาษ FTA ที่ได้เก็บใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 ml เก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิห้อง จนกว่าจะนำมาวิเคราะห์ กรณีที่ตัวอย่างนกมีปริมาณเลือดน้อยทำการเก็บตัวอย่างด้วยกระดาษ FTA เพียงอย่างเดียว จากนั้นห้ามเลือดนกโดยใช้สำลีชุบเบตาดีนกดบริเวณขานกที่ถูกเจาะ ก่อนปล่อยนกคืนสู่ธรรมชาติ หากแน่ใจว่าเลือดหยุดแล้วจึงสามารถปล่อยนกได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3.2 วิธีการเก็บตัวอย่างเลือด (ก) การเจาะเลือดจากเส้นเลือดบริเวณขาของนก (ข) ใช้ Hematocrit tube ดูดเลือด (ค-ง) การใช้กระดาษ FTA ป้ายเลือด

3.4.2 การสกัดดีเอ็นเอ

3.4.2.1 การสกัดดีเอ็นเอจากเลือดนก

ดูดตัวอย่างเลือดประมาณ 10-20 µl ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 ml ในการสกัดเลือดจะใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป GF-1 Blood DNA Extraction Kit โดยมีขั้นตอนดังนี้ เติม Buffer ปริมาตร 200 µl จากนั้นเติม Proteinase K ปริมาตร 20 µl และผสมให้เข้ากันเบาๆ โดยพลิกหลอดไปมา นำไปบ่มใน Water bath ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง จนกระทั่งเลือดกับสารละลายผสมเป็นเนื้อเดียวกัน (โดยจะต้องพลิกหลอดทดลองทุกๆ 30 นาที) เติม RNase A ปริมาตร 20 µl บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 นาที เติม 99.5% absolute ethanol ที่เย็น ปริมาตร 200 µl และทำการพลิกหลอดไปมาให้ผสมกันทันที จากนั้นย้ายตัวอย่างจากหลอดทดลองลงในคอลัมน์ นำไปปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบ 7,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1 นาที แล้วเทส่วนใสทิ้ง ทำการล้างคอลัมน์ครั้งที่ 1 ด้วย wash buffer 1 ปริมาตร 500 µl นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 7,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างคอลัมน์ครั้งที่ 2 ด้วย wash buffer 2 ปริมาตร 500 µl นำไปเหวี่ยงที่ความเร็วรอบที่ 7,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1 นาที จากนั้นเทส่วนใสทิ้ง ล้างคอลัมน์ครั้งที่ 3 ด้วย wash buffer 2 ปริมาตร 500 µl นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 7,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง ทำให้คอลัมน์แห้งโดยการระเหยแอลกอฮอล์ออกจากคอลัมน์ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 นาที ทำการเปลี่ยนหลอดทดลองหลอดใหม่ เติม Elution buffer ที่มีอุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ปริมาตร 25-50 µl (เติมในลักษณะแนวดิ่งเพื่อชะล้างดีเอ็นเอที่ติดอยู่กับกระดาษในคอลัมน์) ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 2 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 7,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1 นาที และเก็บดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ 4 ถึง -20 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.2.2 การสกัดดีเอ็นเอจากกระดาษ FTA

ใช้แอลกอฮอล์ 70% ทำความสะอาด poucher จากนั้นนำไปเจาะบนกระดาษ FTA ที่ต้องการสกัดดีเอ็นเอ โดยเลือกเจาะบริเวณที่มีเลือดบางๆ ประมาณ 2 ชิ้น นำชิ้นส่วนกระดาษ FTA ใส่ในหลอดทดลองขนาด 0.2 ml หยดน้ำยา Purification ปริมาตร 125 µl ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที เมื่อครบเวลาทำการดีดหลอดทดลองและตั้งทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำหลอดทดลองไปบ่มใน heat box เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ดีดหลอดทดลองอีกครั้งและดูดสารละลายทั้งหมดออก ทำซ้ำอีก 1 รอบ หลังจากนั้นล้างกระดาษ FTA ด้วย TE Buffer 125 µl ทิ้งไว้ 5 นาที ทำการดีดหลอดทดลองและนำไปบ่มใน heat box เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส (ในการบ่มสังเกตว่าให้กระดาษ FTA ลงมาอยู่ในสารละลาย) เมื่อครบเวลาดูดสารละลายทั้งหมดออก ทำซ้ำอีก 1 รอบ จากนั้นนำมาทำให้แห้ง โดยเปิดฝาหลอดทดลอง และนำไปบ่มใน heat box อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส บ่มจนกว่ากระดาษ FTA จะแห้ง ซึ่งสามารถสังเกตได้จากการที่ใช้นิ้วดีดหลอดหากกระดาษมีการเคลื่อนที่จึงถือว่าแห้ง

3.4.3 การระบุเพศนกด้วยเทคนิคระดับโมเลกุล

ระบุเพศนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่นจำนวน 103 ตัวอย่าง ด้วยไพรเมอร์ P2/P8 กรณีใช้ดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดเลือดในการระบุเพศนก มีส่วนประกอบสารเคมีในปฏิกิริยา PCR ดังนี้ 2X *taq* master mix ปริมาตร 12.5 µl, 20 pmole/µl Forward primer ปริมาตร 4 µl, 20 pmole/µl Reverse primer ปริมาตร 4 µl, 100 ng/µl DNA template ปริมาตร 1 µl, DI water ปริมาตร 3.5 µl กรณีใช้ดีเอ็นเอบนกระดาษ FTA ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว ในส่วนของการระบุเพศนั้นมีส่วนประกอบสารเคมีในปฏิกิริยา PCR ดังนี้ 2X *taq* master mix ปริมาตร 12.5 µl, 20 pmole/µl Forward primer ปริมาตร 4 µl, 20 pmole/µl Reverse primer ปริมาตร 4 µl, DI water ปริมาตร 4.5 µl, กระดาษ FTA ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว 2 ชิ้น (ซึ่งจะต้องเลือกส่วนที่มีเลือดไม่หนาจนเกินไป) จากนั้นนำเข้าเครื่อง PCR เพื่อเพิ่มปริมาณยีน *CHD* โดยสภาวะที่ใช้แสดงดังตารางที่ 3.2 (วิลาวัณย์ และคณะ, 2558) หลังจากนั้นนำ PCR product มาตรวจสอบโดยใช้เทคนิค Gel electrophoresis โดยใช้ 2% agarose gel

ตารางที่ 3.2 ขั้นตอน อุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในการระบุเพศด้วยเทคนิคระดับโมเลกุล

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (วินาที)	จำนวนรอบ
Initial denaturation	95	300	1
Denaturation	95	60	
Annealing	53	60	35
Extension	72	60	
Final extension	72	600	1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.4 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายทางโมเลกุล inter Primer Binding Site (iPBS)

ใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดเลือด โดยใช้ไพรเมอร์ที่เหมาะสมสำหรับศึกษาความหลากหลาย คือไพรเมอร์ 2074, 2242, 2251, 2252, 2253 และ 2402 โดยปฏิกิริยา PCR ด้วยเครื่องหมายทางโมเลกุล iPBS ใช้อุณหภูมิ Ta ของแต่ละไพรเมอร์ คืออุณหภูมิในช่วง 49.6–57.0 องศาเซลเซียส แสดงดังตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.3 อุณหภูมิ Ta ของแต่ละไพรเมอร์ที่ใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายทางโมเลกุล iPBS

Primer	Sequence	Optimal annealing,Ta (°C)
2074	5'-GCTCTGATACCA-3'	49.6
2242	5'-GCCCCATGGTGGGCGCCA-3'	57.0
2251	5'-GAACAGGCGATGATACCA-3'	53.2
2252	5'-TCATGGCTCATGATACCA-3'	51.6
2253	5'-TCGAGGCTCTAGATACCA-3'	51.0
2402	5'-TCTAAGCTCTTGATACCA-3'	50.0

(ดัดแปลงจาก Kalendar *et al.*, 2010)

ส่วนประกอบสารเคมีในปฏิกิริยา ดังนี้ *Taq* polyrnerase ปริมาตร 0.2 µl, Stand *taq* buffer ปริมาตร 2 µl, Primer ปริมาตร 1 µl ที่ความเข้มข้น 20 pmole/µl, 1.25 มิลลิเมตร 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 (วิลาวัณย์ และคณะ, 2558) นำเข้าเครื่อง Thermal cycler เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยสภาวะที่เหมาะสมดังตารางที่ 3.4 จากนั้นตรวจสอบ PCR product ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส นำไปย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส (Vivantis) แปลผลจากการให้คะแนนแบบ Binary คือเมื่อเกิดแถบดีเอ็นเอให้คะแนนเป็น 1 หากไม่มีแถบดีเอ็นเกิดขึ้น ณ ตำแหน่งเดียวกันของแต่ละตัวอย่างให้คะแนนเป็น 0 จากนั้นนำคะแนนที่เกิดจากแต่ละไพรเมอร์ มาสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ (Dendrogram) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป NTSYS-pc เวอร์ชั่น 2.1 โดยเลือกวิธีการจัดกลุ่มแบบ UPGMA

ตารางที่ 3.4 ขั้นตอน อุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายทางโมเลกุล iPBS (ที่มา : วิลาวัณย์ และคณะ, 2558)

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (วินาที)	จำนวนรอบ
Initial denaturation	95	180	1
Denaturation	95	15	
Annealing	49.6–57.0	60	30
Extension	68	60	
Final extension	72	300	1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 ผลการเก็บตัวอย่างนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น

จากการเก็บตัวอย่างนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่นบริเวณเขตห้ามล่าสัตว์ป่าบึงบอระเพ็ด จังหวัดนครสวรรค์ แบ่งออกเป็น 3 สถานที่คือ แหลมตาเส็ง เกาะตาเรือง และทางเข้าประมงเชิง-พาณิชย์ โดยจะทำการเก็บตัวอย่างตั้งแต่เดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2559 จนถึงเดือนมกราคม พ.ศ. 2560 สามารถเก็บตัวอย่างได้ทั้งหมดจำนวน 103 ตัว สำหรับการศึกษาความหลากหลายได้เลือกตัวอย่างมา 29 ตัวอย่าง ซึ่งผลการเก็บตัวอย่างทั้งหมดแสดงให้เห็นดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 เดือน สถานที่ จำนวนที่เก็บตัวอย่าง และจำนวนที่นำมาศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม

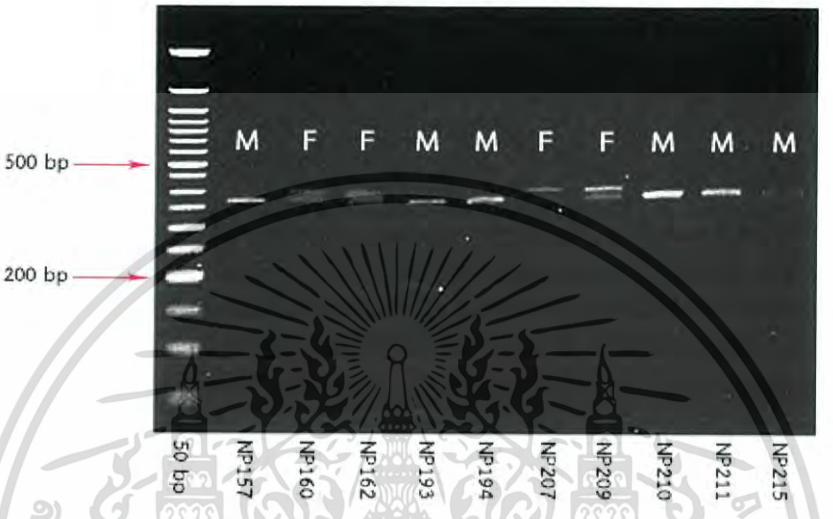
เดือน	สถานที่	จำนวน (ตัว)	จำนวนตัวอย่างที่นำมาศึกษาความหลากหลาย (ตัว)
พฤศจิกายน (2559)	แหลมตาเส็ง	4	-
	เกาะตาเรือง	7	-
	ทางเข้าประมงเชิงพาณิชย์	12	-
ธันวาคม (2559)	แหลมตาเส็ง	17	2
	เกาะตาเรือง	15	4
	ทางเข้าประมงเชิงพาณิชย์	7	1
มกราคม (2560)	แหลมตาเส็ง	16	8
	เกาะตาเรือง	9	6
	ทางเข้าประมงเชิงพาณิชย์	16	8
รวม	-	103	29

4.2 ผลการระบุเพศนกด้วยเทคนิคทางโมเลกุล

การระบุเพศของนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่นจำนวน 103 ตัวอย่าง ใช้ไพรเมอร์ P2/P8 ทำการเพิ่มปริมาณในส่วนของยีน *CHD* หลังจากตรวจผล PCR product ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส ใช้อะกาโรสความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ พบว่า เมื่อเปรียบเทียบขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่ปรากฏกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 50 คู่เบส สามารถทราบขนาดของแถบดีเอ็นเอตัวอย่างได้ดังรูปที่ 4.1 โดยเพศผู้พบแถบขนาดดีเอ็นเอ 1 แถบ มีขนาด 375 คู่เบสของอัลลีล *CHD-Z* ได้แก่ตัวอย่าง NP157, NP193, NP194, NP210, NP211 และ NP215 ส่วนเพศเมียพบแถบดีเอ็นเอ 2 แถบ มีขนาด 375 คู่เบสของอัลลีล *CHD-Z* และขนาด 400 คู่เบสของอัลลัล *CHD-W* ได้แก่ตัวอย่าง NP160, NP162, NP207 และ NP209 พบว่าสามารถระบุเพศนกได้ 101 ตัวอย่าง คิดเป็น 98.06 เปอร์เซ็นต์ แบ่งเป็นเพศผู้ 42 ตัว คิดเป็น 41.58 เปอร์เซ็นต์ เพศเมีย 59 ตัว คิดเป็น 58.42 เปอร์เซ็นต์ และไม่สามารถระบุเพศได้ 2 ตัวอย่าง คิดเป็น 1.94 เปอร์เซ็นต์ เป็นตัวอย่างที่เก็บด้วยกระดาษ FTA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซึ่งมีปริมาณเลือดน้อย จึงทำให้ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ เมื่อคิดอัตราส่วนเพศผู้ต่อเพศเมีย ได้เท่ากับ 1:1 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ วิลาวัณย์ และคณะ (2558) ใช้ไพรเมอร์ P2/P8 ทำการระบุเพศของนกพงในสกุล *Acrocephalus* ได้แก่ นกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น นกพงคิ้วดำ นกพงปากหนา และนกสกุล *Locustella* ได้แก่ นกพงตั๊กแตนอกลาย และนกพงตั๊กแตนท้ายทอยสีเทา พบว่านกพงในสกุล *Acrocephalus* มีขนาดของอัลลีล *CHD-Z* ประมาณ 370 คู่เบส และขนาดของอัลลีล *CHD-W* ประมาณ 390 คู่เบส และมีอัตราส่วนเพศเท่ากับ 1:1 ด้วย



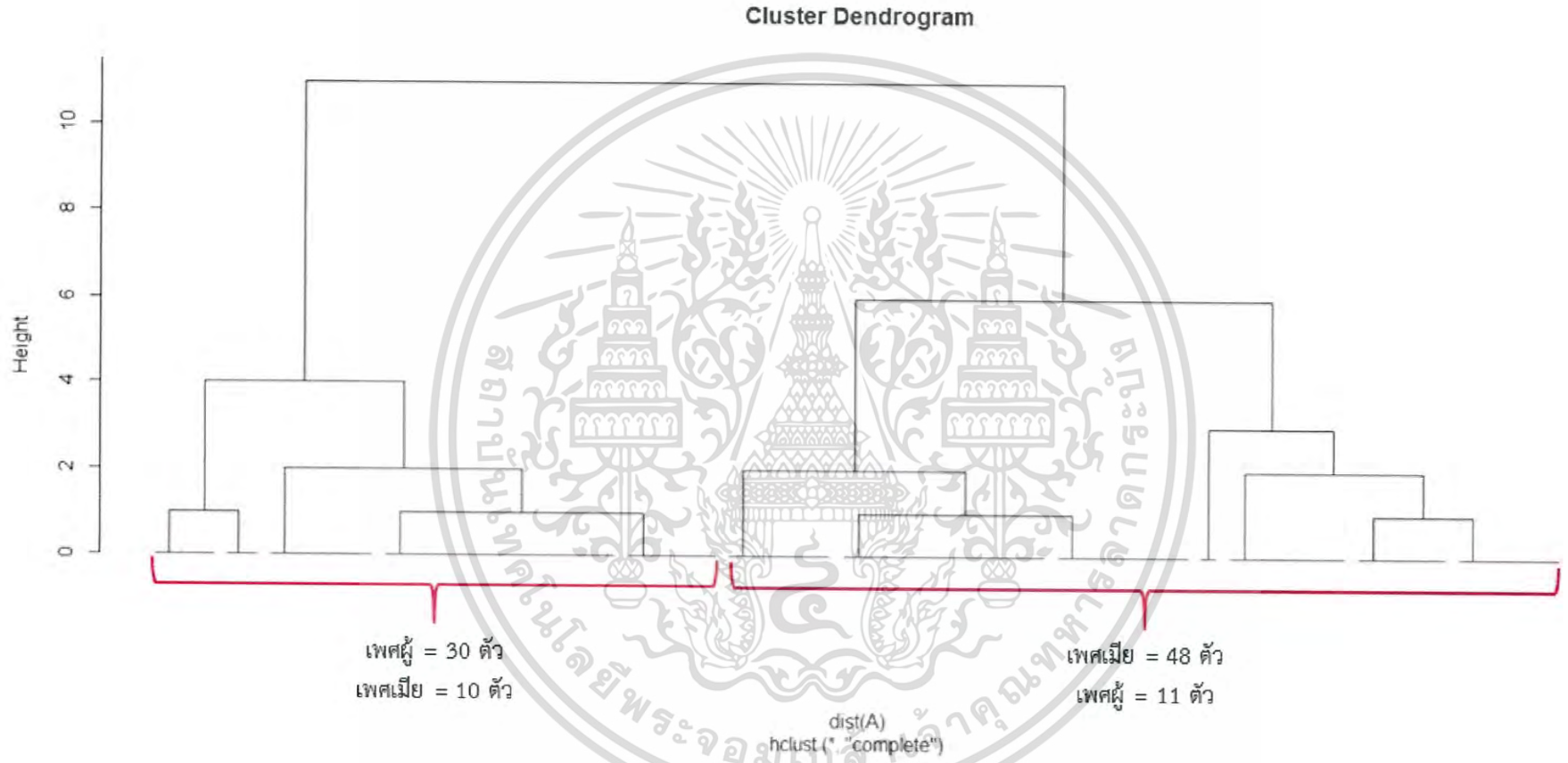
รูปที่ 4.1 การระบุเพศนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่นด้วยไพรเมอร์ P2/P8 โดยใช้ 2% อะกาโรสเจล ในการแยกเพศ เลนที่ 1 คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 50 คู่เบส เลนที่ 2-11 คือตัวอย่างนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่นที่นำมาศึกษา M คือ เพศผู้ F คือ เพศเมีย

4.3 ผลการหาความสัมพันธ์ระหว่างเพศและลักษณะทางสัณฐานวิทยา

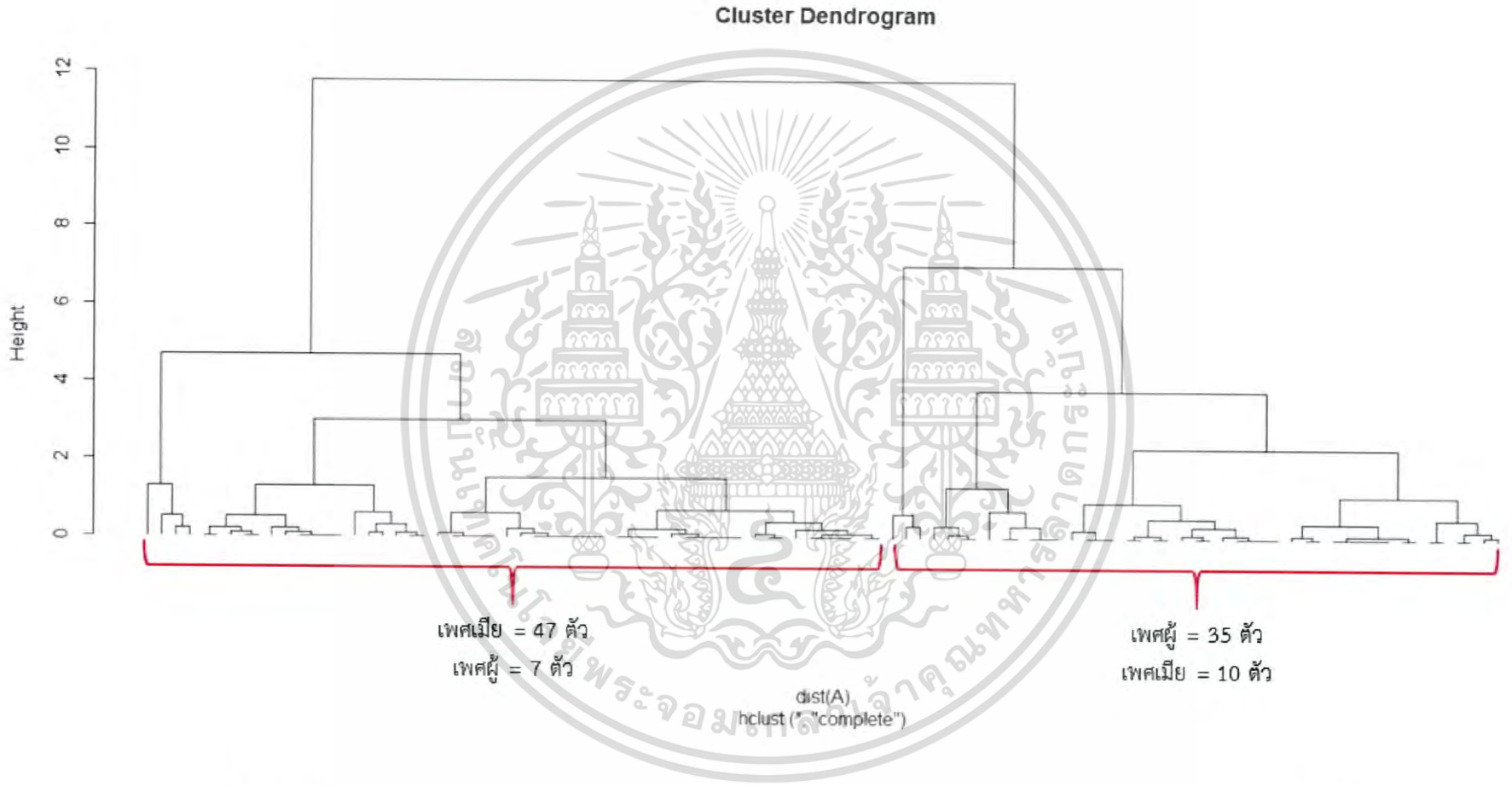
จากการเก็บตัวอย่างนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่นบริเวณเขตห้ามล่าสัตว์ป่าบึงบอระเพ็ด จังหวัดนครสวรรค์ จำนวน 103 ตัวอย่าง ไม่สามารถระบุเพศได้ 2 ตัวอย่าง และมีข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยาไม่ชัดเจน 2 ตัวอย่าง แสดงดังตารางภาคผนวกที่ ก-2 ในการศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่างเพศกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาจึงศึกษาเพียง 99 ตัวอย่าง โดยทำการวัดลักษณะทางสัณฐานวิทยาของนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่นทั้งหมด 6 ลักษณะ ได้แก่ น้ำหนัก ความยาวปีก ความยาวปาก ความยาวหัวปาก ความยาวหน้าแข้ง และความยาวหาง แสดงตังตารางภาคผนวกที่ ก-2

เมื่อนำข้อมูลจากการวัดลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ได้กล่าวมาข้างต้นนั้นมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม R x64 3.4.0 เพื่อคัดเลือกหาลักษณะที่สามารถระบุเพศได้ พบว่าน้ำหนักและความยาวปีกมีความสัมพันธ์กับการระบุเพศ สามารถแบ่งข้อมูลออกเป็นกลุ่มโดยแยกเพศผู้และเพศเมียได้ดังรูปที่ 4.2 แสดงตัวอย่าง Cluster Dendrogram ของความยาวปีก และรูปที่ 4.3 แสดงตัวอย่าง Cluster Dendrogram ของน้ำหนัก ส่วนลักษณะอื่นๆ 4 ลักษณะไม่มีความสัมพันธ์กับเพศ (ความยาวปาก ความยาวหัวปาก ความยาวหน้าแข้ง และความยาวหาง) ดังรูปที่ 4.4 แสดงตัวอย่าง Cluster Dendrogram ของความยาวหาง

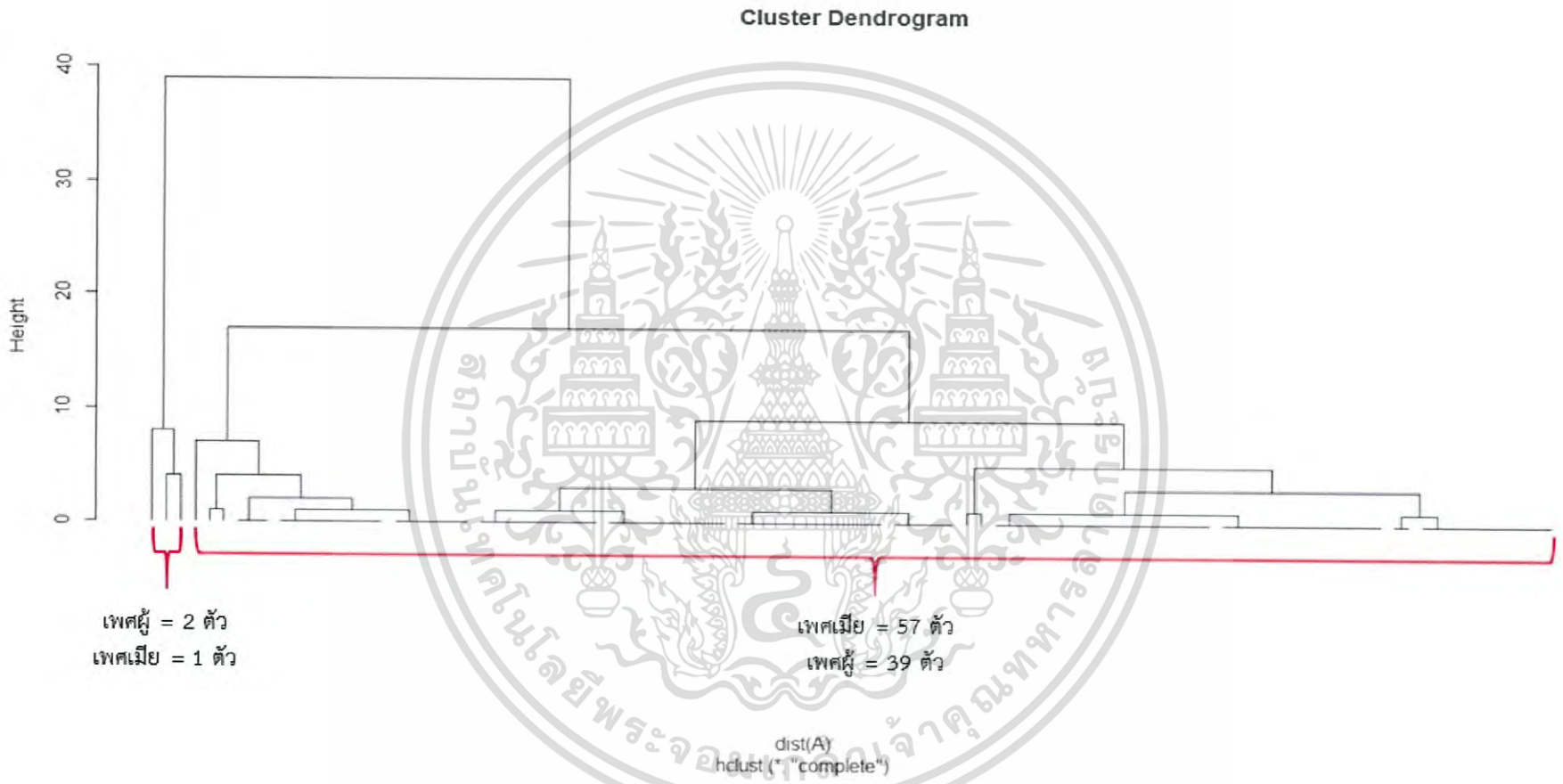
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.2 การวิเคราะห์ Cluster Dendrogram ที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม R x64 3.4.0 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเพศกับความยาวปีก



รูปที่ 4.3 การวิเคราะห์ Cluster Dendrogram ที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม R x64 3.4.0 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเพศกับน้ำหนัก



รูปที่ 4.4 การวิเคราะห์ Cluster Dendrogram ที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม R x64 3.4.0 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเพศกับความยาวหาง

เมื่อนำข้อมูลที่ได้จากการวัดลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ได้กล่าวมาข้างต้นนั้น นำมาคัดเลือกหาลักษณะที่สามารถระบุเพศได้ วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Rapid Miner พบว่า น้ำหนักและความยาวปีกมีความสัมพันธ์กับการระบุเพศ ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม R x64 3.4.0 ดังนั้นจึงเลือกใช้น้ำหนัก และความยาวปีกสร้างแบบจำลองเพื่อหาค่าที่เหมาะสมสำหรับการระบุเพศของนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่นในภาคสนาม แสดงดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 ลักษณะ ข้อสันนิษฐาน ค่าความผิดพลาดในการทำนายเพศด้วยน้ำหนักหรือความยาวปีก

ลักษณะ	ข้อสันนิษฐาน	เพศผู้ (ตัว)	เพศเมีย (ตัว)	ค่าความผิดพลาด (ตัว)	ค่าความผิดพลาด (เปอร์เซ็นต์)
น้ำหนัก (BW)	> 23.85 กรัม (เพศผู้)	28	1	1	14.14
	≤ 23.85 กรัม (เพศเมีย)	13	57	13	
ความยาวปีก (MW)	> 80.50 มิลลิเมตร (เพศผู้)	38	20	20	23.23
	≤ 80.50 มิลลิเมตร (เพศเมีย)	3	38	3	

จากข้อมูลตารางที่ 4.2 พบว่า น้ำหนักที่สามารถระบุเพศได้ คือ ค่ามากกว่า 23.85 กรัม จะระบุว่าเป็นเป็นเพศผู้ และน้อยกว่าหรือเท่ากับ 23.85 กรัม จะระบุว่าเป็นเพศเมีย โดยมีค่าความผิดพลาดคิดเป็น 14.14 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งน้อยกว่าความยาวปีกที่มีความผิดพลาดคิดเป็น 23.23 เปอร์เซ็นต์ จากงานวิจัยของ Kaluszewicz *et al.*, (2013) ได้ทำการระบุเพศของนก *Locustella luscinioides* ที่อยู่ในอันดับ Passeriformes ซึ่งเป็นนกในอันดับเดียวกับนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น โดยทำการระบุเพศนกที่ยังไม่โตเต็มวัยและนกตัวเต็มวัยพบว่าลักษณะที่ดีที่สุดที่นำมาใช้หนึ่งในนั้น คือ ความยาวปีก สำหรับงานวิจัยนี้พบว่าน้ำหนักเป็นลักษณะที่เหมาะสมที่ใช้ในการระบุเพศโดยใช้ลักษณะเดียว และเมื่อวิเคราะห์น้ำหนักควบคู่กับความยาวปีกซึ่งได้ค่าที่เหมาะสมสำหรับการระบุเพศของนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่นในภาคสนามแสดงดังตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 ลักษณะ ข้อสันนิษฐาน ค่าความผิดพลาดในการทำนายเพศด้วยน้ำหนักและความยาวปีก

น้ำหนัก (BW)	ความยาวปีก (MW)	เพศผู้ (ตัว)	เพศเมีย (ตัว)	ค่าความผิดพลาด (ตัว)	ค่าผิดพลาด (เปอร์เซ็นต์)
> 23.85 กรัม	> 80.50 มิลลิเมตร (เพศผู้)	27	0	0	10.10
	≤ 80.50 มิลลิเมตร (เพศเมีย)	1	1	1	
≤ 23.85 กรัม	> 84.50 มิลลิเมตร (เพศผู้)	4	0	0	
	≤ 84.50 มิลลิเมตร (เพศเมีย)	9	57	9	

จากตารางที่ 4.3 โดยจะพิจารณาน้ำหนักเป็นอันดับแรกว่าอยู่ในช่วงใด ร่วมกับข้อมูลความยาวปีกก่อนการระบุเพศ ซึ่งกรณีที่ 1 น้ำหนักมากกว่า 23.85 กรัม ความยาวปีกมากกว่า 80.50 มิลลิเมตร จะระบุเป็นเพศผู้ ถ้าความยาวปีกน้อยกว่าหรือเท่ากับ 80.50 มิลลิเมตร จะระบุเป็นเพศเมีย กรณีที่ 2 น้ำหนักน้อยกว่าหรือเท่ากับ 23.85 กรัม ความยาวปีกมากกว่า 84.50 มิลลิเมตร จะระบุ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นเพศผู้ ถ้าความยาวปีกน้อยกว่าหรือเท่ากับ 84.50 มิลลิเมตร จะระบุเป็นเพศเมีย จากงานวิจัยของ Wojczulanis-Jakubus and Jakubus, (2011) ได้ทำนายเพศของนก *Acrocephalus schoenobaenus* ซึ่งเป็นนกที่อยู่ในสกุลเดียวกับนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น โดยทำการวัดลักษณะทางสัณฐานวิทยาของนกที่ยังไม่โตเต็มวัย โดยทำการวัดความยาวปีก ความยาวหาง ความยาวหัวถึงหาง ความยาวปาก ความหนาของปาก ความสูงของปาก ความกว้างของหน้าแข้ง และความยาวของกรงเล็บ พบว่าความยาวปีกและปากเป็นลักษณะที่ดีที่สุดสำหรับการระบุเพศ โดยมีค่าความผิดพลาดคิดเป็น 18 เปอร์เซ็นต์ แต่ในงานวิจัยนี้ได้มีการเก็บข้อมูลน้ำหนักร่วมด้วย พบว่า น้ำหนักและความยาวปีก คือลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่เหมาะสมในการระบุเพศ โดยมีค่าความผิดพลาดคิดเป็น 10.10 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อนำข้อมูลจากแบบจำลองไปใช้ในภาคสนาม โดยในเบื้องต้นทำการสุ่มจากจำนวน 99 ตัวอย่างมา 30 ตัวอย่างดังตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 ผลการระบุเพศตามแบบจำลองโดยอาศัยข้อมูลน้ำหนัก ความยาวปีก น้ำหนักและความยาวปีก

รหัสตัวอย่าง	น้ำหนัก	ความยาวปีก	การระบุด้วยโมเลกุล	การระบุด้วยน้ำหนัก	ความถูก/ผิด	การระบุด้วยความยาวปีก	ความถูก/ผิด	การระบุด้วยน้ำหนักและความยาวปีก	ความถูก/ผิด
NP119	21.4	77	เมีย	เมีย	✓	เมีย	✓	เมีย	✓
NP125	19.1	77	เมีย	เมีย	✓	เมีย	✓	เมีย	✓
NP126	23.2	82	เมีย	เมีย	✓	ผู้	×	เมีย	✓
NP136	21.7	77	เมีย	เมีย	✓	เมีย	✓	เมีย	✓
NP137	21.7	80	เมีย	เมีย	✓	เมีย	✓	เมีย	✓
NP138	21.6	78	เมีย	เมีย	✓	เมีย	✓	เมีย	✓
NP150	21.5	76	เมีย	เมีย	✓	เมีย	✓	เมีย	✓
NP152	25.7	85	ผู้	ผู้	✓	ผู้	✓	ผู้	✓
NP153	22.6	82	เมีย	เมีย	✓	ผู้	×	เมีย	✓
NP154	24.9	87	ผู้	ผู้	✓	ผู้	✓	ผู้	✓
NP155	22.0	77	เมีย	เมีย	✓	เมีย	✓	เมีย	✓
NP161	23.2	81	เมีย	เมีย	✓	ผู้	×	เมีย	✓
NP162	20.4	80	เมีย	เมีย	✓	เมีย	✓	เมีย	✓
NP173	23.7	80	เมีย	เมีย	✓	เมีย	✓	เมีย	✓
NP174	24.2	79	ผู้	ผู้	✓	เมีย	×	เมีย	×
NP175	18.9	78	เมีย	เมีย	✓	เมีย	✓	เมีย	✓
NP176	26.7	81	ผู้	ผู้	✓	ผู้	✓	ผู้	✓
NP177	23.0	87	ผู้	เมีย	×	ผู้	✓	ผู้	✓
NP190	25.3	84	ผู้	ผู้	✓	ผู้	✓	ผู้	✓
NP191	22.4	80	ผู้	เมีย	×	เมีย	×	เมีย	×
NP192	22.4	76	เมีย	เมีย	✓	เมีย	✓	เมีย	✓
NP193	29.0	85	ผู้	ผู้	✓	ผู้	✓	ผู้	✓
NP194	24.6	85	ผู้	ผู้	✓	ผู้	✓	ผู้	✓
NP201	22.9	87	ผู้	เมีย	×	ผู้	✓	ผู้	✓
NP202	25.7	82	ผู้	ผู้	✓	ผู้	✓	ผู้	✓
NP214	21.1	80	เมีย	เมีย	✓	เมีย	✓	เมีย	✓
NP215	24.7	83	ผู้	ผู้	✓	ผู้	✓	ผู้	✓
NP216	22.9	83	เมีย	เมีย	✓	ผู้	×	เมีย	✓
NP217	24.7	83	ผู้	ผู้	✓	ผู้	✓	ผู้	✓
NP218	21.9	77	เมีย	เมีย	✓	เมีย	✓	เมีย	✓

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

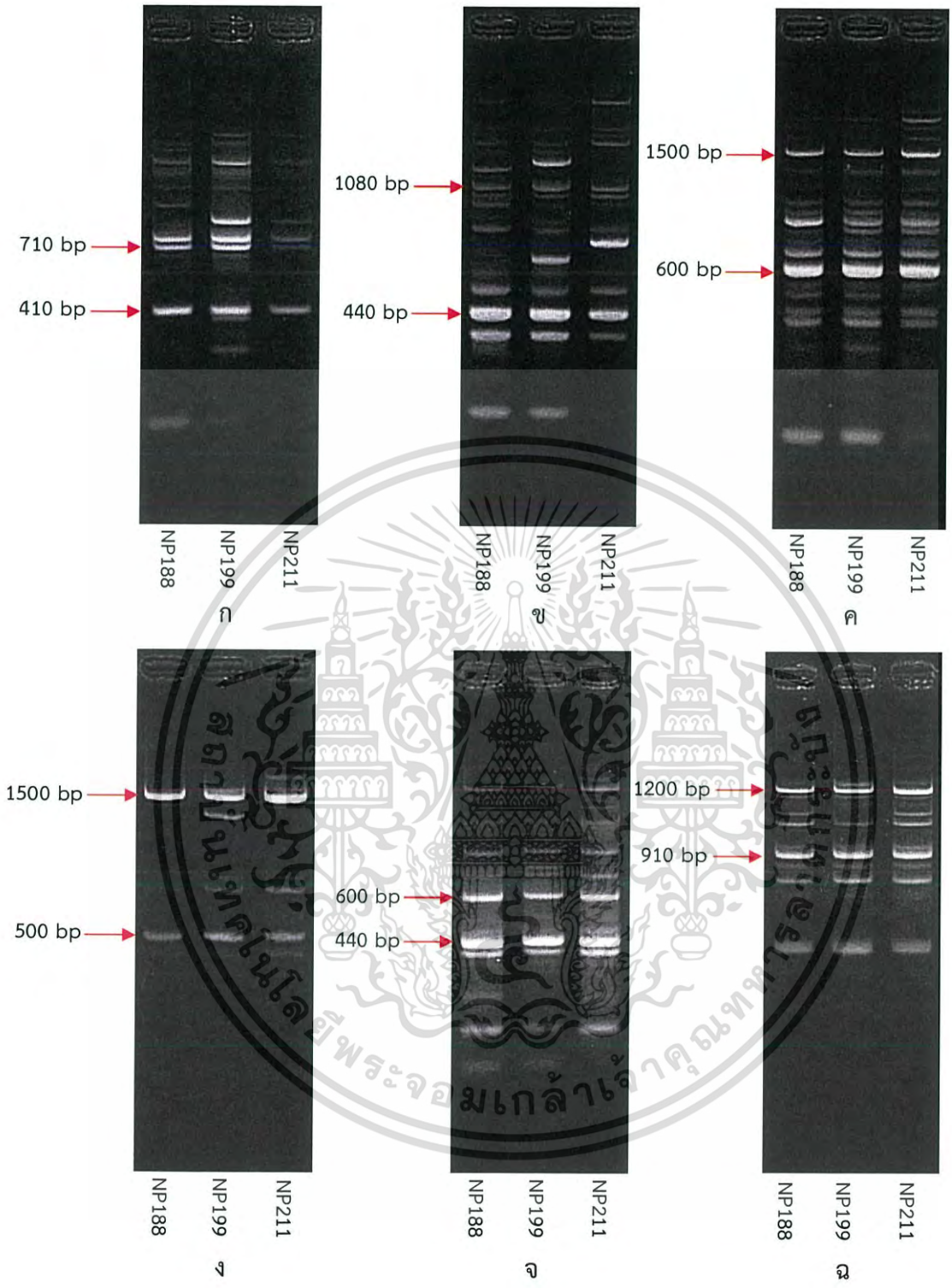
จากตารางที่ 4.4 เมื่อทดสอบแบบจำลองสำหรับการระบุเพศโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเปรียบเทียบกับการระบุเพศด้วยเทคนิคทางโมเลกุลทั้ง 30 ตัวอย่าง แบ่งเป็นนกอายุ 1 ปี 19 ตัว และนกอายุ 2 ปี 11 ตัว พบว่า การใช้ช่วงลักษณะของความยาวปีกระบุเพศเพียงลักษณะเดียว ระบุเพศผิดพลาดจำนวน 6 ตัว เมื่อเปรียบเทียบกับการระบุเพศด้วยเทคนิคทางโมเลกุล คิดเป็นค่าความผิดพลาด 20 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อใช้ช่วงของน้ำหนักเพียงลักษณะเดียว ระบุเพศผิดพลาดจำนวน 3 ตัว เมื่อเปรียบเทียบกับการระบุเพศด้วยเทคนิคทางโมเลกุล คิดเป็นค่าความผิดพลาด 10 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อใช้ช่วงของน้ำหนักควบคู่กับความยาวปีกสามารถระบุเพศได้ โดยระบุเพศผิดจำนวน 2 ตัว เมื่อเปรียบเทียบกับการระบุเพศด้วยเทคนิคทางโมเลกุล คิดเป็นค่าความผิดพลาดเพียง 6.67 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งค่าความผิดที่เกิดขึ้นอาจเกิดจากนกที่มีอายุ 1 ปี แต่อย่างไรก็ตาม ในงานวิจัยทั้ง 2 ที่กล่าวมานั้นไม่ได้เก็บข้อมูลของน้ำหนัก ซึ่งในงานวิจัยในครั้งนี้ พบว่าในอนาคตหากมีการประยุกต์ใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาในการระบุเพศนกภาคสนามสามารถเลือกใช้น้ำหนักและความยาวปีกควบคู่กันไปได้ ส่วนตัวอย่างที่ไม่สามารถระบุเพศด้วยเทคนิคทางโมเลกุล 2 ตัวอย่าง (NP187, NP213) เมื่อนำมาระบุเพศด้วยช่วงที่ได้จะเป็นเพศเมีย ซึ่งข้อมูลนี้เป็นเพียงการคาดเดาจากช่วงเท่านั้น เพื่อให้ข้อมูลมีความถูกต้องมากขึ้นในการเก็บตัวอย่างเลือดควรเก็บให้มีปริมาณที่เหมาะสมจะทำให้ง่ายต่อการสกัดและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

4.4 ผลการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายทางโมเลกุล inter Primer Binding Site (iPBS)

4.4.1 ผลการเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมสำหรับการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม

จากการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการเลือกไพรเมอร์จากงานวิจัยของ Kalendar *et al.*, (2010) จำนวน 15 ไพรเมอร์ ซึ่งคัดเลือกโดยดูจากค่า PCR efficiency ที่มีประสิทธิภาพทั้งในพืช และสัตว์ เพื่อทดสอบหาไพรเมอร์ที่มีความเหมาะสมในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น จากนั้นทำการจัดกลุ่มของไพรเมอร์ตามค่า Optimal annealing-temperature (Ta) ที่ใกล้เคียงกัน แบ่งออกได้ 3 กลุ่ม สุ่มตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้จากสกัดเลือดของนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่นจำนวน 3 ตัวอย่าง คือ NP188, NP199 และ NP211 เป็นตัวคัดเลือกไพรเมอร์โดยอาศัยปฏิกิริยา PCR ด้วยเครื่องหมายทางโมเลกุล iPBS และตรวจผลด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทร-โฟรีซิสที่ความเข้มข้นอะกาโรสเจล 2% เพื่อคัดเลือกไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอชัดเจนและสามารถบอกความแตกต่างได้ เมื่อใช้ไพรเมอร์กลุ่มที่ 1 (Ta = 50.6 องศาเซลเซียส) พบว่าไพรเมอร์ 2074 2402 2253 ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอมากและชัดเจน ไพรเมอร์กลุ่มที่ 2 (Ta = 52.6 องศาเซลเซียส) พบว่าให้แถบ ดีเอ็นเอชัดเจนแต่มีไพรเมอร์ 2252 เพียงไพรเมอร์เดียวที่ให้แถบดีเอ็นเอแตกต่างกันในแต่ละตัวอย่าง และไพรเมอร์กลุ่มที่ 3 (Ta = 55.1 องศาเซลเซียส) พบว่าไพรเมอร์ 2251 และ 2242 ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอมากและชัดเจน สามารถแยกความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอในแต่ละตัวอย่างได้ดีกว่าไพรเมอร์อื่น ดังนั้นไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่เหมาะสมสำหรับศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น มีเพียง 6 ไพรเมอร์ คือ 2074, 2402, 2253, 2252, 2251 และ 2242 แสดงดังรูปที่ 4.5 ก-ฉ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

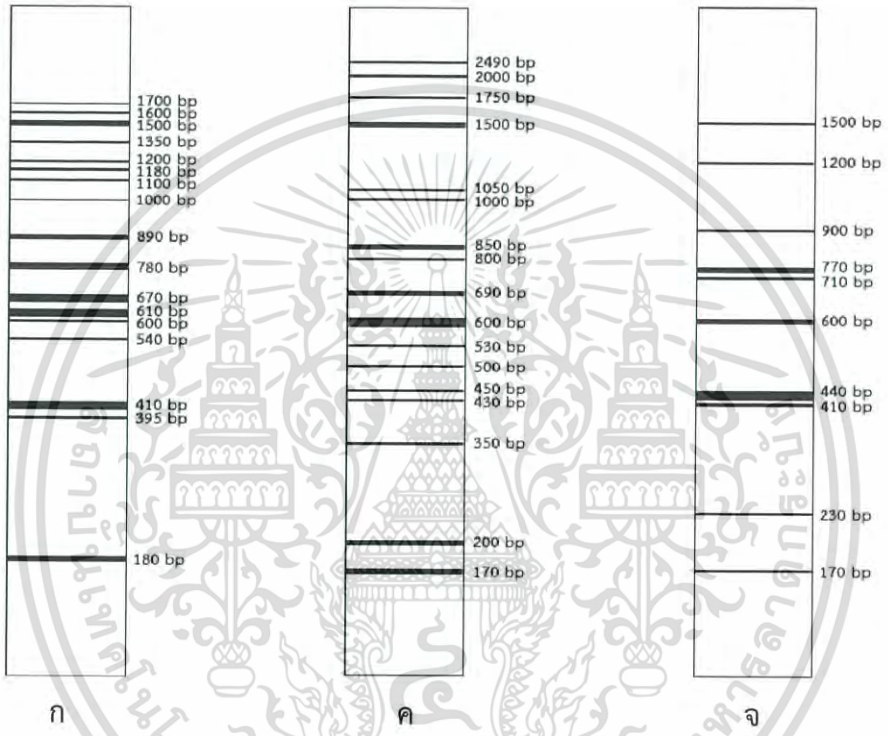


รูปที่ 4.5 ลักษณะแถบดีเอ็นเอการคัดเลือกไพรเมอร์สำหรับการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายทางโมเลกุล iPBS ของนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น (ก) ไพรเมอร์ 2074 (ข) ไพรเมอร์ 2242 (ค) ไพรเมอร์ 2251 (ง) ไพรเมอร์ 2252 (จ) ไพรเมอร์ 2253 (ฉ) ไพรเมอร์ 2402

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4.2 ผลการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น

จากการคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่นด้วยเทคนิค iPBS จำนวน 6 ไพรเมอร์ สุ่มตัวอย่างที่เก็บจากบริเวณเขตห้ามล่าสัตว์ป่าบึงบอระเพ็ด นำมาทำปฏิกิริยา PCR กับไพรเมอร์ที่เลือกไว้ 6 ไพรเมอร์ ตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่าแถบดีเอ็นเอของแต่ละตัวอย่างที่เกิดขึ้นจะมีความแตกต่างกันในแต่ละไพรเมอร์ ดังรูปที่ 4.6 ก ค และจ ตัวอย่าง DNA Profiles ของไพรเมอร์ 2074 2251 2253 ที่ใช้ศึกษา ความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค iPBS พบว่าให้แถบดีเอ็นเอของแต่ละตัวอย่างมีความแตกต่างกันในบางตำแหน่งซึ่งแสดงถึงความหลากหลาย



รูปที่ 4.6 ดีเอ็นเอโปรไฟล์ของนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่นที่ได้จากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายทางโมเลกุล iPBS (ก) ไพรเมอร์ 2074 (ค) ไพรเมอร์ 2251 (จ) ไพรเมอร์ 2253

เมื่อนำแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นของทั้งหมดมาวิเคราะห์ผลโดยแปลผลแถบดีเอ็นเอด้วยการให้ค่าคะแนน ซึ่งหากเกิดแถบดีเอ็นเอจะให้คะแนนเป็น 1 หากไม่เกิดแถบดีเอ็นเอให้คะแนนเป็น 0 ซึ่งจะเรียกการให้คะแนนลักษณะนี้ว่า Binary และทำการวิเคราะห์ผลหาจำนวน Polymorphic band และ Monomorphic band ได้ผลดังตารางที่ 4.5 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ทั้งหมด 6 ไพรเมอร์ มีจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นทั้งหมด 101 แถบมีขนาดระหว่าง 170-3,000 คู่เบส เป็นชนิด monomorphic จำนวน 39 แถบ คิดเป็นค่า Monomorphism เท่ากับ 38.61 เปอร์เซ็นต์ และเป็นชนิด Polymorphic จำนวน 62 แถบ คิดเป็นค่า Polymorphism 61.39 เปอร์เซ็นเซ็นต์

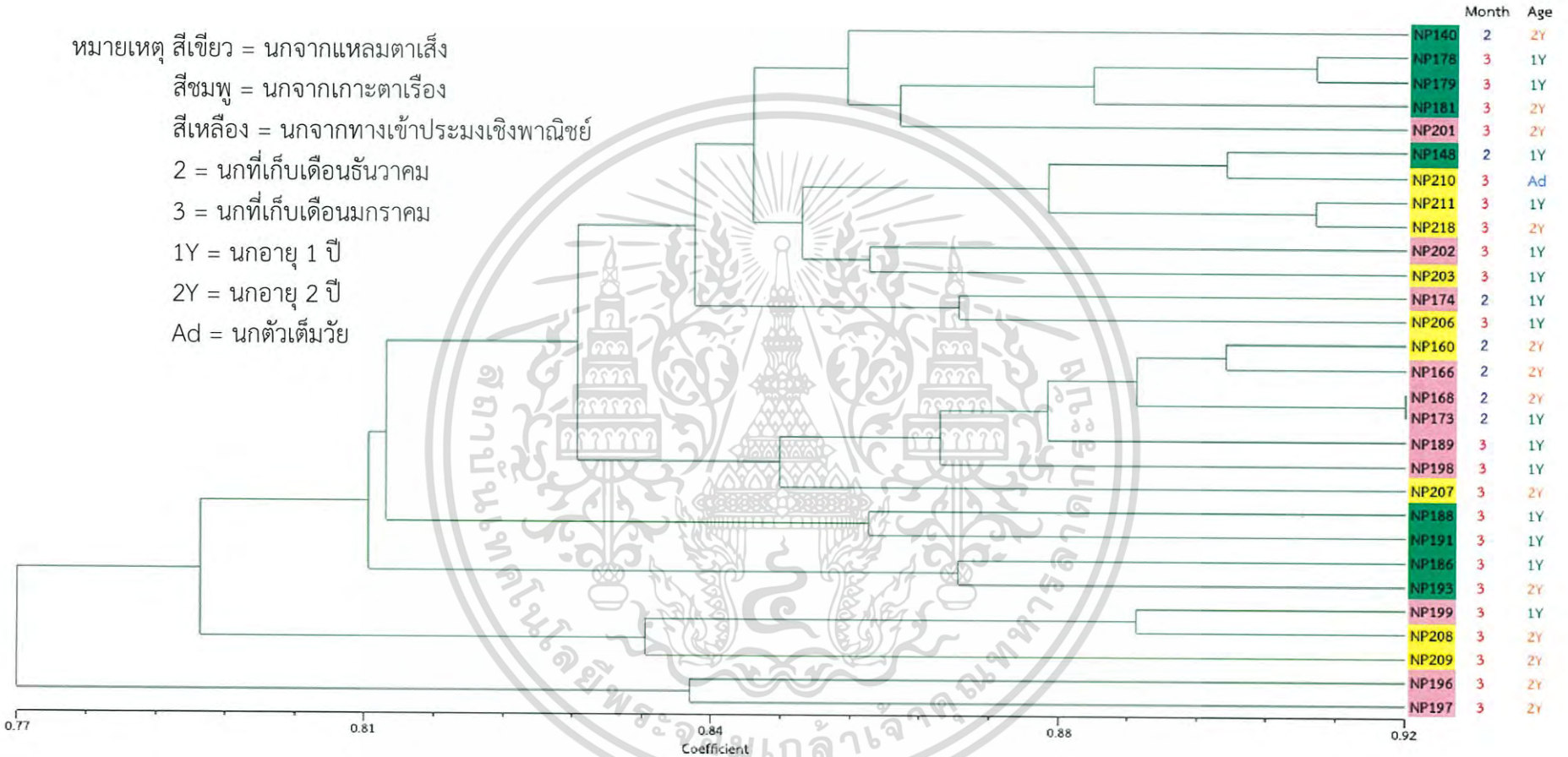
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น ด้วยเทคนิค iPBS จากไพรเมอร์จำนวน 6 ไพรเมอร์

Primer	Optimal Annealing Ta (C°)	Amplified Fragment	Monomorphic Fragment	Polymorphic Fragment	Monomorphism (%)	Polymorphism (%)
2074	49.6	18	8	10	44.44	55.56
2242	57.0	35	7	28	24.32	75.68
2251	53.2	17	9	8	52.97	47.06
2252	51.6	8	3	5	37.50	62.50
2253	51.0	10	3	7	30.00	70.00
2402	50.0	13	9	4	69.23	30.77
รวม	-	101	39	62	38.61	61.39

จากการแปลผลแถบดีเอ็นเอโดยการให้คะแนนแบบ binary สามารถนำไปวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรม NTSYSpc 2.1X และสร้างเป็นแผนภูมิความสัมพันธ์ (Dendrogram) ซึ่งเลือกวิธีการจัดแบบ Unweightede Pair Group Method Using Arithmetic Average (UPGMA) พบว่าเมื่อเปรียบเทียบความสัมพันธ์จากการสุ่มตัวอย่างจำนวน 29 ตัวอย่าง ปรากฏค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์หรือความใกล้ชิดกัน (similarity coefficient) อยู่ระหว่าง 0.77-0.92 แสดงในภาคผนวก ค ตัวอย่างที่มีความใกล้ชิดกันมากที่สุด คือรหัส NP168 และ NP173 มีค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์เท่ากับ 0.92 ตัวอย่างที่มีความแตกต่างกันมากที่สุดมี 3 คู่ตัวอย่าง คู่ที่ 1 คือ NP140 กับ NP197 คู่ที่ 2 คือ NP181 กับ NP209 และคู่ที่ 3 คือ NP189 กับ NP193 มีค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์เท่ากับ 0.69 ซึ่งแสดงว่านกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่นใน 3 สถานที่ที่ทำการเก็บตัวอย่างมีความหลากหลายเพียงเล็กน้อย และที่ค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์เท่ากับ 0.79 สามารถแบ่งนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่นได้ 3 กลุ่ม พบว่าไม่มีความสัมพันธ์กับสถานที่ เดือนที่เก็บตัวอย่าง และอายุ สาเหตุเนื่องมาจากสถานที่ทั้ง 3 สถานที่อยู่ใกล้เคียงกัน เดือนที่เก็บตัวอย่างนั้นมีช่วงเวลาที่ใกล้กัน และนกแต่ละวัยมีพฤติกรรมในการอพยพต่างบินมาตามสัญชาตญาณโดยไม่มีการชักนำของตัวเต็มวัย ดังรูปที่ 4.6 แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ระหว่างนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่นในแต่ละสถานที่ โดยกำหนดให้ กรอบสีเขียวแทนตัวอย่างนกจากแหลมตาเสง กรอบสีชมพูแทนตัวอย่างนกจากเกาะตาเรือง กรอบสีเหลืองแทนตัวอย่างนกจากทางเข้าประมงเชิงพาณิชย์ Month คือเดือนที่เก็บตัวอย่าง กำหนดให้ หมายเลข 2 แทนตัวอย่างนกในเดือนธันวาคม หมายเลข 3 แทนตัวอย่างนกในเดือนมกราคม Age คือ อายุของนก กำหนดให้ 1Y แทนอายุของนก 1 ปี 2Y แทนอายุของ 2 ปี Ad แทนอายุของนกตัวเต็มวัย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.7 แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ (Dendrogram) ของนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่นจำนวน 29 ตัวอย่าง ด้วยโปรแกรม NTSYSpc 2.1x เลือกวิธีจัดแบบ Unweightede Pair Group Method Using Arthmetic Average (UPGMA)

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

นกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น (*Acrocephalus orientalis*) จัดเป็นนกที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาเหมือนกันทั้งเพศผู้และเพศเมีย การระบุเพศจากลักษณะภายนอกจึงเป็นไปได้ยาก ดังนั้นจึงใช้เทคนิคทางโมเลกุลในการระบุเพศของนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น จากการเก็บตัวอย่างบริเวณเขตห้ามล่าสัตว์ป่าบึงบอระเพ็ด จังหวัดนครสวรรค์ จำนวน 103 ตัวอย่าง จาก 3 สถานที่ คือ แหลมตาเสง เกาะตาเรือง และทางเข้าประมงเชิงพาณิชย์ ระบุเพศโดยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR ตรงบริเวณตำแหน่งยีน *CHD* ด้วยไพรเมอร์ P2/P8 อุณหภูมิ annealing เท่ากับ 53 องศาเซลเซียส ซึ่งเพศผู้มีอัลลีล *CHD-Z* เพียงอัลลีลเดียวที่มีขนาดเท่ากัน ส่วนเพศเมียมีอัลลีล *CHD-Z* และอัลลีล *CHD-W* ที่มีขนาดแตกต่างกัน เมื่อนำ PCR Product ไปทำการวิเคราะห์ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟริซิส พบว่าเพศผู้เกิดแถบ 1 แถบ (ZZ) มีขนาดดีเอ็นเอ 375 คู่เบส เพศเมียเกิดแถบ 2 แถบ (ZZ, ZW) มีขนาดดีเอ็นเอ 375 และ 400 คู่เบส ตามลำดับ พบว่าสามารถระบุเพศนกได้ 101 ตัวอย่าง คิดเป็น 98.06 เปอร์เซ็นต์ แบ่งเป็นเพศผู้ 42 ตัว คิดเป็น 41.58 เปอร์เซ็นต์ เพศเมีย 59 ตัว คิดเป็น 58.42 เปอร์เซ็นต์ และไม่สามารถระบุเพศได้ 2 ตัวอย่าง (NP187, NP213) คิดเป็น 1.94 เปอร์เซ็นต์ เมื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างเพศและลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ดีที่สุดในการระบุเพศ คือ การวิเคราะห์น้ำหนักควบคู่กับความยาวปีก โดยจะพิจารณาน้ำหนักเป็นอันดับแรกว่าอยู่ในช่วงใด ร่วมกับข้อมูลความยาวปีกก่อนการระบุเพศ ซึ่งกรณีที่ 1 น้ำหนักมากกว่า 23.85 กรัม ความยาวปีกมากกว่า 80.50 มิลลิเมตร จะระบุเป็นเพศผู้ ถ้าความยาวปีกน้อยกว่าหรือเท่ากับ 80.50 มิลลิเมตร จะระบุเป็นเพศเมีย กรณีที่ 2 น้ำหนักน้อยกว่าหรือเท่ากับ 23.85 กรัม ความยาวปีกมากกว่า 84.50 มิลลิเมตร จะระบุเป็นเพศผู้ ถ้าความยาวปีกน้อยกว่าหรือเท่ากับ 84.50 มิลลิเมตร จะระบุเป็นเพศเมีย สำหรับการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่นด้วยเครื่องหมายทางโมเลกุล iPBS จำนวนทั้งหมด 29 ตัวอย่าง จากการคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมจำนวน 6 ไพรเมอร์ (2074, 2402, 2253, 2252, 2251 และ 2242) จาก 15 ไพรเมอร์ พบว่า ความหลากหลายทางพันธุกรรมมีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน (Similarity coefficiency) ระหว่าง 0.77-0.92 ที่ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนเท่ากับ 0.79 สามารถแบ่งนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่นได้เป็น 3 กลุ่ม ไม่มีความสัมพันธ์กับสถานที่ เดือนที่เก็บตัวอย่าง และอายุ ซึ่งทฤษฎีนี้อาจไม่เป็นไปตามการตั้งสมมติฐาน เนื่องจากจำนวนตัวอย่างที่นำมาใช้ศึกษามีปริมาณน้อยมากเมื่อเทียบกับจำนวนนกทั่วโลกและนกที่อพยพมาในประเทศไทย

5.2 ข้อเสนอแนะ

ควรมีการเก็บตัวอย่างเพิ่มเติมสำหรับการระบุเพศนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่นในภาคสนามโดยใช้น้ำหนักควบคู่กับความยาวปีก พร้อมกับศึกษาการระบุเพศนกด้วยระดับโมเลกุลเพื่อเป็นการยืนยันความถูกต้อง สำหรับการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่นด้วยเครื่องหมายทางโมเลกุล iPBS ควรมีการเก็บตัวอย่างเพิ่มมากขึ้น และเปลี่ยนพื้นที่หรือบริเวณในการศึกษาเป็นพื้นที่ชุ่มน้ำอื่นๆ สำหรับนำไปวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อยืนยันความถูกต้องของผลการวิจัย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กฎกระทรวง กำหนดให้สัตว์ป่าบางชนิดเป็นสัตว์ป่าคุ้มครอง พ.ศ. 2546, (2546, 1 สิงหาคม) ราชกิจจานุเบกษา. 120. 74ก., 38.

กนกรัตน์ ศรีกิจเกษมวัฒน์, กัญญา จิระเจริญรัตน์ และชนาธิป ธรรมการ. 2550. การจำแนกเพศนกสวยงามด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์. กรุงเทพฯ : ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช. 2553. **คู่มือเรื่องนกอพยพ.** กรุงเทพฯ : อรุณการพิมพ์.

จริยา ชมวารี, ชาญวิทย์ ลีลายุวัฒน์ และเต็มดวง ลิ้มไพบูรย์. 2540. "PCR technology and Application." ขอนแก่น : ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทย์ศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

จุฑาพร แสงประจักษ์. 2555. การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและการปรับปรุงพันธุ์ข้าว. มหาสารคาม : ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม.

ส่วนอนุรักษ์สัตว์ป่า กรมป่าไม้กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2542. **เขตห้ามล่าสัตว์ป่าในประเทศไทย.** พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพ : โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย.

ธนากร ฤทธิ์ไธสง. 2546. **นกสวยงาม คู่มือการเพาะเลี้ยงนกสวยงาม.** กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์บริษัท ก.พล(1996) จำกัด.

สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม, ทิพวรรณ์ คำแสน, ธงชาติ ปลอดอ่อน, ธนวรรณ พงศ์พฤกษา และไกรรัตน์ เอี่ยมอำไพ. 2558. "การระบุเพศและความหลากหลายของนกนางนวลแกลบธรรมดา (*Sterna hirundo*)." หน้า 226-231. ใน **การประชุมวิชาการพันธุศาสตร์แห่งชาติ ครั้งที่ 19.** พิมพ์ครั้งที่ 1. ขอนแก่น : โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม, ณิชาภัทร ชอบอาภรณ์ และไกรรัตน์ เอี่ยมอำไพ. 2558. "การเปรียบเทียบเครื่องหมายโมเลกุลชนิด RAPD, SRAP และ iPBS เพื่อใช้ศึกษาความหลากหลายของนกหัวโตทรายเล็ก และการระบุเพศนก." หน้า 320-325. ใน **การประชุมวิชาการพันธุศาสตร์แห่งชาติ ครั้งที่ 19.** พิมพ์ครั้งที่ 1. ขอนแก่น : โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

วิภารัตน์ ศิริพงษ์, สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม, ไกรรัตน์ เอี่ยมอำไพ และดุสิต อาทิตยวาร. 2558. "ความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกตีนเทียน (*Himantopus himantopus*) โดยเทคนิคไอพีบีเอส (iPBS)." หน้า 190-195. ใน **การประชุมวิชาการพันธุศาสตร์แห่งชาติ ครั้งที่ 19.** พิมพ์ครั้งที่ 1. ขอนแก่น : โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

วิลาวัณย์ บัณฑิตพรรณ, สุภานัน สุขศิริ, และอรณิช ดีสิทธิเวช. 2558. "การระบุเพศนกพงบางชนิดและการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่น (*Acrocephalus orientalis*)." โครงงานพิเศษ สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

สมชาติ ธนะ และดุจฤดี ปานพรหมมินทร์. 2557. "ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *CHD-W* และ *CHD-Z* เพื่อการระบุเพศของนกปรอดหัวโขน." *Thai J. Genet.* 7(2) : 104-108.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

สมาคมอนุรักษ์นก และธรรมชาติ แห่งประเทศไทย. 2550. **คู่มือดูนกเบื้องต้น.** [Online]. Available : http://www.bcst.or.th/birding/birding3.htm.

โองการ วณิชาชีวะ และเฟื่องฟ้า สีสร้อย. 2557. "การสร้างรูปแบบดีเอ็นโดยใช้เครื่องหมายเอสอาร์เอพีและไอพีบีเอสของไผ่รวกสยาม (*Thyrsostachys siamensis*)." *วารสารคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์*. 3(1) : 45-56.

โอภาส ขอบเขตต์. 2541. **นกในบึงบอระเพ็ด.** พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : กองประสานการจัดการทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม สำนักงานนโยบายและแผนสิ่งแวดล้อม.

โอภาส ขอบเขตต์. 2541. **นกในเมืองไทย.** เล่ม 1. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์สารคดี.

โอภาส ขอบเขตต์. 2544. **นกในเมืองไทย.** เล่ม 5. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์สารคดี.

Ali, S. and Ripley, S. D. 1973. **Handbook of the Birds of India and Pakistan together with those of Bangladesh, Nepal, Bhutan and Sri Lanka.** Bombay : Oxford University Press.

Bello, N. and Sanchez, A. 1999. "The Identification of Sex-specific DNA Marker in the Ostrich Using a Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Assay. *Molecular Ecology*. 8 : 667–669.

Deignan, H.G. 1963. "Checklist of the Birds of Thailand." *US National Museum Bulletin*. 226 : 1–263.

DuBiec, A. and Neubauer, M.Z. 2006. "Molecular Techniques for Sex Identification in Birds." *Biological Letters*. 43 : 3-12.

Eason, D., Cree, A., Halverson, J. and Lambert, D.M. 2001. "A Comparision of Five Methods for Assignment of Sex in the Takahe." (Aves: *Porphyrio mantelli*). *Journal of Zoology*. 253 : 281-292.

Edgington, D.G. 1989. "Behavioural and Morphological Sexing of the Humboldt Penguin *Spheniscus Humboldti*." *Spheniscid Penguin Newsletter*. 1 : 14-20.

Fujita, Y. and Kubo, S. 2006. "Application of FTA® Technology to Extraction of Sperm DNA from Mixed Body Fluids Containing Semen." *Legal Medicine*.8 : 43-7.

Griffiths, R., Double, M.C., Orr, K. and Dawson, R.J. 1998. "A DNA Test to Sex Most Birds." *Molecular Ecology*. 7 : 1071-1075.

Griffiths, R. and Korn, R.M. 1997. "A *CHD1* Gene is Z Chromosome Linked in the Chicken Gallus Domesticus." *Gene*. 197 : 225-229.

Griffiths, R. and Orr, K. 1999. "The Use of Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) in the Isolation of Sex-specific Markers." *Molecular Ecology*. 8 : 671–674.

Griffiths, R. and Tiwari, B. 1993. "The Isolation of Molecular Genetic Markers for the Identification of Sex." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 90 : 8324–8326.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Hide, G., Hughes, JM., McNuff, R. 2003. "A Rapid and Simple Method of Detection of *Bleharisma japonicum* using PCR and Immobilisation on FTA paper." *BMC Ecology*. 3 : 7.

Inskipp, T., Lindsey, N. and Duckworth, W. 1996. **An annotated checklist of the birds of the Oriental Region.** Sandy : Oriental Bird Club.

Kalendar, R., Antonlus, K., Smykal, P. and Schulman, A.H. 2010. "iPBS: a Universal Method for DNA Finerprinting and Retrotransposon Isolation." *Theoretical and Applied Genetics*. (121) : 1419-1430.

Kennerley, P. and Pearson, D. 1989. **Reed and Bush warblers.** London : A&C Black Publishers Ltd.

King, J. 1998. "Redefining *Acrocephalus* and *Hippolais*." *Birding World* 11 : 42.

Kulaszewicz, I., Jakubas, D. and Wojczulanis-Jakubas, K. 2013. "Sex Discrimination in the Savi's Warbler (*Locustella luscinioides*) Using Morphometric Traits." *Ornis Fennica*. 90 : 203-210.

Lampel, K.A., Dyer, D., Komegay, L., Orlandi, P.A. 2004. "Detection of *Bacillus* spores using PCR and FTA Filters." *Journal of Food Protection*. 67 : 1036-1038.

Lassells, C. and Mateman, A. 1998. "Sexing Birds Using Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers." *Molecular Ecology*. 7 : 187–195.

Lekagul, B. and Round, P. D. 1991. **A Guide to the Birds of Thailand.** Bangkok : Saha Karn Bhaet Co.

Li, W., Xue, F., Li, L., Li, X., Yue, B. and Li, J. 2012. "A Tripleprimer PCR Approach for the Sex Identification of Endangered Phasianidae birds." *European Journal of Wildlife Research*. 58 : 289–294.

Malaitad, T., Poeaim, S. and Eiamampai, K. 2015. "Sex Identification in Bran Swallows (*Hirundorustica Linnaeus*) by Molecular Technique." *Journal of Agricultaral Technology*. 11(8) : 2411-2418.

Nisbet, I.C.T. and Medway, L. 1972. "Dispersion, Population Ecology, and Migration of Eastern Great Reed Warblers (*Acrocephalus orientalis*) Wintering in Malaysia." *Ibis*. 114 : 451-495.

Ogawa, A., Solovei, I., Hutchison, N., Saitoh, Y., Ikeda, J.E., Macgregor, H. and Mizuno S, 1997. "Molecular Characterization and Cytological Mapping of a Non-Repetitive DNA Sequence Region from the W Chromosome of Chicken and its use as a Universal Probe for Sexing Carinatae Birds." *Chromosome Research*. 5 : 93–101.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Omoigui, L.O., Ishiyaku, M.F., Ousmane, B. Gowda, B.S. and Timko M.P. 2011. "Application of fast technology for analysis (FTA)⟶ for sampling and recovery of deoxyribonucleic acid (DNA) for molecular characterization of cowpea breeding lines for Striga resistance." *African Journal of Biotechnology*. 10 (85) : 19681-19986.

Risser, A.C. 1971. "A Technique for Performing Laparotomy on Small Bird." *Condor*. 73 : 376-379.

Sibley, C.G. and Monroe, B.L. 1990. **Distribution and taxonomy of the birds of the world.** New Haven : Yale University Press.

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

Suh, A., Kriegs, J.O., Brosius, J. and Schmitz, J. 2011. "Retroposon insertions and the chronology of avian sex chromosome evolution." *Molecular Biology and Evolution*. 28(11) : 2993–2997.

Taberlet, P., Waits, L.P. and Luikart, G. 1999. "Non invasive genetic sampling: Look before you leap." *Trends in Ecology & Evolution*. 14 : 323-327.

Thammakarn, C., Punchukrang, A., Jirajaroenrat, K. and Srikijkasemwat, K. 2007. "Sex Identification of Some Psittacine Birds by Polymerase Chain Reaction." *Journal of Mahanakorn Veterinary Medicine*. 2(2) : 30-34.

Tone, M., Sakaki, Y., Hashiguchi, T. and Mizuno, S. 1984. "Genus Specificity and Extensive Methylation of the W Chromosome-specific Repetitive DNA Sequences from the Domestic Fowl, Gallus Gallus Domesticus." *Chromosoma*. 89 : 228–237.

Itoh, Y., Suzuki, M., Ogawa, A., Munechika, I., Murata, K. and Mizuno, S. 2001. "Identification of the Sex of a Wide Rang of Carinatae Bird by PCR Using Primer Sets Selected from Chicken EE0.6 and Its Related Sequences." *The American Genetic Association.*

Vucicevic, M., Stevanov-Pavlovic, M., Stevanovic, JC. H. and Avanus, K. 2006. "Sex Identification of Parrot from Feather DNA Using *CHD-W* and *CHD-Z* Genes of Avian Sex Chromosome." *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences.*

Vucicevic, M., Stevanov-Pavlovic, 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.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Whatman, Inc. FTA protocols 2002. Collect, transport, archive and access nucleic acids-all at room temperature. WB 120047.

Wink, M., Sauer-Gürth, H., Martinez, F., Doval, G., Blanco, G. and Hatzofe, O. 1998. "The Use of $(GACA)_4$ PCR to Sex Old World Vultures (Aves: Accipitridae)." *Molecular Ecology. 7 : 779-782.*

Wojczulanis-Jakubas, K. and Jakubas, D. 2011. "Predicting the Sex of the Sedge Warbler (*Acrocephalus schoenobaenus*) by Discriminant Analysis." *Ornis Fennica* 88 : 90-97.

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

ตารางภาคผนวกที่ ก สถานที่เก็บตัวอย่าง วันที่เก็บตัวอย่าง รหัสที่ใช้ในการวิเคราะห์ รหัสห่วงขา อายุ ความยาวปีก ความยาวหัวปาก ความยาวปาก ความยาวหน้าแข้ง ความยาวหาง น้ำหนัก และผลการระบุเพศของนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่นจำนวนทั้งหมด 103 ตัวอย่าง

สถานที่	วันที่	รหัสที่ใช้ในการวิเคราะห์	รหัสห่วงขา	อายุ	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา						ผลการวิเคราะห์
					ความยาว (มิลลิเมตร)					น้ำหนัก (กรัม)	
					ปีก	หัวปาก	ปาก	หน้าแข้ง	หาง		
แหลมตาแส่ง	5/11/2559	NP116	3A19195	2Y	80	42.3	23.9	26.8	70	29.60	เมีย
		NP117	3A19198	1Y	83	43.3	24.2	28.2	73	21.40	เมีย
		NP118	3A19197	1Y	81	44.1	24.7	28.3	75	24.90	ผู้
		NP119	3A19199	1Y	77	42.3	22.7	27.8	67	21.40	เมีย
เกาะตาเรือง	6/11/2559	NP120	3A19201	1Y	84	42.0	21.3	29.0	75	22.90	ผู้
		NP121	3A19202	2Y	80	41.9	23.4	27.4	74	21.00	เมีย
		NP122	3A19203	1Y	83	43.3	24.8	28.6	74	22.50	ผู้
		NP123	3A19204	2Y	80	42.5	22.6	27.7	70	21.30	เมีย
		NP124	3A19205	1Y	77	42.9	23.5	27.8	68	21.20	เมีย
		NP125	3A19206	1Y	77	41.7	21.0	27.0	69	19.10	เมีย
		NP126	3A19207	2Y	82	43.0	23.5	27.8	71	23.20	เมีย

ภาคผนวก ก (ต่อ)

ตารางภาคผนวกที่ ก (ต่อ)

สถานที่	วันที่	รหัสที่ใช้ในการวิเคราะห์	รหัสห่วงขา	อายุ	ลักษณทางสัณฐานวิทยา						ผลการวิเคราะห์
					ความยาว (มิลลิเมตร)						
					ปีก	หัวปาก	ปาก	หน้าแข้ง	หาง	น้ำหนัก	
ทางเข้าประมงเชิงพาณิชย์	9/11/2559	NP127	3A19208	1Y	84	42.0	22.6	28.8	75	24.00	ผู้
		NP128	3A19209	1Y	78	42.5	21.1	26.0	68	20.80	เมีย
		NP129	3A29038RE	2Y	83	41.9	20.0	28.7	73	20.40	เมีย
		NP130	3A19211	1Y	78	42.2	21.6	28.0	67	20.00	เมีย
		NP131	3A19210	1Y	83	43.5	23.5	29.8	43	22.00	ผู้
		NP132	3A16239	1Y	79	41.8	24.6	27.2	68	17.80	เมีย
		NP133	3A19213	2Y	81	43.1	23.8	28.0	74	23.70	เมีย
		NP134	3A19142RE	AD	84	43.0	23.5	28.4	76	22.40	ผู้
		NP135	3A19212	1Y	87	44.0	22.3	29.0	73	24.40	ผู้
		NP136	3A19215	1Y	77	42.2	19.7	27.2	65	21.70	เมีย
		NP137	3A29671	2Y	80	41.9	22.2	27.7	79	21.70	เมีย
		NP138	3A19216	2Y	78	42.2	22.2	27.2	69	21.60	เมีย

ภาคผนวก ก (ต่อ)

ตารางภาคผนวกที่ ก (ต่อ)

สถานที่	วันที่	รหัสที่ใช้ในการวิเคราะห์	รหัสห่วงขา	อายุ	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา						ผลการวิเคราะห์
					ความยาว (มิลลิเมตร)					น้ำหนัก (กรัม)	
					ปีก	หัวปาก	ปาก	หน้าแข้ง	หาง		
แหลมตาเสง	3/12/2559	NP139	3A19245	1Y	85	45.0	24.2	29.2	71	24.50	ผู้
		NP140	4A08341	2Y	87	45.1	23.9	29.1	77	29.30	ผู้
		NP141	3A18277RE	2Y	79	40.7	21.5	26.0	69	18.60	เมีย
		NP142	3A19248	2Y	83	42.9	21.8	28.6	70	21.10	เมีย
		NP143	3A19252	1Y	79	41.7	22.1	27.2	69	21.10	เมีย
		NP144	3A19251	1Y	79	40.8	21.5	26.7	68	20.70	เมีย
		NP145	3A19249	1Y	81	40.8	21.8	25.3	70	22.00	เมีย
		NP146	3A19256	2Y	85	42.9	23.6	28.0	76	26.00	ผู้
		NP147	-	-	-	-	-	-	-	-	ผู้
		NP148	3A19260	1Y	82	43.5	21.9	28.3	71	22.90	ผู้
		NP149	3A19254	1Y	83	44.5	24.4	28.5	73	25.40	ผู้
		NP150	3A19259	1Y	76	41.6	22.9	27.5	68	21.50	เมีย
		NP151	-	-	-	-	-	-	-	-	เมีย

ภาคผนวก ก (ต่อ)

ตารางภาคผนวกที่ ก (ต่อ)

สถานที่	วันที่	รหัสที่ใช้ในการวิเคราะห์	รหัสห่วงขา	อายุ	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา						ผลการวิเคราะห์
					ความยาว (มิลลิเมตร)					น้ำหนัก (กรัม)	
					ปีก	หัวปาก	ปาก	หน้าแข้ง	หาง		
แหลมตาเสิง	3/12/2559	NP152	3A19257	1Y	85	42.7	24.1	29.4	75	25.70	ผู้
		NP153	3A19261	1Y	82	43.8	23.4	27.5	70	22.60	เมีย
		NP154	3A19247	1Y	87	44.3	23.8	27.5	74	24.90	ผู้
		NP155	3A19262	1Y	77	43.1	23.4	27.7	72	22.00	เมีย
ทางเข้าประมงเชิงพาณิชย์	4/12/2559	NP156	3A19264	2Y	85	43.1	23.5	30.7	74	20.60	ผู้
		NP157	3A19266	AD	83	43.3	24.2	28.9	73	21.30	ผู้
		NP158	3A19265	2Y	81	41.8	23.3	26.0	70	20.40	เมีย
		NP159	3A16237RE	-	83	44.0	25.4	29.9	75	25.30	ผู้
		NP160	3A18778RE	2Y	78	42.1	22.4	28.3	69	21.40	เมีย
		NP161	3A19269	2Y	81	41.4	23.0	27.3	73	23.20	เมีย
		NP162	3A29807RE	2Y	80	41.9	22.0	28.7	70	20.40	เมีย
เกาะตาเรือง	5/12/2559	NP163	3A19270	2Y	82	42.9	23.0	28.4	76	21.40	เมีย
		NP164	3A19271	1Y	80	41.4	20.4	24.0	73	20.10	เมีย
		NP165	3A19272	2Y	78	40.6	22.4	29.5	69	20.50	เมีย
		NP166	3A19273	2Y	84	42.6	22.4	26.9	69	22.30	เมีย
		NP167	3A19274	1Y	82	43.4	23.7	28.3	73	23.00	ผู้

ภาคผนวก ก (ต่อ)

ตารางภาคผนวกที่ ก (ต่อ)

สถานที่	วันที่	รหัสที่ใช้ในการวิเคราะห์	รหัสห่วงขา	อายุ	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา						ผลการวิเคราะห์
					ความยาว (มิลลิเมตร)					น้ำหนัก (กรัม)	
					ปีก	หัวปาก	ปาก	หน้าแข้ง	หาง		
เกาะตาเรือง	5/12/2559	NP168	3A19275	1Y	80	41.2	22.4	25.5	71	19.80	เมีย
		NP169	3A19276	-	79	41.8	23.1	29.8	68	22.40	เมีย
		NP170	3A09725RE	AD	78	42.0	23.3	28.6	70	23.40	เมีย
		NP171	3A19277	1Y	81	44.1	26.1	29.9	70	24.00	ผู้
		NP172	3A14334RE	1Y	83	42.6	22.8	27.5	71	22.70	เมีย
		NP173	3A19279	1Y	80	42.5	23.0	27.7	70	23.70	เมีย
		NP174	3A19281	1Y	79	42.0	23.1	27.0	71	24.20	ผู้
		NP175	3A19283	1Y	78	41.2	22.3	26.7	68	18.90	เมีย
		NP176	3A19280	1Y	81	42.4	23.5	30.5	76	26.40	ผู้
		NP177	3A19282	1Y	87	42.9	24.5	27.8	78	23.00	ผู้
แหลมตาแสง	6/1/2560	NP178	3A19254RE	1Y	83	45.7	24.3	29.5	72.0	24.8	ผู้
		NP179	3A18589RE	1Y	85	45.3	24.2	29.3	69.0	24.7	ผู้
		NP180	3A19385	1Y	77	42.6	23.0	27.0	70.0	21.0	เมีย
		NP181	3A19388	2Y	86	43.2	23.8	29.2	77.0	23.3	ผู้
		NP182	3A19390	2Y	83	43.2	23.8	29.4	74.0	24.0	ผู้

ภาคผนวก ก (ต่อ)

ตารางภาคผนวกที่ ก (ต่อ)

สถานที่	วันที่	รหัสที่ใช้ในการวิเคราะห์	รหัสห่วงขา	อายุ	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา						ผลการวิเคราะห์
					ความยาว (มิลลิเมตร)					น้ำหนัก (กรัม)	
					ปีก	หัวปาก	ปาก	หน้าแข้ง	หาง		
แหลมตาเส็ง	6/1/2560	NP183	3A19387	2Y	80	42.1	20.0	27.8	72.0	20.3	เมีย
		NP184	3A19395	2Y	80	42.3	23.2	27.7	68.0	22.4	เมีย
		NP185	3A19384	1Y	78	42.8	24.0	26.1	70.0	20.8	เมีย
		NP186	3A19245RE	1Y	85	45.3	24.2	29.3	69.0	24.7	ผู้
		NP187	3A19391	2Y	81	42.7	22.6	26.8	ผลัดขน	22.7	ไม่สามารถระบุได้
		NP188	3A19393	1Y	84	44.5	24.5	27.1	74.0	26.0	ผู้
		NP189	3A19386	1Y	80	41.6	22.8	28.1	70.0	20.7	เมีย
แหลมตาเส็ง	6/1/2560	NP190	3A19392	2Y	84	44.6	24.6	29.4	77.0	25.3	ผู้
		NP191	3A19394	1Y	80	44.0	23.2	27.7	68.0	22.4	ผู้
		NP192	3A19397	1Y	76	41.3	21.2	27.4	68.0	22.4	เมีย
		NP193	3A19396	2Y	85	45.2	24.8	29.5	82.0	29.0	ผู้
เกาะตาเรือง	7/1/2560	NP194	3A19403	1Y	85	43.4	23.3	21.2	47.0	24.6	ผู้
		NP195	3A19404	1Y	79	41.0	21.3	21.2	51.0	19.9	เมีย
		NP196	3A19405	2Y	82	42.3	23.4	26.0	71.0	21.0	เมีย
		NP197	3A18232RE	2Y	83	42.1	23.2	26.8	69.0	20.4	เมีย

ภาคผนวก ก (ต่อ)

ตารางภาคผนวกที่ ก (ต่อ)

สถานที่	วันที่	รหัสที่ใช้ในการวิเคราะห์	รหัสห่วงขา	อายุ	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา						ผลการวิเคราะห์
					ความยาว (มิลลิเมตร)					น้ำหนัก (กรัม)	
					ปีก	หัวปาก	ปาก	หน้าแข้ง	หาง		
เกาะตาเรือง	7/1/2560	NP198	3A19406	1Y	82	42.3	23.4	26.0	71.0	21.0	เมีย
		NP199	3A19408	1Y	79	43.3	21.8	27.4	66.0	21.1	เมีย
		NP200	3A19407	2Y	80	40.1	22.2	24.7	71.0	19.5	เมีย
		NP201	3A19409	2Y	87	43.2	22.4	27.6	75.0	22.9	ผู้
		NP202	3A19410	1Y	82	45.1	23.0	28.7	74.0	25.7	ผู้
ทางเข้าประมงเชิงพาณิชย์	8/1/2560	NP203	3A19412	1Y	80	42.8	23.6	30.0	72	22.6	ผู้
		NP204	3A19415	1Y	81	43.6	23.4	28.5	74	24.5	ผู้
		NP205	3A19413	2Y	79	41.3	23.3	27.5	70	20.1	เมีย
		NP206	3A19416	1Y	86	42.9	20.7	29.9	75	25.1	ผู้
		NP207	3A16244RE	2Y	83	43.3	21.5	27.7	71	22.4	เมีย
		NP208	3A19414	2Y	83	41.3	21.5	28.0	70	21.1	เมีย
		NP209	3A29676RE	-	84	42.8	23.0	27.6	72	22.0	เมีย
		NP210	3A19417	AD	81	43.2	22.3	26.6	76	24.4	ผู้
		NP211	3A19419	1Y	86	45.0	23.1	29.4	76	25.7	ผู้

ภาคผนวก ก (ต่อ)

ตารางภาคผนวกที่ ก (ต่อ)

สถานที่	วันที่	รหัสที่ใช้ในการวิเคราะห์	รหัสห่วงขา	อายุ	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา						ผลการวิเคราะห์
					ความยาว (มิลลิเมตร)					น้ำหนัก (กรัม)	
					ปีก	หัวปาก	ปาก	หน้าแข้ง	หาง		
ทางเข้าประมงเชิงพาณิชย์	8/1/2560	NP212	3A29807RE	2Y	81	42.2	24.0	26.5	71	22.9	เมีย
		NP213	3A19425	2Y	79	43.1	23.3	27.3	67	21.4	ไม่สามารถระบุได้
		NP214	3A19424	2Y	80	41.5	21.0	27.0	69	21.1	เมีย
		NP215	3A19428	1Y	83	44.0	23.5	19.0	73	24.7	ผู้
		NP216	3A19429	2Y	83	43.9	24.4	27.8	70	22.9	เมีย
		NP217	3A19431	1Y	83	44.1	22.6	29.3	75	24.7	ผู้
		NP218	3A19432	2Y	77	42.4	22.6	27.9	69	21.9	เมีย

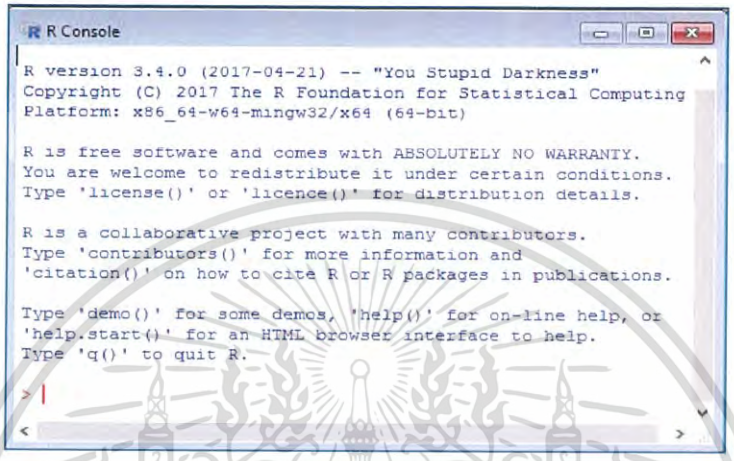
(ที่มา : เขตห้ามล่าสัตว์ป่าบึงบอระเพ็ด, 2559)

*NP147 NP151 ข้อมูลไม่ชัดเจน และ NP187 NP213 ไม่สามารถระบุเพศได้

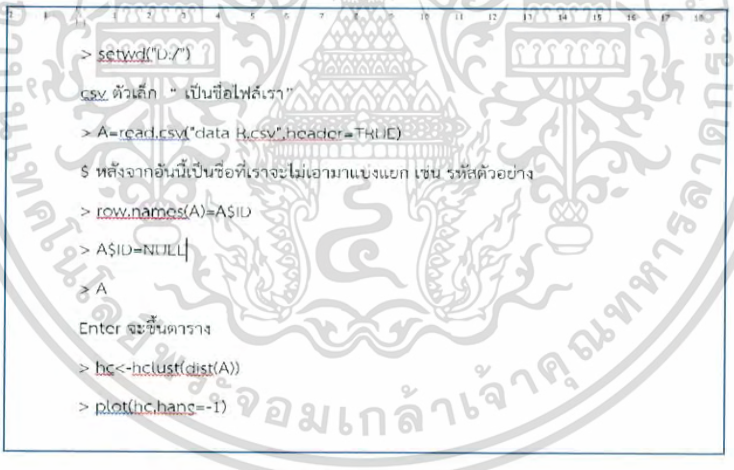
ภาคผนวก ข
วิธีการใช้โปรแกรม

วิธีการใช้งานโปรแกรม R x64 3.4.0 เพื่อวิเคราะห์กลุ่มของข้อมูลเบื้องต้น

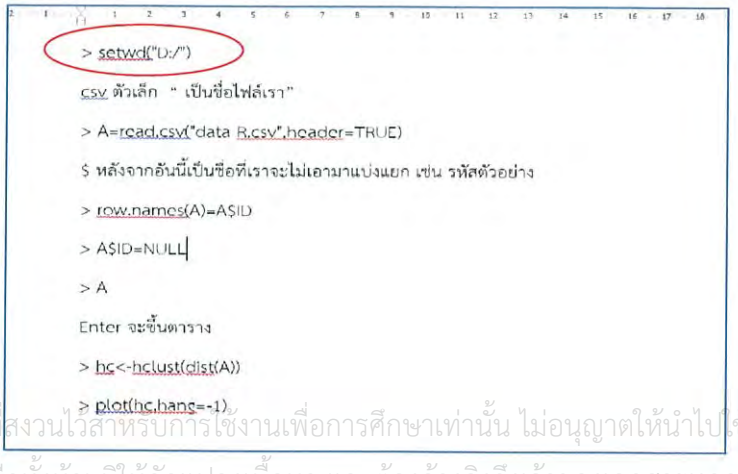
1.เปิดโปรแกรม R x64 3.4.0



2. เปิดไฟล์คำสั่งโปรแกรม R x64 3.4.0



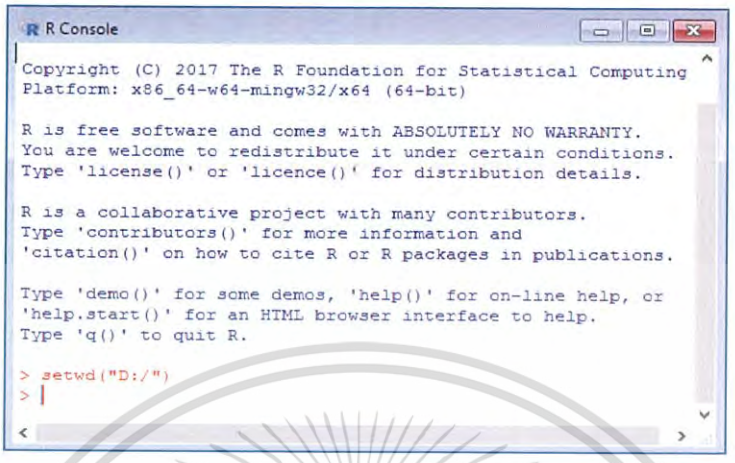
3. คัดลอกคำสั่ง setwd("D:/") ในไฟล์คำสั่งโปรแกรม R x64 3.4.0



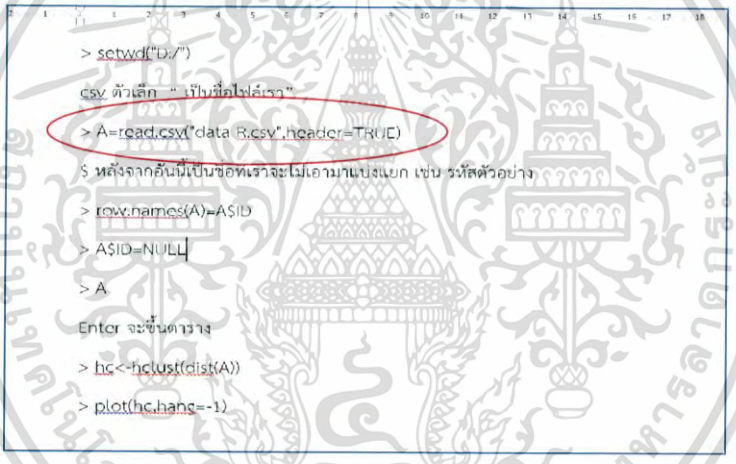
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข (ต่อ)

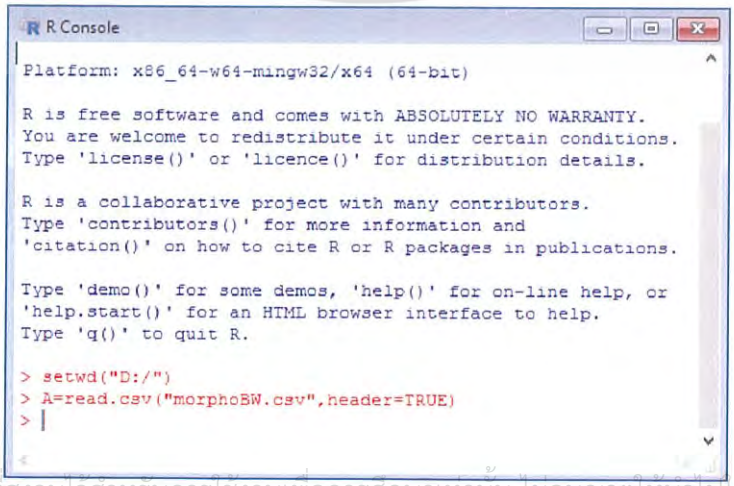
4. วางในโปรแกรม R x64 3.4.0 กด ENTER



5. คัดลอกคำสั่ง A=read.csv("data R.csv",header=TRUE) ในไฟล์คำสั่งโปรแกรม R x64 3.4.0



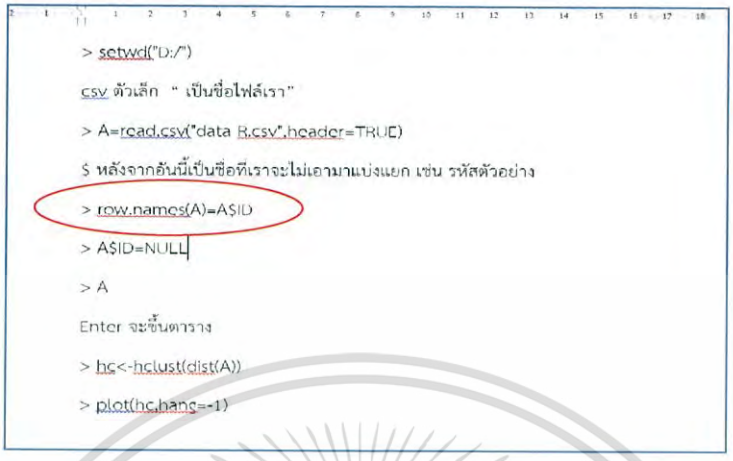
6. วางในโปรแกรม R x64 3.4.0 โดยในคำสั่ง A=read.csv("data R.csv",header=TRUE) ต้องทำการเปลี่ยนคำสั่งเป็น A=read.csv("ชื่อไฟล์ที่ต้องการวิเคราะห์.csv",header=TRUE) กด ENTER (ไฟล์ที่ต้องการวิเคราะห์ต้องบันทึกนามสกุลเป็น CSV (MS-DOS))



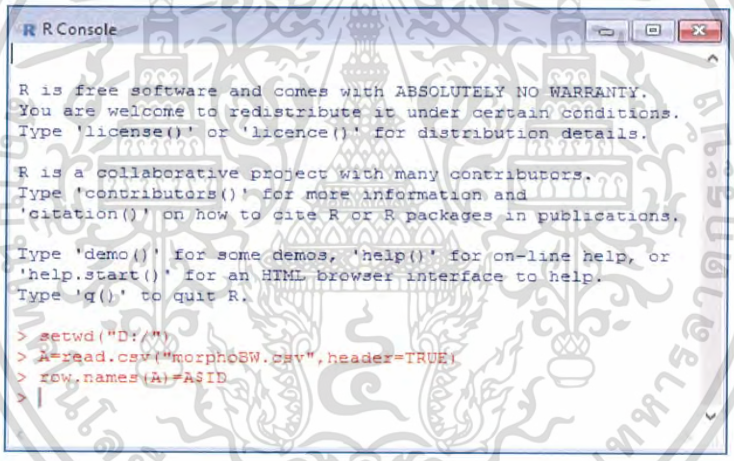
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข (ต่อ)

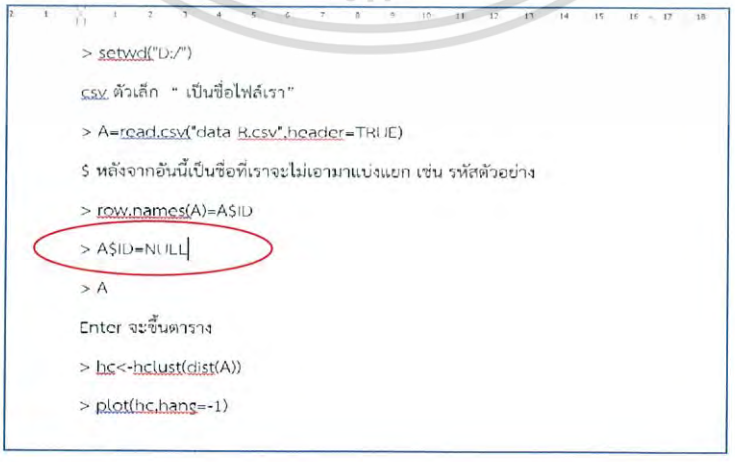
7. คัดลอกคำสั่ง row.names(A)=A$ID ในไฟล์คำสั่งโปรแกรม R x64 3.4.0



8.วางในโปรแกรม R x64 3.4.0 กด ENTER



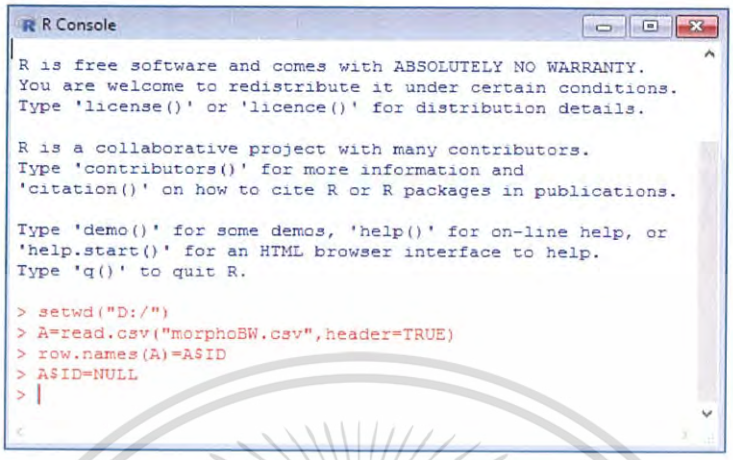
9. คัดลอกคำสั่ง A$ID=NULL ในไฟล์คำสั่งโปรแกรม R x64 3.4.0



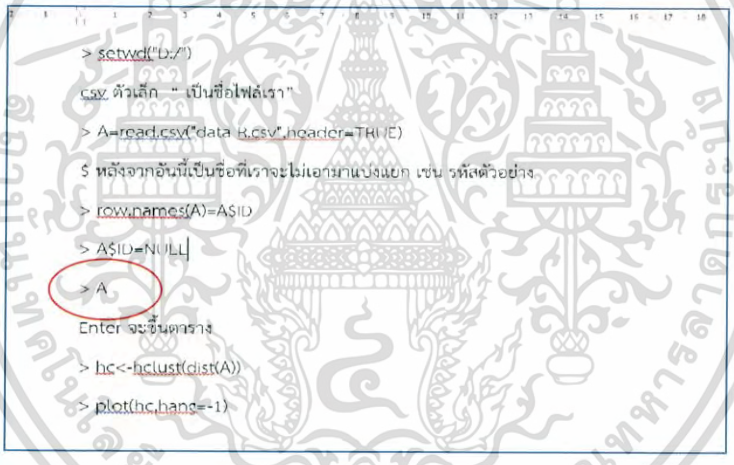
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข (ต่อ)

10. วางในโปรแกรม R x64 3.4.0 กด ENTER



11. คัดลอกคำสั่ง A ในไฟล์คำสั่งโปรแกรม R x64 3.4.0

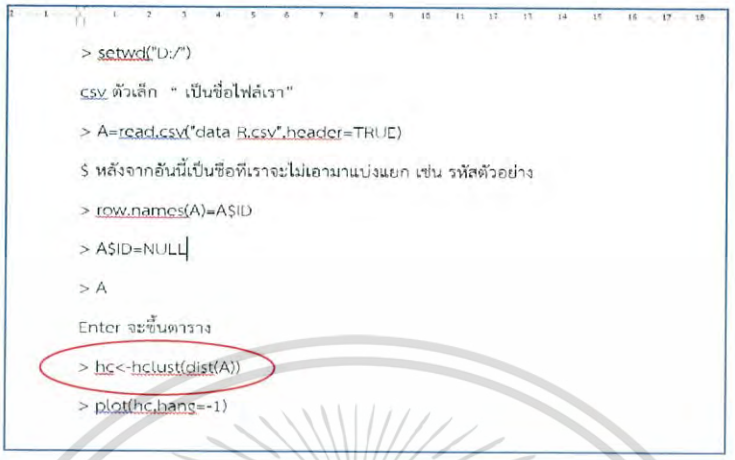


12. วางในโปรแกรม R x64 3.4.0 กด ENTER จะแสดงหน้าต่างข้อมูลตัวอย่างดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

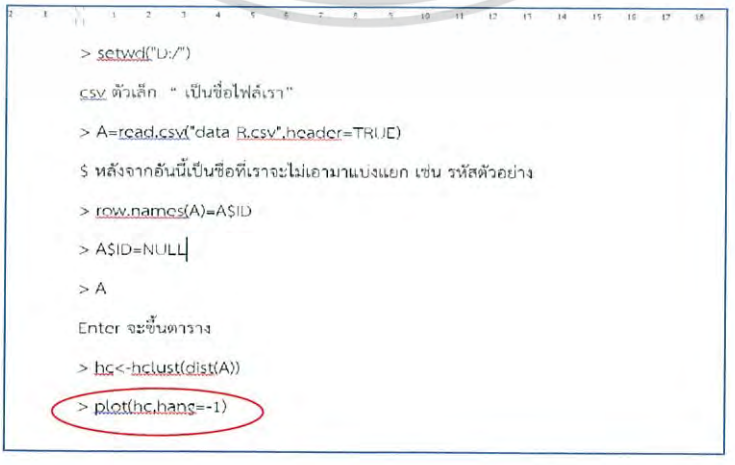
ภาคผนวก ข (ต่อ)

13. คัดลอกคำสั่ง hc<-hclust(dist(A)) ในไฟล์คำสั่งโปรแกรม R x64 3.4.0



14. วางในโปรแกรม R x64 3.4.0 กด ENTER

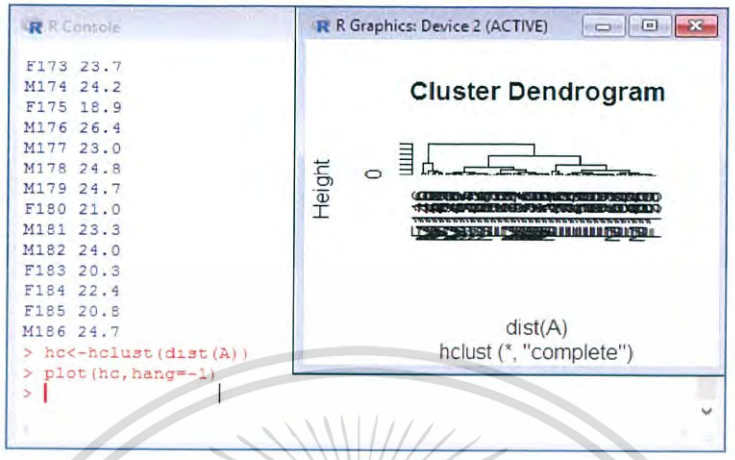
15. คัดลอกคำสั่ง plot(hc,hang=-1)ในไฟล์คำสั่งโปรแกรม R x64 3.4.0

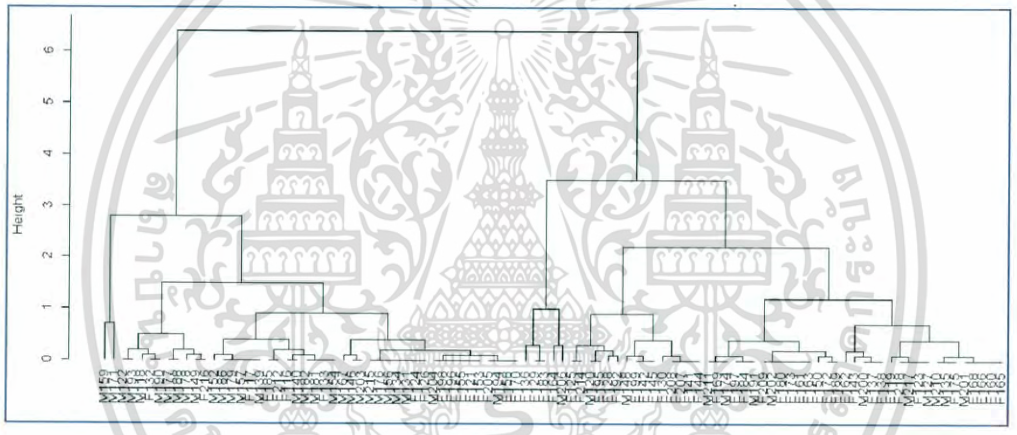


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข (ต่อ)

16. วางในโปรแกรม R x64 3.4.0 กด ENTER ได้แผนภาพ Cluster Dendrogram ดังนี้



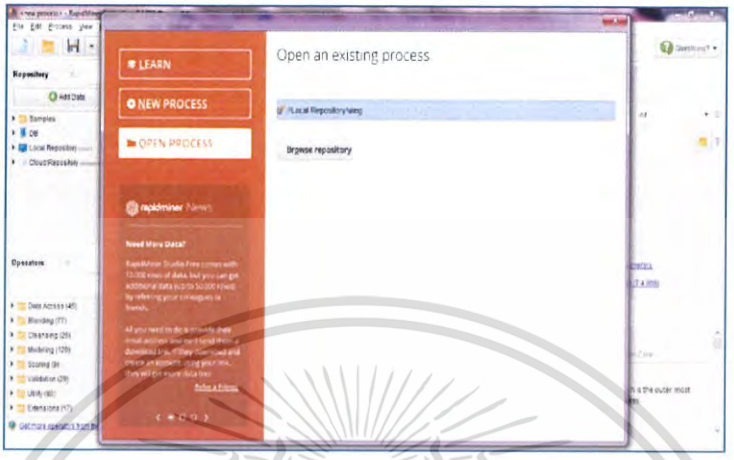


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

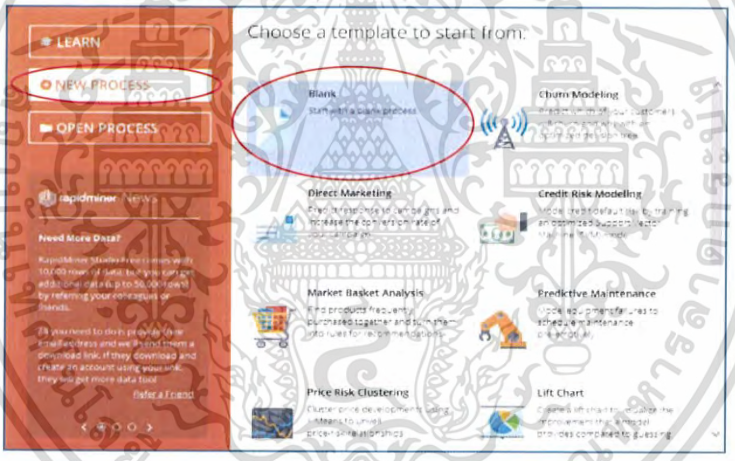
ภาคผนวก ข (ต่อ)

วิธีใช้งานโปรแกรม RapidMiner Studio

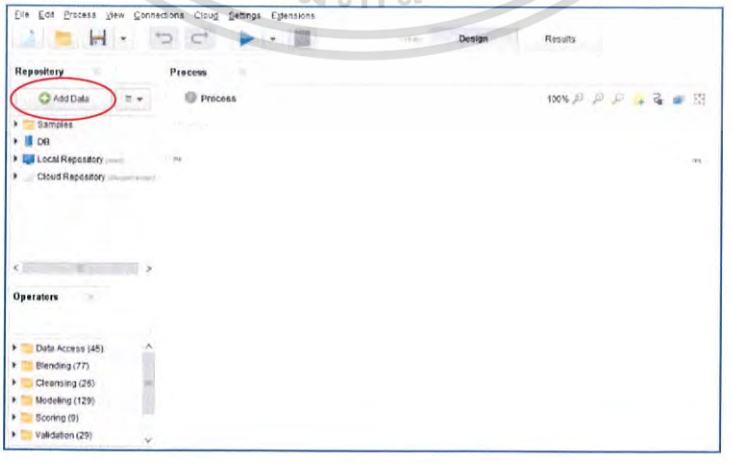
1. เปิดโปรแกรม RapidMiner Studio



2. เลือก NEW PROCESS แล้วเลือก Blank



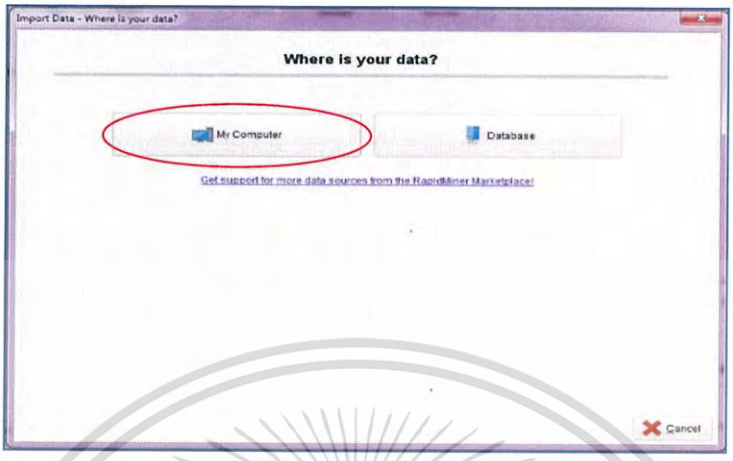
3. เลือก Add data



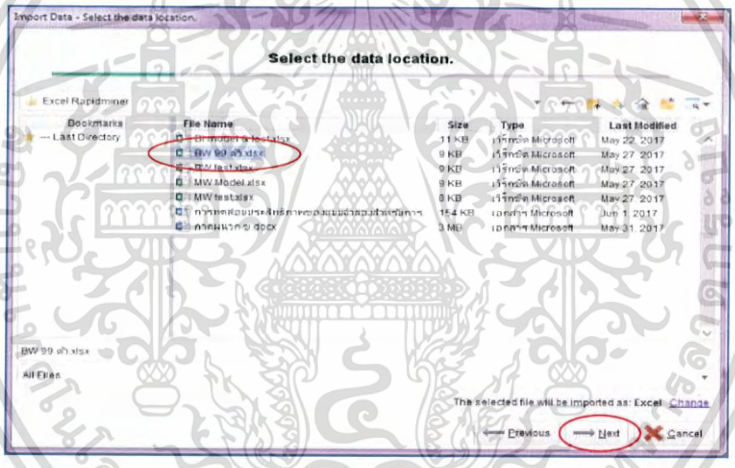
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข (ต่อ)

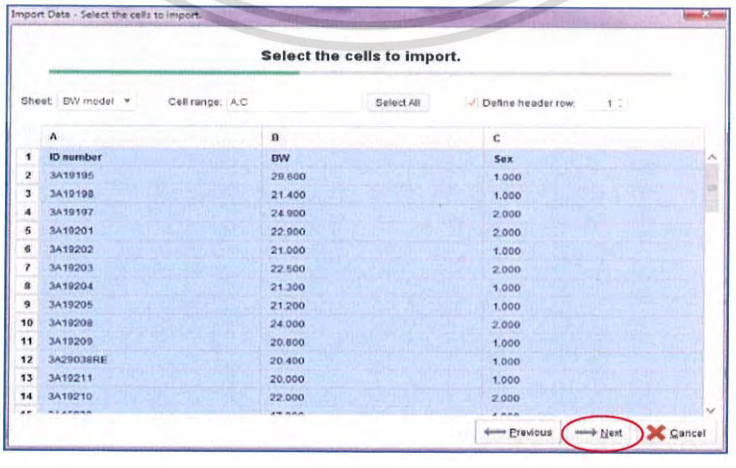
4. เลือก My Computer



5. เลือกไฟล์ข้อมูล แล้วเลือก Next



6. เลือก Next

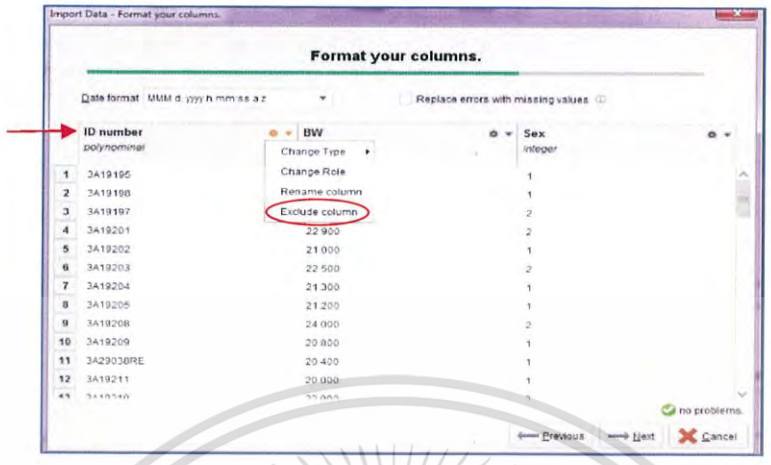


	A	B	C
1	ID number	BW	Sex
2	3A19195	29.600	1.000
3	3A19198	21.400	1.000
4	3A19197	24.900	2.000
5	3A19201	22.900	2.000
6	3A19202	21.000	1.000
7	3A19203	22.500	2.000
8	3A19204	21.300	1.000
9	3A19205	21.200	1.000
10	3A19208	24.000	2.000
11	3A19209	20.600	1.000
12	3A29038RE	20.400	1.000
13	3A19211	20.000	1.000
14	3A19210	22.000	2.000

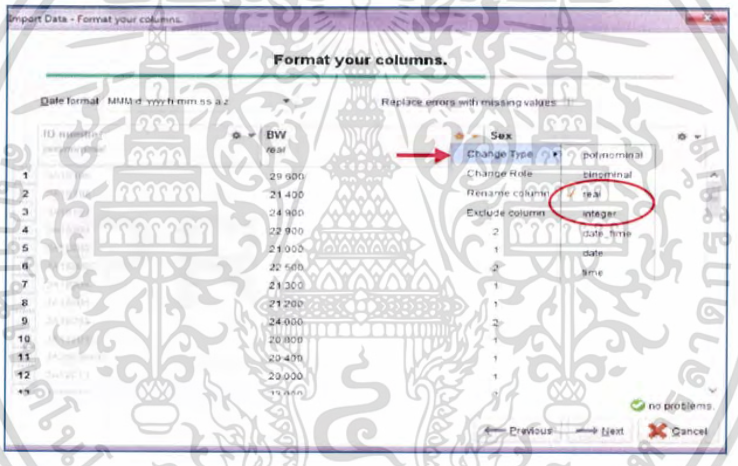
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข (ต่อ)

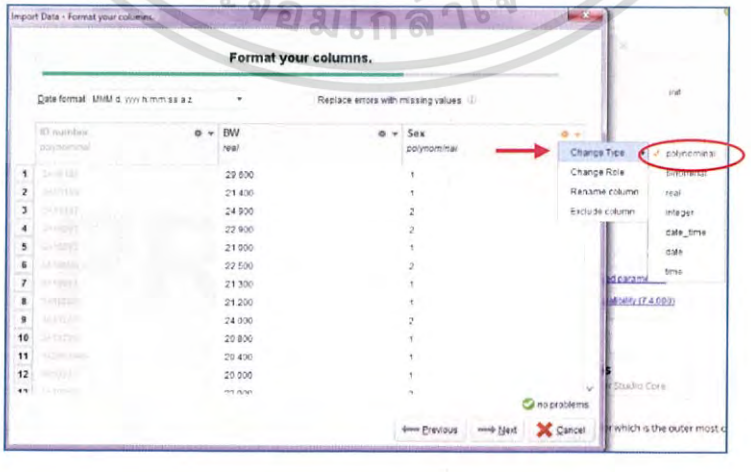
7. ไปที่ข้อมูลช่องแรก (ID number) แล้วเลือก Excude column



8. ไปที่ข้อมูลช่องที่สอง (MW) แล้วเลือก Change Type เลือก integer



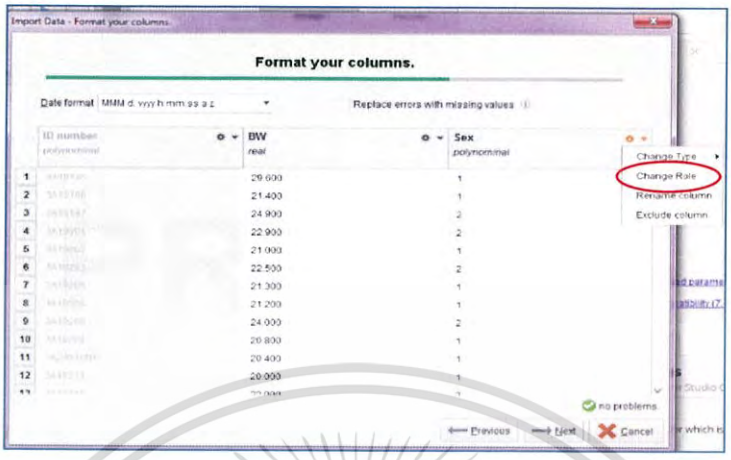
9. ไปที่ข้อมูลช่องที่ 3 (Sex) แล้วเลือก Change Type เลือก polynominal



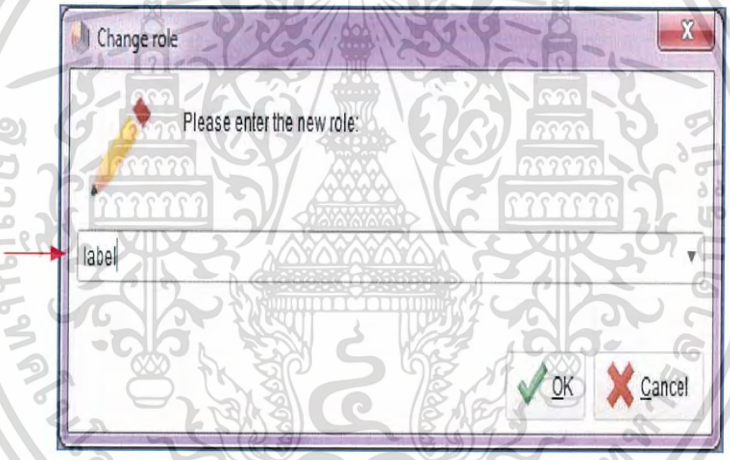
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข (ต่อ)

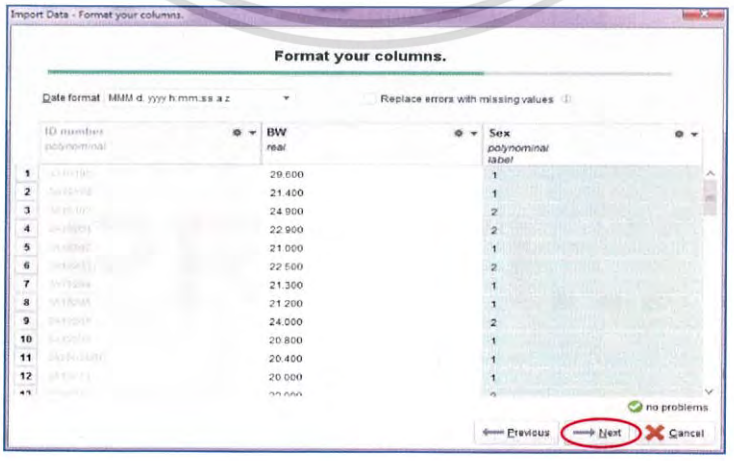
10. ไปที่ข้อมูลช่องที่ 3 (Sex) แล้วเลือก Change Role



11. จะมีหน้าต่างปรากฏขึ้นมาให้พิมพ์คำว่า Label ลงในช่องว่าง เลือก OK



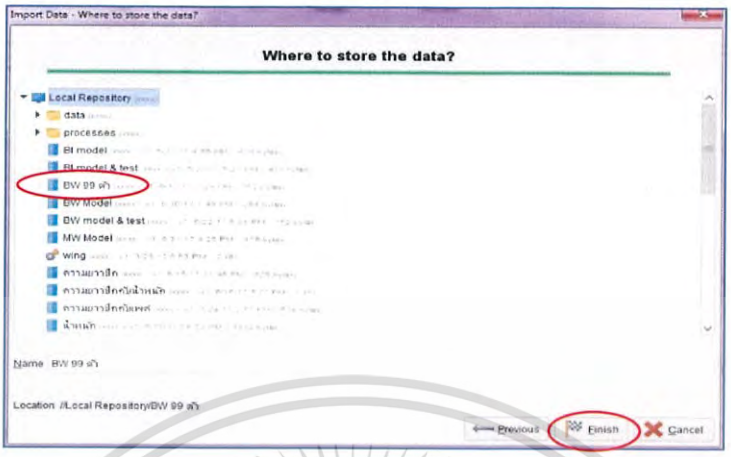
12. เลือก Next



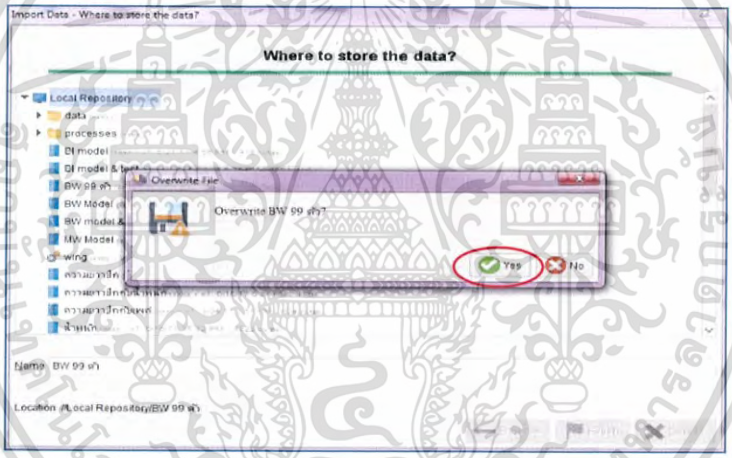
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข (ต่อ)

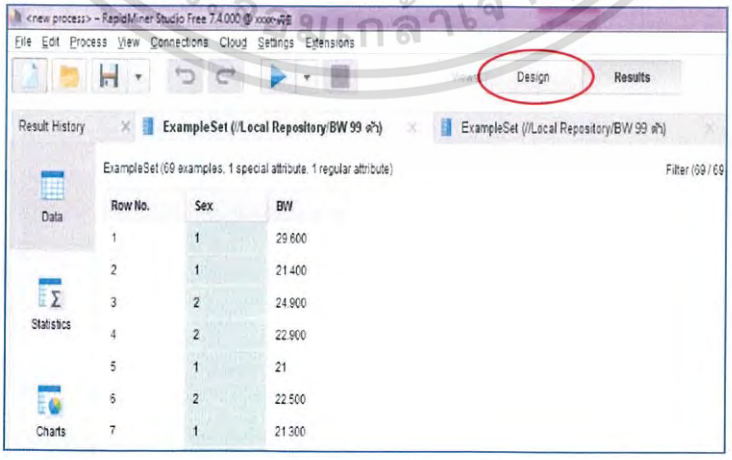
13. จะปรากฏหน้าต่าง Import Data เลือกไฟล์ข้อมูลที่ต้องการแล้วเลือก Finish



14. เลือก Yes



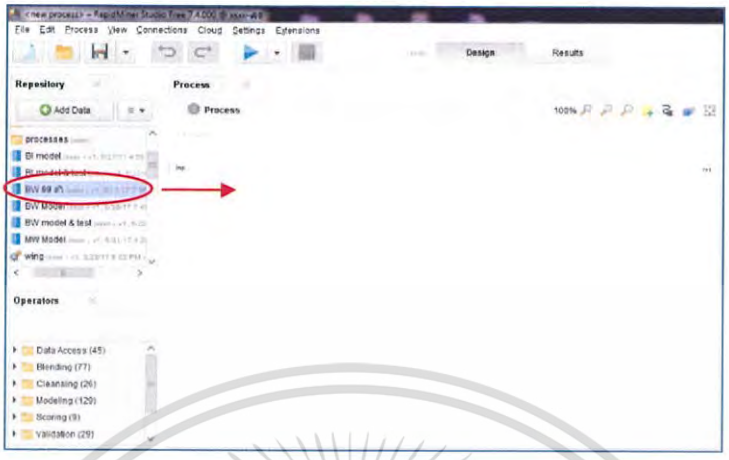
15. เลือก Design



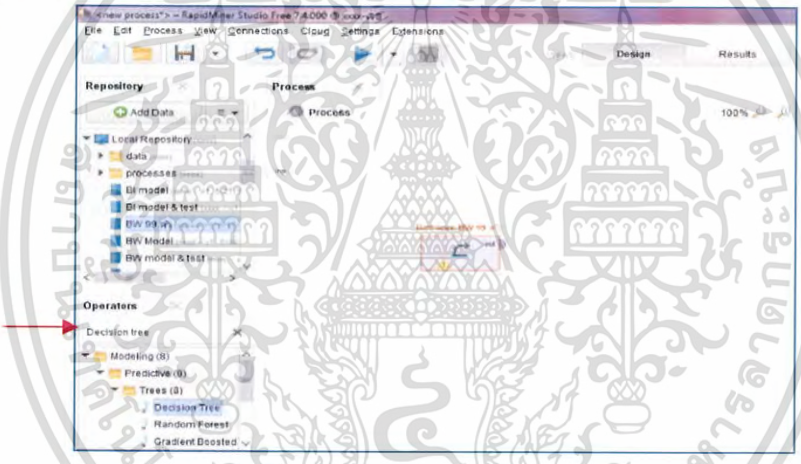
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข (ต่อ)

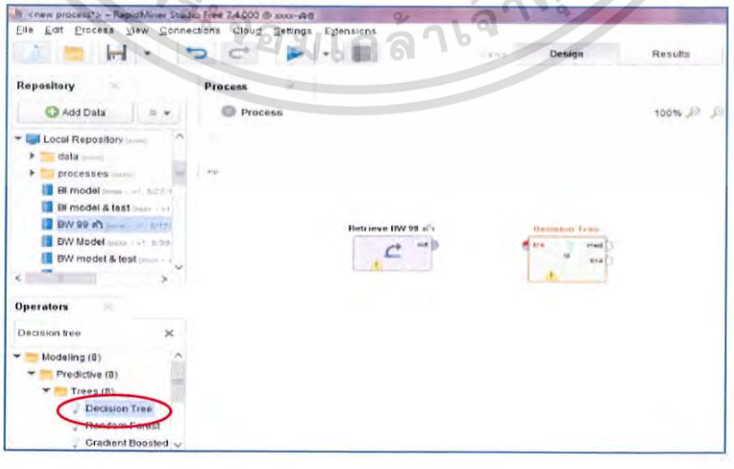
16. ลากไฟล์ข้อมูลทางด้านซ้ายมือมาวางในพื้นที่ Process



17. ไปที่ Operation พิมพ์ Decision Tree ลงในช่องว่าง



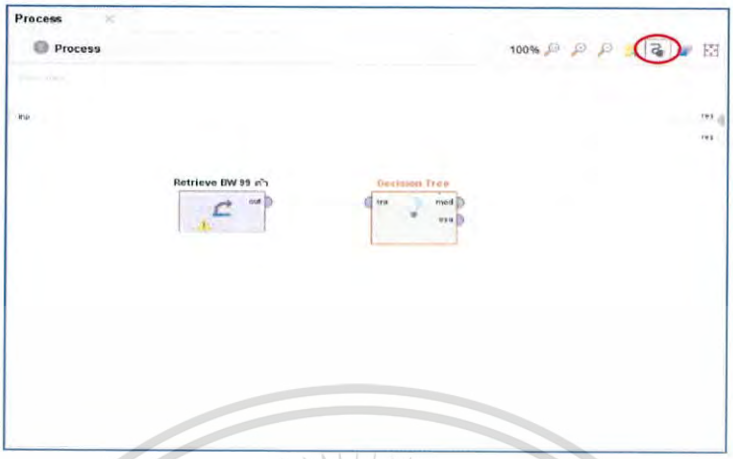
18. ลาก Decision Tree มาวางในพื้นที่ Process



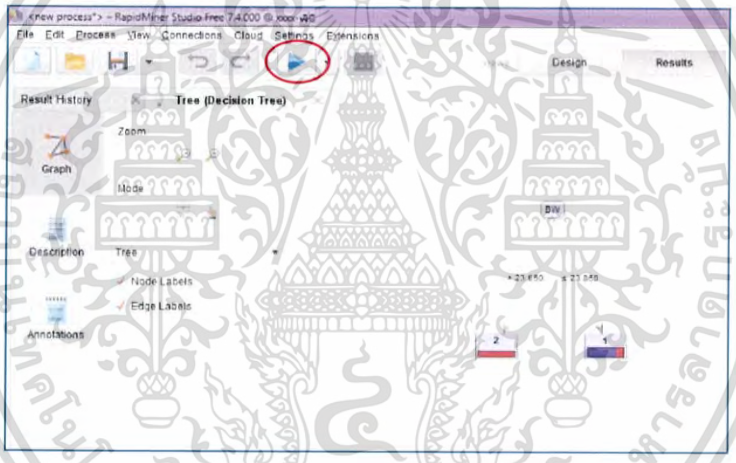
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข (ต่อ)

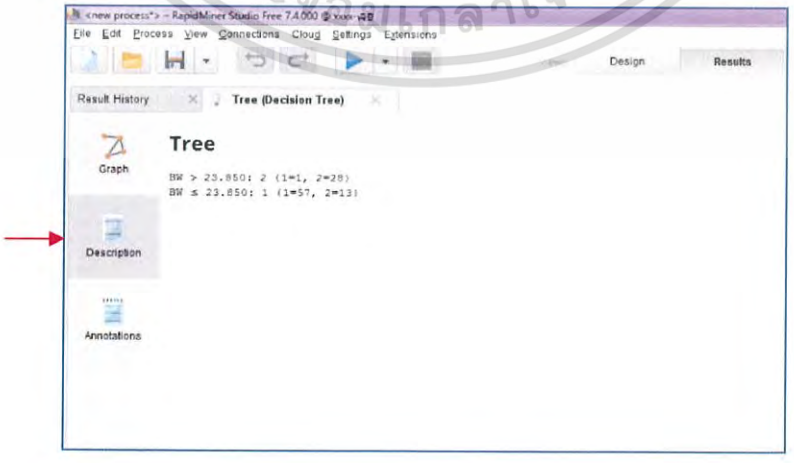
19. ลากเส้นเชื่อมกันโดยกด



20. กด Run หน้าจอจะปรากฏ Decision Tree ขึ้นมา



21. เลือก Description เพื่อดูคำอธิบาย

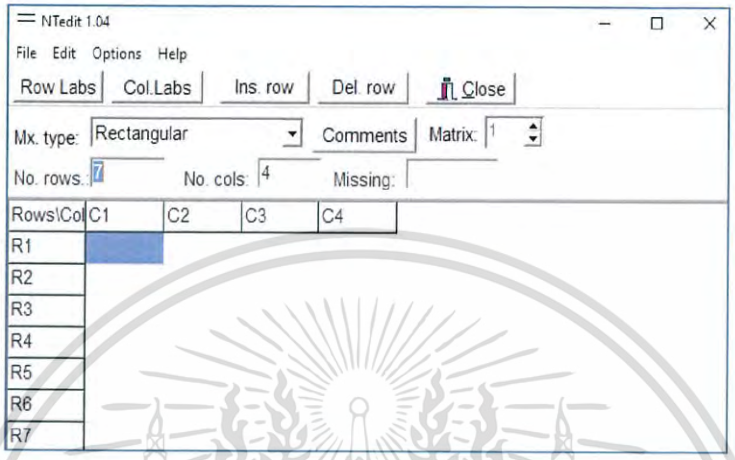


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

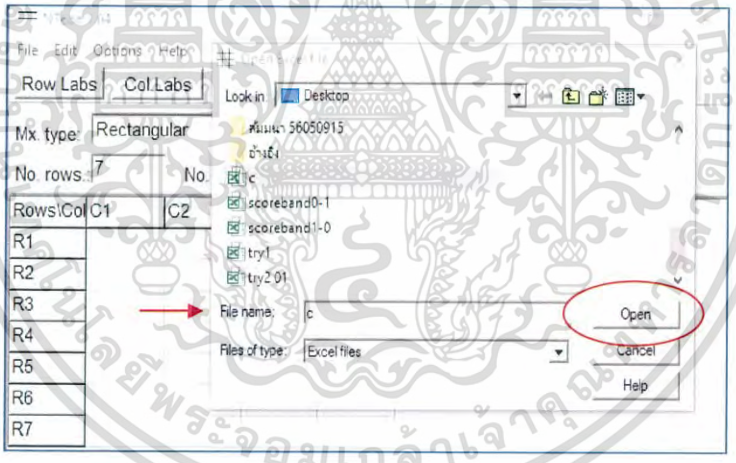
ภาคผนวก ข (ต่อ)

การวิเคราะห์ผลความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยการสร้าง Tree แสดงความสัมพันธุ์ของตัวอย่างนกพงใหญ่พันธุ์ 29 ตัวอย่าง ของทั้ง 6 ไพรเมอร์ ด้วยโปรแกรม NTSYSpc 2.1X

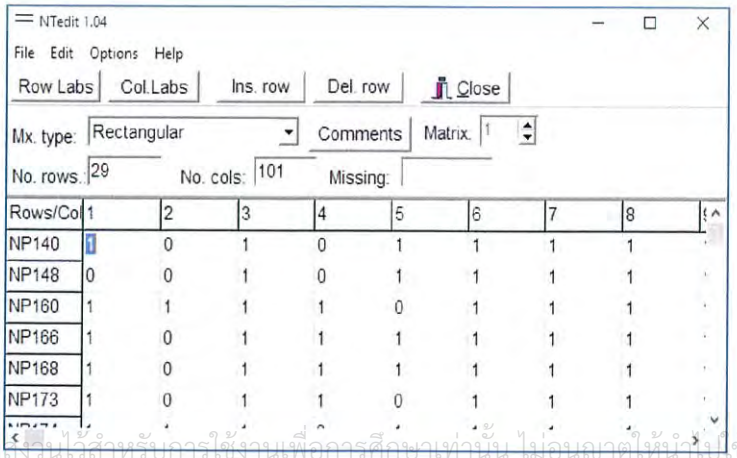
1.เปิดโปรแกรม NTedit 1.04



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



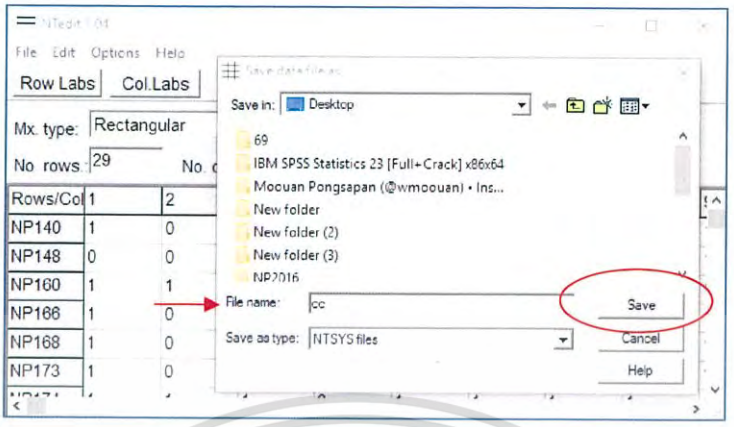
3. โปรแกรมเปิดไฟล์งานที่สร้างจาก Microsolf Exel



Rows/Col	1	2	3	4	5	6	7	8
NP140	1	0	1	0	1	1	1	1
NP148	0	0	1	0	1	1	1	1
NP160	1	1	1	1	0	1	1	1
NP166	1	0	1	1	1	1	1	1
NP168	1	0	1	1	1	1	1	1
NP173	1	0	1	1	0	1	1	1

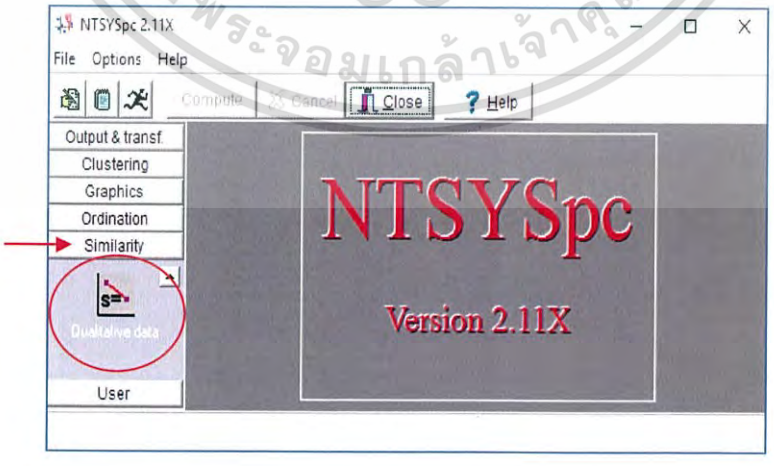
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. กด File เลือก Save file as ใส่ชื่อไฟล์ที่ต้องการยันทึกในช่องที่ลูกศรชี้ บันทึกไฟล์เป็น .NTS แล้วกด Save



5. เปิดโปรแกรม NTSYSpc 2.1X

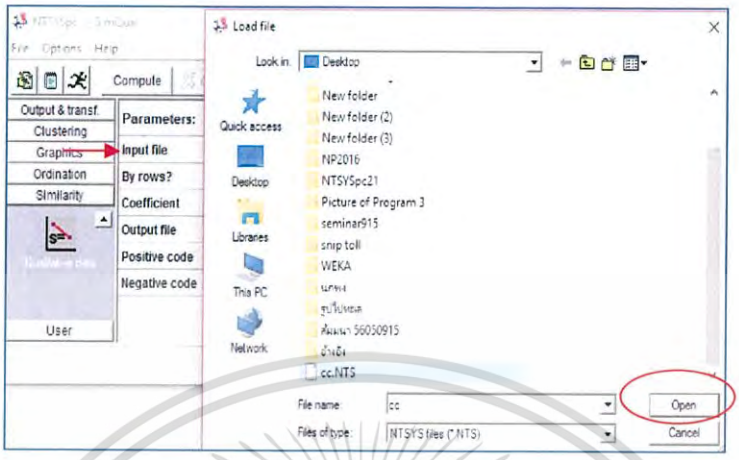
6. กด Similarity เลือก Qualitative data



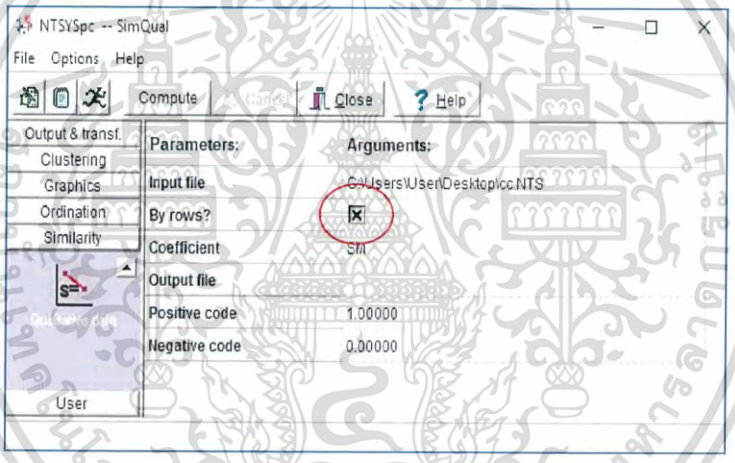
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข (ต่อ)

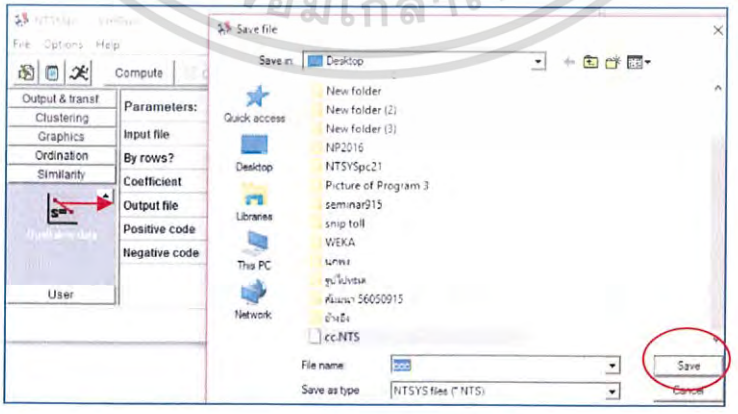
7. กด input file เลือกไฟล์ .NTS ที่พร้อมใช้งาน กด open



8. เลือก By row? คลิกให้ขึ้นเครื่องหมาย X



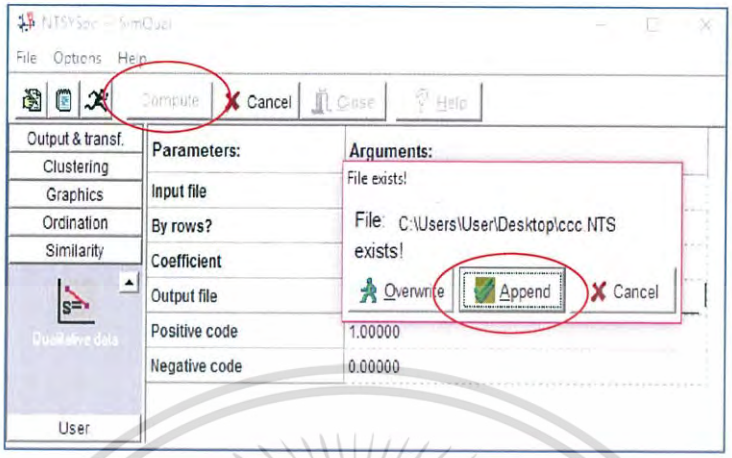
9. คลิก Output file ตั้งชื่อใหม่ กด Save



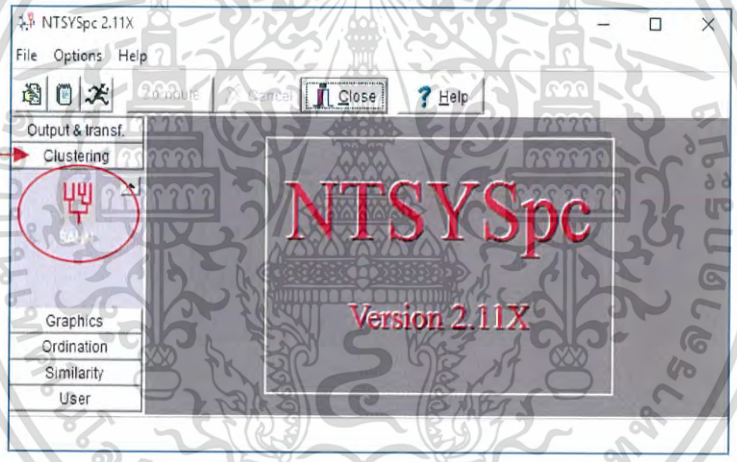
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข (ต่อ)

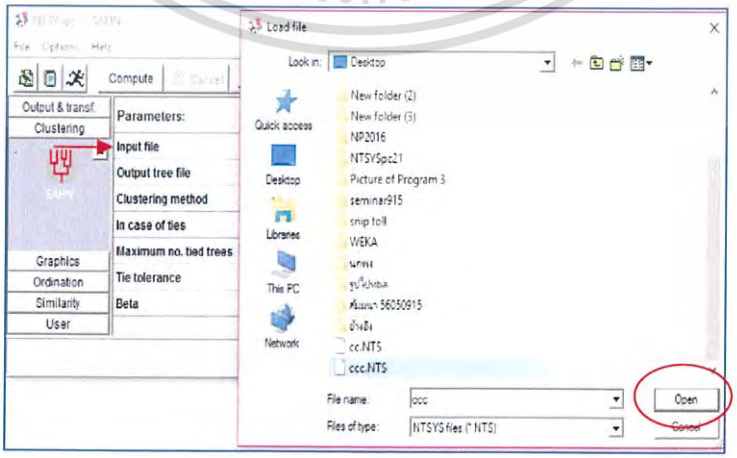
10. กด compute แล้วเลือก Append



11. กด Clustering เลือก SAHN



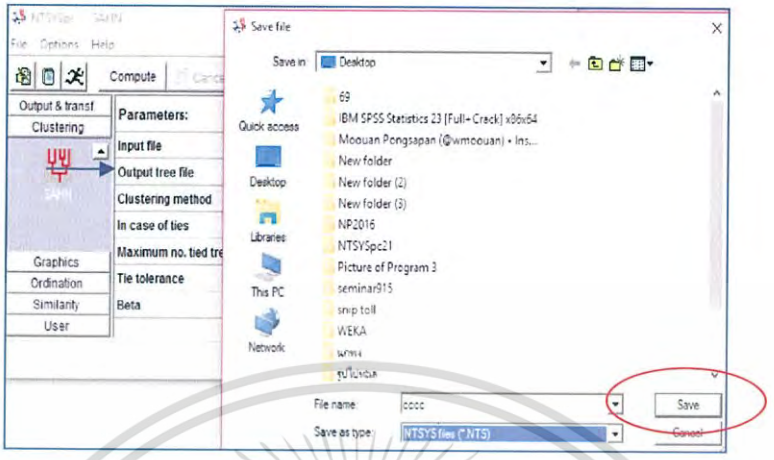
12. กด input file เลือกไฟล์ .NTS ที่ผ่านขั้นตอน Qualitative data กด open



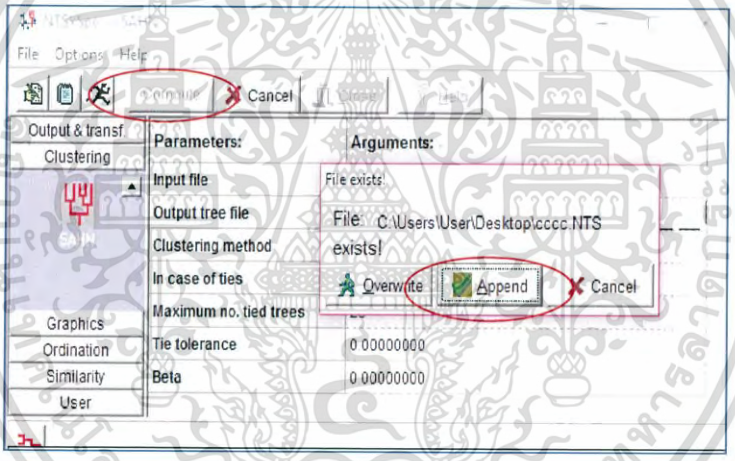
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข (ต่อ)

13. กด out put file ตั้งชื่อไฟล์ใหม่ .NTS กด Save



16. กด Compute จากนั้นกด Append

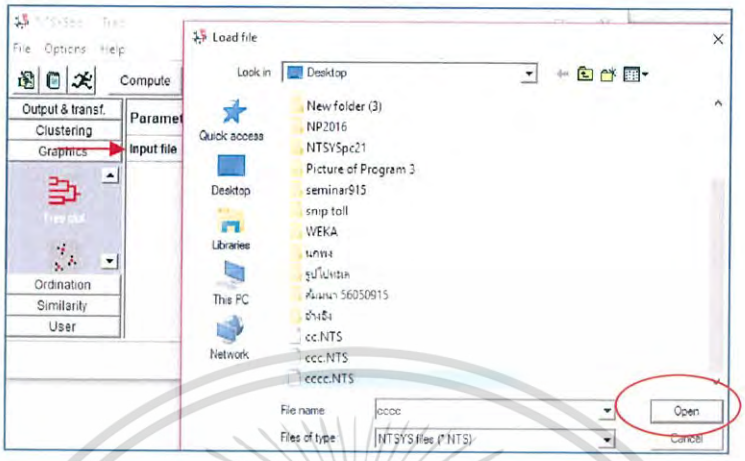


17. กด Graphic เลือก tree plot

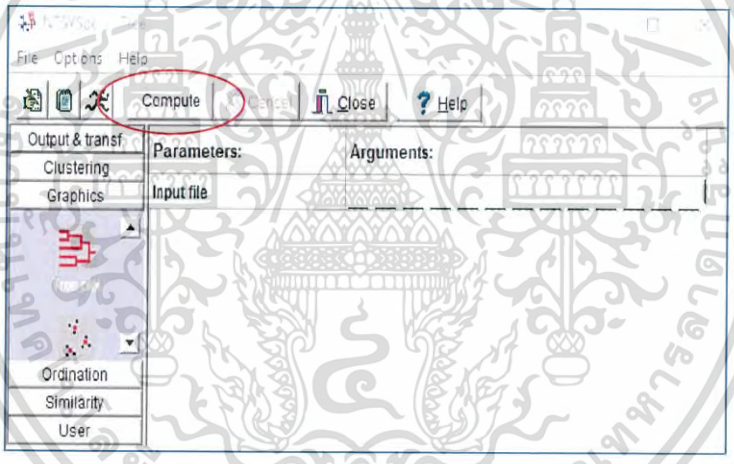
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข (ต่อ)

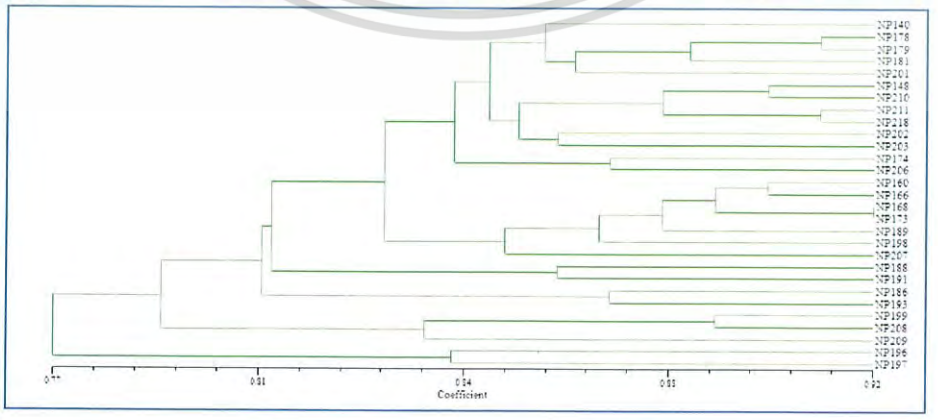
18. กด input file เลือกไฟล์ .NTS ที่ผ่านขั้นตอน SAHN แล้วกด open



19. กด Compute



20. โปรแกรมจะแสดงแผนภาพแสดงความสัมพันธ์ของตัวอย่างออกมาเป็น Tree



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

ตารางภาคผนวกที่ ค-1 แสดงค่า genetic similarity แบบ simple matching ด้วยโปรแกรม NTsyspc version 2.11X ของนกพงใหญ่พันธุ์ญี่ปุ่นจำนวน 29 ตัวอย่าง ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค iPBS จากไพรเมอร์จำนวน 6 ไพรเมอร์

	NP140	NP148	NP160	NP166	NP168	NP173	NP174	NP178	NP179	NP181	NP186	NP188	NP189	NP191	NP193	NP196	NP197	NP198	NP199	NP201	NP202	NP203	NP206	NP207	NP208	NP209	NP210	NP211	NP218
NP140	1.00																												
NP148	0.84	1.00																											
NP160	0.80	0.78	1.00																										
NP166	0.80	0.84	0.90	1.00																									
NP168	0.84	0.84	0.88	0.90	1.00																								
NP173	0.82	0.80	0.88	0.90	0.92	1.00																							
NP174	0.84	0.86	0.82	0.82	0.84	0.84	1.00																						
NP178	0.87	0.85	0.87	0.87	0.85	0.85	0.85	1.00																					
NP179	0.86	0.82	0.82	0.80	0.86	0.82	0.82	0.91	1.00																				
NP181	0.85	0.81	0.87	0.83	0.87	0.85	0.87	0.90	0.87	1.00																			
NP186	0.79	0.83	0.75	0.77	0.79	0.75	0.73	0.80	0.85	0.80	1.00																		
NP188	0.83	0.83	0.81	0.83	0.81	0.83	0.85	0.86	0.81	0.80	0.78	1.00																	
NP189	0.79	0.77	0.89	0.89	0.85	0.89	0.81	0.84	0.79	0.82	0.74	0.84	1.00																
NP191	0.81	0.83	0.75	0.79	0.79	0.79	0.79	0.80	0.81	0.78	0.84	0.86	0.80	1.00															
NP193	0.80	0.84	0.74	0.80	0.82	0.76	0.76	0.83	0.90	0.79	0.87	0.77	0.69	0.81	1.00														
NP196	0.73	0.77	0.79	0.83	0.85	0.83	0.73	0.76	0.77	0.76	0.80	0.74	0.82	0.76	0.79	1.00													
NP197	0.69	0.77	0.79	0.87	0.83	0.81	0.73	0.78	0.73	0.74	0.70	0.76	0.80	0.74	0.75	0.84	1.00												
NP198	0.83	0.81	0.85	0.87	0.87	0.89	0.79	0.86	0.85	0.80	0.80	0.80	0.86	0.74	0.79	0.82	0.76	1.00											
NP199	0.84	0.80	0.78	0.78	0.82	0.84	0.84	0.81	0.82	0.77	0.77	0.83	0.83	0.79	0.78	0.77	0.71	0.83	1.00										
NP201	0.85	0.85	0.85	0.83	0.87	0.89	0.85	0.86	0.85	0.88	0.84	0.82	0.84	0.80	0.81	0.76	0.72	0.86	0.85	1.00									
NP202	0.82	0.84	0.82	0.84	0.82	0.82	0.80	0.87	0.84	0.81	0.81	0.77	0.79	0.81	0.86	0.73	0.73	0.83	0.78	0.85	1.00								
NP203	0.82	0.84	0.80	0.80	0.84	0.78	0.82	0.87	0.86	0.85	0.83	0.79	0.79	0.75	0.84	0.75	0.75	0.77	0.78	0.85	0.86	1.00							
NP206	0.81	0.85	0.81	0.83	0.85	0.87	0.87	0.82	0.81	0.82	0.80	0.80	0.78	0.80	0.83	0.80	0.74	0.82	0.83	0.86	0.87	0.83	1.00						
NP207	0.78	0.82	0.86	0.88	0.88	0.86	0.82	0.83	0.86	0.81	0.81	0.79	0.79	0.79	0.84	0.79	0.79	0.83	0.80	0.83	0.84	0.80	0.83	1.00					
NP208	0.81	0.79	0.79	0.81	0.81	0.83	0.81	0.80	0.79	0.76	0.76	0.82	0.78	0.78	0.75	0.72	0.72	0.82	0.89	0.82	0.77	0.75	0.80	0.83	1.00				
NP209	0.74	0.76	0.74	0.80	0.78	0.78	0.74	0.73	0.72	0.69	0.73	0.77	0.75	0.79	0.78	0.73	0.77	0.75	0.82	0.75	0.78	0.70	0.77	0.78	0.85	1.00			
NP210	0.88	0.90	0.84	0.84	0.88	0.84	0.86	0.85	0.86	0.85	0.81	0.85	0.79	0.87	0.84	0.77	0.73	0.79	0.82	0.85	0.84	0.84	0.89	0.84	0.83	0.80	1.00		
NP211	0.82	0.86	0.82	0.84	0.86	0.84	0.84	0.87	0.90	0.87	0.85	0.81	0.79	0.83	0.88	0.75	0.73	0.79	0.78	0.87	0.90	0.88	0.85	0.86	0.75	0.76	0.90	1.00	
NP218	0.81	0.89	0.83	0.83	0.89	0.87	0.83	0.82	0.83	0.84	0.82	0.80	0.84	0.78	0.79	0.78	0.76	0.82	0.81	0.88	0.83	0.85	0.84	0.81	0.76	0.75	0.87	0.91	1.00

ภาคผนวก ง

1. การเตรียมสารละลาย

1.1 Stock 10X TBE Buffer ปริมาตร 1000 ml

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

นำสารที่ชั่งมาละลายน้ำกลั่นปริมาตร 1000 ml ปรับ pH ให้ได้ 8.0 จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อโดยใช้เครื่องความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เมื่อนำมาใช้งานต้องเจือจางให้ได้ความเข้มข้นเป็น 1X TBE Buffer โดยดูด 10X TBE Buffer ปริมาตร 50 ml ผสมกับน้ำกลั่น ปริมาตร 450 ml

1.2 Stock 10 nM TE Buffer ปริมาตร 100 ml

- เตรียม 0.1 M Tris-HCL โดยชั่งสาร Tris 121 g
- เตรียม 0.01 M EDTA

นำสารที่ชั่งมารวมกันแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 100 ml ปรับ pH ให้ได้ 8.0 จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อโดยใช้เครื่องความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เมื่อนำมาใช้งานต้องเจือจางให้ได้ความเข้มข้นเป็น 0.1 nM TE Buffer โดยดูด 10 nM TE Buffer ปริมาตร 40 µl ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 40 ml

2. การเตรียมสารในเทคนิค PCR

2.1 การเตรียมไพรเมอร์ความเข้มข้น 20 pmole/µl

- ดูด stock ไพรเมอร์ที่มีความเข้มข้น 100 pmole/µl ปริมาตร 4 µl ผสมกับ DI Water 16 µl

2.2 การเตรียม Deoxynucleotide Triphosphate (dNTPs)

- ดูด stock dATP, dGTP, dCTP, dTTP ที่มีความเข้มข้น 100 mM ปริมาตร 1.25 µl ผสมกับ DI Water 95 µl (ความเข้มข้นสุดท้าย 1.25 mM)

3. การเตรียมสารในวิธีอิเล็กโทรโฟริซิส

3.1 การเตรียมอะกาโรสเจล (W/V)

- หากต้องการเตรียมอะกาโรสเจลความเข้มข้น 1% ชั่งผงอะกาโรส 0.2 g ผสมกับ 1X TBE Buffer 20 ml (สำหรับเจลเล็ก)
- หากต้องการเตรียมอะกาโรสเจลความเข้มข้น 1% ชั่งผงอะกาโรส 0.4 g ผสมกับ 1X TBE Buffer 40 ml (สำหรับเจลใหญ่)
- หากต้องการเตรียมอะกาโรสเจลความเข้มข้น 2% ชั่งผงอะกาโรส 0.4 g ผสมกับ 1X TBE Buffer 20 ml (สำหรับเจลเล็ก)
- หากต้องการเตรียมอะกาโรสเจลความเข้มข้น 2% ชั่งผงอะกาโรส 0.8 g ผสมกับ 1X TBE Buffer 40 ml (สำหรับเจลใหญ่)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง (ต่อ)

เมื่อเตรียมผงอะกาโรส และ 1X TBE Buffer ตามความเข้มข้นที่ต้องการแล้ว นำไปให้ความร้อนเพื่อให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เทใส่ถาดสำหรับเตรียมเจลที่มีหวี ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อให้เจลเกิดการแข็งตัว

3.2 การเตรียม 3X Gel loading dye blue

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

4. การเตรียมเอธิเดียมโบรไมด์

ดูดเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 10 mg/ml ปริมาตร 0.5 ml หรือ 500 µl ลงในภาชนะที่เตรียมไว้ เติม 1X TBE Buffer ปริมาตร 499.5 ml ผสมให้เข้ากัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้