b.114632

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาการจำแนกเพศนกปรอดคอลาย (*Pycnonotus finlaysoni*) โดยเทคนิค DNA sexing

Stripe-throated Bulbul (*Pycnonotus finlaysoni*) sex determination using DNA sexing technique

โดย

นันทนิจ จารุเศรณีย์

สมบูรณ์ คำเตจา

ธีรเดช หมูคำ

งานวิจัยนี้ได้รับเงินอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2556

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาการจำแนกเพศนกปรอดคอลาย (*Pycnonotus finlaysoni*) โดยเทคนิค DNA sexing

Stripe-throated Bulbul (*Pycnonotus finlaysoni*) sex determination using DNA sexing technique

โดย

นันทนิจ จารุเศรณีย์
สมบูรณ์ คำเตจา
ธีรเดช หมูคำ

งานวิจัยนี้ได้รับเงินอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง
ประจำปีงบประมาณพ.ศ. 2556

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณเงินอุดหนุนโครงการวิจัย จากมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2556 และเอื้อเฟื้อห้องปฏิบัติการและเครื่องมือด้านชีวโมเลกุลในการทำวิจัย ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการกลาง มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง ที่ให้คำแนะนำการใช้เครื่องมือในห้องปฏิบัติการ

ขอขอบคุณสาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม ที่ให้ความอนุเคราะห์ห้องปฏิบัติการชีวโมเลกุลและเครื่องมือเก็บข้อมูลภาคสนาม

ขอขอบคุณกรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าดอยเชียงดาว สถานีวิจัยสัตว์ป่าดอยเชียงดาว หัวหน้าประทีป โรจนดิลก หัวหน้าสมศักดิ์ ฐิติชยาภรณ์ และหัวหน้ามงคล สาฟูวงศ์ สำหรับความร่วมมือในการศึกษาครั้งนี้ และความช่วยเหลือระหว่างการเก็บข้อมูลภาคสนาม

ขอขอบคุณนางสาวนุชจรีย์ สิงคราช นายวรพจน์ บุญความดี และนักศึกษาห้องปฏิบัติการปักษีวิทยา มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม ที่ช่วยเก็บข้อมูลภาคสนามและการทำงานในห้องปฏิบัติการ

บทสรุปผู้บริหาร

เงินอุดหนุนโครงการวิจัย จากมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวงประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2556

1. ความสำคัญของปัญหาในการวิจัย

ในปัจจุบันการงานวิจัยด้านปักษีวิทยาของประเทศไทยยังขาดข้อมูลการจำแนกเพศของนกด้วยเทคนิคชีวโมเลกุล และยังไม่มีข้อมูลความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะภายนอกของนกที่เพศผู้และเพศเมียมีลักษณะสีขนที่เหมือนกัน (monomorphism) โดยเฉพาะอย่างยิ่งในนกปรอดคอลาย (*Pycnonotus finlaysoni*) ดังนั้นการศึกษาการจำแนกเพศของนกโดยเทคนิค DNA sexing โดยอาศัยความแตกต่างของยีน CHD ที่อยู่บนโครโมโซมเพศของนกเพศผู้และเพศเมีย และการศึกษาความสัมพันธ์ของลักษณะทางกายภาพของนก จะช่วยเพิ่มเติมข้อมูลที่มีความสำคัญในการศึกษาสัดส่วนประชากรและพฤติกรรมของนกปรอดคอลายในประเทศไทย และสามารถนำข้อมูลที่ได้ไปใช้ในการอนุรักษ์นกและจัดการพื้นที่อาศัยของนกในกลุ่มนี้อย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น งานวิจัยนี้รวบรวมข้อมูลสัณฐานวิทยาและตัวอย่างเลือดนกปรอดคอลาย จำนวน 33 ตัวอย่าง จากเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าดอยเชียงดาว นำตัวอย่างเลือดมาทดสอบการแยกเพศทางวิธีชีวโมเลกุลและใช้ข้อมูลชีวสัณฐานมาทดสอบทางสถิติ ตามลำดับดังนี้ สกัด DNA จากตัวอย่างเลือด ด้วยวิธี proteinase K และเพิ่มปริมาณ ยีน CHD จาก DNA ที่ได้ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ Primer P2/P8 ระบุเพศของนกโดยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสจากจำนวนอัลลีลของยีน CHD โดยนกเพศผู้ปรากฏ 1 อัลลีล และเพศเมียปรากฏ 2 อัลลีล ทดสอบความแตกต่างทางชีวสัณฐาน 5 ลักษณะ ได้แก่ ความยาวปีก, ความยาวปาก, ความยาวหาง, ความยาวแข้ง และน้ำหนัก ของนกเพศผู้และเพศเมีย โดยวิธีทางสถิติ (t-test) และสร้างสมการ ถดถอยพหุโลจิสติกส์ งานวิจัยนี้สามารถระบุเพศของนกปรอดคอลาย โดยใช้ความรู้ด้านชีวโมเลกุลและวิธีทางคณิตศาสตร์ ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการอนุรักษ์ประชากรนกในอนาคต และนำเสนอผลงานในการประชุมระดับประเทศ 2 ผลงาน

บทคัดย่อ

ข้อมูลเพศของสัตว์มีความจำเป็นมากต่อการอนุรักษ์ประชากรสัตว์ป่าในธรรมชาติ ทั้งนี้การจำแนกนกหลายชนิดไม่สามารถทำได้ในธรรมชาติ เนื่องจากเพศผู้และเพศเมียมีลักษณะภายนอกเหมือนกัน ทำให้ไม่สามารถแยกเพศโดยใช้ลักษณะภายนอกที่ต่างกันได้ การศึกษาครั้งนี้จึงมีขึ้นเพื่อพยายามที่จะหาวิธีการระบุเพศของนกปรอดคอลาย โดยใช้เทคนิคชีวโมเลกุล และการสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ จากการเก็บข้อมูลนกปรอด 33 ตัว ในพื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าดอยเชียงดาว ระหว่างเดือนมีนาคมถึงเดือนตุลาคม 2556 โดยใช้ตาข่ายดักจับนกเพื่อเก็บข้อมูลชีวสัณฐานของนกจำนวน 5 ลักษณะ และเก็บตัวอย่างเลือดประมาณ 0.1 มิลลิลิตร เพื่อใช้สำหรับการทดสอบในห้องปฏิบัติการ โดยสกัด DNA จากตัวอย่างเลือด ด้วยวิธี proteinase K เพิ่มปริมาณยีน CHD โดยใช้ไพรเมอร์ P2/P8 และทำการแยกขนาด DNA ที่เพิ่มปริมาณได้โดยวิธีเจลอิโตรโฟรีซิส พบว่าเมื่อสังเกตแถบ DNA ที่ปรากฏจะพบแถบดีเอ็นเอปรากฏ 1 แถบ ในนกเพศผู้ และ 2 แถบ ในนกเพศเมีย จากข้อมูลการทดสอบทางชีวโมเลกุล และชีวสัณฐานของนกปรอดคอลายเพศผู้และเพศเมียได้ถูกนำมาสร้างสมการทางคณิตศาสตร์โดยใช้ multiple logistic regression ซึ่งสมการนี้ช่วยให้สามารถบ่งบอกเพศนกในธรรมชาติได้สะดวกและรวดเร็วมากยิ่งขึ้น แต่สมการดังกล่าวยังไม่สมบูรณ์ มีความแม่นยำเพียง 77.8% การเก็บข้อมูลชีวสัณฐานของนกที่เพิ่มมากขึ้นในอนาคตจะช่วยพัฒนาการระบุเพศนกโดยใช้สมการทางคณิตศาสตร์มีความน่าเชื่อถือและแม่นยำมากขึ้น การศึกษาครั้งนี้สามารถนำไปใช้เป็นต้นแบบในการศึกษาประชากรนกชนิดอื่นในธรรมชาติต่อไปได้

Abstract

The concerning of sexes is important for wildlife population study and conservation, however many monomorphic birds are hardly to determine sex in the field. This study tried to determine sex of Stripe-throated Bulbuls, the Asiatic monomorphic passerines, by using DNA sexing technique. Thirtythree adult Stripe-throated Bulbulshad been caught from their natural habitats in Chiang Dao Wildlife Sanctuary. All the birds were caught between March 2013 and October 2013 by using mist nets. Each bird was collected five morphometric data and approximately of 0.1 ml of blood sample for further DNA analysis.The bird's genomic DNA was obtained by using proteinase K extraction kit. The primers P8 and P2 were used to amplify CHD gene by polymerase chain reactions (PCR). For most sex determination, the PCR's product was visualized for the number of allele's band; a bird with one band is male and a bird with two bands is female. To predict the sex of our study species, we combined both molecular and morphometric data together to generate the multiple logistic regression which predicted 77.8% of our population tested in this study and based on small sample size. This mathematic analysis along with DNA sexing technique will be very helpful for sex determination of Stripe-throated Bulbuls in the field. Future study needs to deal with bigger of sample size for robust predictions. Our study may be used as a model for further wildlife bird population study.

สารบัญ

	หน้า
บทที่ 1 บทนำ	6
บทที่ 2 แนวคิดทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	7
บทที่ 3 ระเบียบวิธีวิจัย	11
บทที่ 4 ผลการวิจัย	13
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	19
เอกสารอ้างอิง	22
ภาคผนวก	25
ประวัตินักวิจัย	28

สารบัญตาราง

	หน้า
ตาราง 1 ข้อมูลเปรียบเทียบชีวสัณฐาน 5 ลักษณะ ของนกปรอดคอลาย	14
ตาราง 2 ข้อมูลชีวสัณฐาน 5 ลักษณะ ของนกปรอดคอลายเพศผู้และเพศเมีย	17
ตาราง 3 ค่าสัมประสิทธิ์ของการถดถอยพหุโลจิสติก	18
ตาราง 4 ความถูกต้องของการระบุเพศ	19
ตาราง 5 ข้อมูลชีวสัณฐาน 5 ลักษณะ ของนกปรอดคอลายเพศผู้และเพศเมีย	20

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพ 1 หลักการพื้นฐานในการแยกเพศนกโดยการเพิ่มปริมาณยีน CHD จากโครโมโซมเพศนก นกเพศเมีย มีโครโมโซม ZW ส่วนนกเพศผู้มีโครโมโซม ZZ	8
ภาพ 2 การกระจายตัวของนกปรอดคอลาย (สีเทา) ในจีนด้านตะวันตกเฉียงใต้ และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้	10
ภาพ 3 ลักษณะภายนอกของนกปรอดคอลายแสดงลักษณะที่เหมือนกันของนกแต่ละตัว	15
ภาพ 4 ตัวอย่างเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส(ความเข้มข้น 2%) แสดงแถบ DNA ที่แตกต่างกันของนกปรอดเพศผู้ (ยีน CHD-ZZ, 1 แถบ) และเพศเมีย (ยีน CHD-ZW, 2 แถบ)	16

บทที่ 1 บทนำ

การจำแนกเพศของนกมีความสำคัญในการศึกษาประชากรและพฤติกรรมของนก ช่วยให้เราทราบถึงโครงสร้างประชากร สัดส่วนของนกเพศผู้และเพศเมียในแต่ละพื้นที่อาศัย อีกทั้งยังช่วยสร้างความเข้าใจพฤติกรรมที่นกแต่ละตัวแสดงออก โดยจะช่วยให้เข้าใจพฤติกรรมแต่ละแบบเพิ่มมากขึ้น เช่น พฤติกรรมการหาอาหารเป็นพฤติกรรมที่ได้วิวัฒนาการตามสิ่งแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไป นกและสิ่งมีชีวิตจึงมีความจำเป็นต้องมีการปรับตัว ปรับเปลี่ยนพฤติกรรมเพื่ออยู่รอดในสิ่งแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไป และในนกแต่ละเพศมีการแสดงพฤติกรรมที่แตกต่างกัน การจำแนกเพศของนกที่มีลักษณะภายนอกของนกทั้งสองเพศแตกต่างกันอย่างชัดเจน เช่น นกกระจอก นกพญาไฟ สามารถทำได้โดยการสังเกตจากลักษณะภายนอกที่เป็นเอกลักษณ์ของแต่ละเพศ แต่การจำแนกเพศของนกที่มีลักษณะภายนอกของทั้งสองเพศใกล้เคียงกันมาก เช่น นกปรอดคอลาย โดยการสังเกตลักษณะภายนอกนั้นทำได้ค่อนข้างยากและขาดความแม่นยำในการจำแนกเพศ ในปัจจุบันได้มีการพัฒนาเทคนิคการแยกเพศของนกโดยการศึกษาสารพันธุกรรม ซึ่งอาศัยความแตกต่างของยีนที่อยู่บนโครโมโซมเพศของนกเพศผู้และเพศเมีย มาช่วยในการจำแนกเพศของนกเพื่อให้การจำแนกเพศมีความแม่นยำมากยิ่งขึ้นและสามารถทำได้ในทุกช่วงอายุของนก โดยไม่จำเป็นต้องรอให้นกโตเต็มที่ เพื่อจะได้สังเกตจากลักษณะภายนอกที่ต่างกัน หรือสังเกตคาดเดาจากพฤติกรรมที่ต่างกันของเพศผู้และเพศเมีย ในประเทศไทยการจำแนกเพศของนกด้วยเทคนิคดังกล่าว มีการนำไปใช้ไม่แพร่หลายนัก และยังขาดข้อมูลความแตกต่างของนกปรอดคอลายเพศผู้และเพศเมีย และยังไม่มีการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะภายนอกที่สามารถสังเกตได้กับเพศของนก

ดังนั้นการศึกษาการจำแนกเพศของนกโดยเทคนิค DNA sexing ในนกที่ทั้งสองเพศมีลักษณะภายนอกไม่ต่างกันและความสัมพันธ์ของลักษณะทางกายภาพและเพศของนกจะช่วยเพิ่มข้อมูลที่มีความสำคัญในการศึกษาพฤติกรรมของนกและผลกระทบของสิ่งแวดล้อมที่มีผลต่อโครงสร้างประชากรของนก ซึ่งข้อมูลดังกล่าวจะเป็นประโยชน์ในการศึกษาสัดส่วนประชากรของนกปรอดคอลายในประเทศไทย ประชากรนกในกลุ่มนกปรอด เป็นนกกลุ่มที่มีความสำคัญในการกระจายเมล็ดพันธุ์ในป่า ดังนั้นข้อมูลโครงสร้างประชากรของนกในกลุ่มนี้จึงมีความสำคัญต่อการอนุรักษ์นกและการอนุรักษ์พื้นที่อาศัยของนกในกลุ่มนี้อย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น และข้อมูลดังกล่าวสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการศึกษาประชากรของนกในกลุ่มอื่น ๆ ที่นกทั้งสองเพศมีลักษณะภายนอกคล้ายกันได้ต่อไป

บทที่ 2 แนวคิดทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การจำแนกเพศของนกในธรรมชาติโดยสังเกตจากลักษณะภายนอก (phenotype) ที่แตกต่างกันสามารถทำได้ในนกที่ในเพศผู้และเพศเมียมีลักษณะภายนอกแตกต่างกัน (sexual dimorphism) เช่น นกกระจอก นกพญาไฟ แต่การจำแนกเพศด้วยวิธีดังกล่าวสามารถทำได้ยากในนกที่ไม่มีความแตกต่างกันระหว่างเพศผู้และเพศเมีย (sexual monomorphism) เช่น นกในกลุ่มนกปรอดบางชนิด ดังเช่น นกปรอดคอลาย นกในกลุ่มนกปรอดมีความสำคัญต่อระบบนิเวศในป่า เนื่องจากนกกลุ่มนกปรอดมีส่วนช่วยกระจายเมล็ดพันธุ์ (seed disperser) ของพันธุ์ไม้ต่าง ๆ ในป่า [1][2] โดยนกกลุ่มนี้จะกินผลไม้หรือลูกไม้สุกเป็นอาหารซึ่งเมล็ดพันธุ์ในลูกไม้เหล่านี้พร้อมที่จะงอกเป็นต้นใหม่เมื่อนกกลุ่มนกปรอดมากินลูกไม้จะนำเมล็ดพันธุ์กระจายไปตามที่ต่าง ๆ ที่นกอาศัยอยู่ด้วย นกกลุ่มนี้มักจะพบมากบนต้นไม้ที่มีลูกไม้สุกอยู่หนาแน่น [1] แต่เนื่องจากนกปรอดคอลายเป็นนกที่นกเพศผู้และเพศเมียมีลักษณะภายนอกที่คล้ายกันมากทำให้การตรวจดูลักษณะภายนอกนั้นยากที่จะบ่งบอกเพศของนกได้อย่างแม่นยำ

การบ่งบอกเพศของนกสามารถทำได้โดยหลากหลายวิธีประกอบกัน เช่น การสังเกตพฤติกรรมของนกในช่วงฤดูผสมพันธุ์ การตรวจดูโครโมโซม (cytological sex identification) รวมทั้งการตรวจดูอวัยวะเพศของนก (gonad laparotomy) การจำแนกเพศของนกมีความสำคัญในการศึกษาชีววิทยาของนกหลากหลายแบบ เช่น การศึกษากลุ่มประชากรของนก การศึกษาด้านพฤติกรรม การศึกษานิเวศวิทยา [3; 4] และการศึกษาด้านวิวัฒนาการ [3] ดังนั้นในปัจจุบันจึงมีการพัฒนาเทคนิคอณูชีววิทยา (molecular technique) มาใช้ในการจำแนกเพศ เพื่อเพิ่มความแม่นยำในการบ่งบอกเพศของนก นกเป็นสัตว์ที่ระบุเพศโดยโครโมโซมเพศ นกเพศเมียเป็นสัตว์ที่เป็น heterogametic sex จะมีโครโมโซมเพศที่แตกต่างกัน คือ ZW และในนกเพศผู้มีโครโมโซมแบบ homogametic sex คือ ZZ โครโมโซมเพศของนก (Z และ W) วิวัฒนาการมาจากโครโมโซมร่างกาย ในกระบวนการวิวัฒนาการนั้นโครโมโซม W มียีนบางส่วนหายไป [5]ยีนที่นิยมนำมาใช้เป็นตัวบ่งบอกเพศในนก (sex specific DNA) เช่น ยีน CHD (chromo-helicase domain) ซึ่งเป็นยีนที่มีการเปลี่ยงแปลงไม่มากในกระบวนการวิวัฒนาการ (conserved gene) [6] CHD เป็นยีนที่พบบนโครโมโซมเพศของนก ทั้งโครโมโซม Z และ W ในปัจจุบันได้มีการพัฒนาเทคนิค PCR โดยการเพิ่มปริมาณยีน CHD โดยใช้ primer ที่ออกแบบให้จำเพาะกับตำแหน่งที่จะแยกความแตกต่างของ intron ของยีน CHD ทั้งในโครโมโซม Z และ W ตัวอย่าง primer ที่ใช้ในการแยกเพศของนกมีดังนี้ [5]

ตัวอย่าง primer

Primer คู่ที่ 1

P2 5′-TCTGCATCGCTAAATCCTTT-3’

P8 5′-CTCCCAAGGATGAGRAAYTG-3′

Primer คู่ที่ 2

2550F 5′-GTTACTGATTCGTCTACGAGA-3′

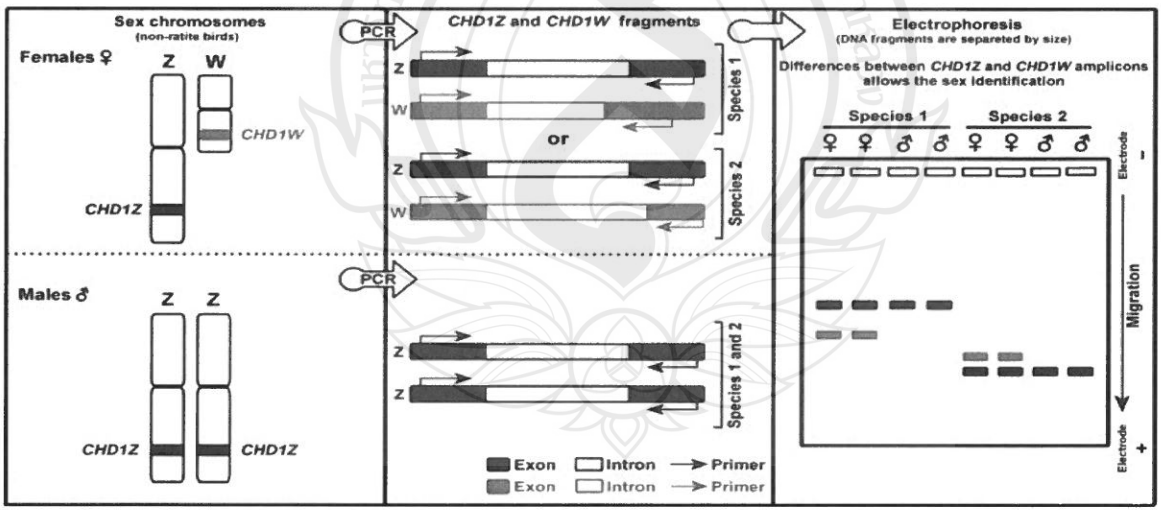
2718R 5′-ATTGAAATGATCCAGTGCTTG-3′

Primer คู่ที่ 3

1237L 5′-GAGAAACTGTGCAAAACAG-3′

1272H 5′-TCCAGAATATCTTCTGCTCC-3′

จากรายงานการศึกษามากมายที่พบความแตกต่างระหว่างความยาวของยีน CHD-Z และ CHD-W ที่เพิ่มปริมาณโดยการทำ PCR ทำให้สามารถใช้ความแตกต่างดังกล่าวแยกเพศของนกได้ [7] การเพิ่มจำนวนยีนที่พบในทั้งสองโครโมโซม จึงได้ชิ้น DNA ที่มีความแตกต่างกัน ระหว่างนกเพศผู้และเพศเมีย [3] (ภาพ 1)

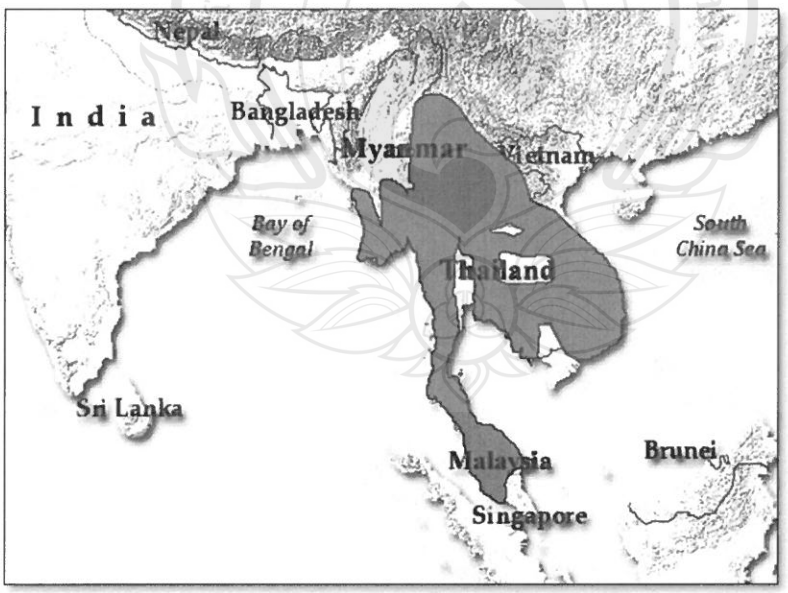


ภาพ 1 หลักการพื้นฐานในการแยกเพศนกโดยการเพิ่มปริมาณยีน CHD จากโครโมโซมเพศนก นกเพศเมีย มีโครโมโซม ZW ส่วนนกเพศผู้มีโครโมโซม ZZ

เมื่อเพิ่มจำนวนยีน CHD โดย ใช้ primer P2/P8 เพียงคู่เดียว สามารถ แยกความแตกต่างของนกเพศผู้และเพศเมียได้จากจำนวนแถบ DNA ที่เกิดขึ้น โดยนกเพศผู้จะมีจำนวนแถบ DNA ที่เกิดขึ้นเพียง 1 แถบ จากยีน CHD-Z จำนวน 2 alleles ส่วนในนกเพศเมีย จะมีแถบ DNA เกิดขึ้นจำนวน 2 แถบ จากยีน CHD-Z และ CHD-W อย่างละ 1 alleles การบ่งบอกเพศของนก โดยใช้เทคนิค PCR เมื่อใช้ primer P2/P8 เป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพในการแยกเพศของนก [8] เทคนิคการบ่งบอกเพศของนกโดยใช้ DNA ดังกล่าวได้มีการนำมาใช้ในการแยกเพศของนกหลากหลายชนิด เช่น *Alopochen aegyptiacus*, *Ara severus*, *Aratinga acuticaudata*, *Bucorvus leadbeateri*, *Cereopsis novaehollandiae*, *Columba arquatrix*, *Corvus corax*, *C. frugilegus*, *Cyanoliseus patagonus*, *Guttera plumifera*, *Lamprotornis superbus*, *Milvus milvus*, *Neophron percnopterus*, *Ocyphaps lophotes*, *Podiceps cristatus*, และ *Poicephalus senegalus* [6] *Mycteria cinerea* และ *M. leucocephala* [9] *Apus apus* [10] *Nymphicus hollandicus* [11] มีการนำเทคนิคนี้มาใช้ในการจำแนกเพศของนกกระจอกเทศ (*Struthio camelus*) เพื่อคัดเลือกประชากรที่มีสายพันธุ์ที่ตรงตามความต้องการของตลาด เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษาสายพันธุ์นั้นไว้ โดยทำการแยกเพศนกกระทาที่มีอายุเพียง 1 วันเท่านั้น [12] การแยกเพศในการอนุรักษ์นกที่ใกล้สูญพันธุ์ เช่น นก Common Murre (*Uria aalge*) [13] พบรายงานการนำไปใช้ในการจำแนกเพศนกเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการขยายพันธุ์นกที่กำลังจะสูญพันธุ์ [4, 14, 15] และรวมไปถึงการจำแนกเพศนกเพื่อการค้า เช่น การศึกษาการแยกเพศของนกกระทา (*Coturnix japonica*) ตั้งแต่อายุน้อย ๆ เพื่อจับคู่นกกระทาอย่างมีประสิทธิภาพ [16] นอกจากนี้ยังมีการแยกเพศที่ประสบความสำเร็จโดยใช้ primer P2/P8 ในนกหลากหลายชนิด [14, 15] โดยทุกรายงานให้ผลการทดลองที่เป็นไปในทางเดียวกัน คือ ในนกเพศผู้จะปรากฏแถบ DNA เพียงแถบเดียว ส่วนในเพศเมียจะปรากฏแถบ DNA 2 แถบ หลังจากการเพิ่มจำนวนยีน CHD โดยการทำ PCR

การบ่งบอกเพศของนกโดยใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยาเป็นวิธีการที่ง่าย [12] สะดวกรวดเร็ว และมีความแม่นยำสูง สามารถทำได้ในนกทุกช่วงอายุ [16] มีต้นทุนต่ำ [12] และเป็นวิธีที่ไม่ต้องอาศัยเทคนิคขั้นสูงในการวิเคราะห์ข้อมูล ปัจจุบันยังคงต้องมีการศึกษาวิธีการจำแนกเพศในนกแต่ละชนิด ถึงแม้ไพรเมอร์ที่ใช้ในการแยกเพศของนกจะมีรายงานการใช้อย่างประสบความสำเร็จในนกหลายชนิดแล้วก็ตาม ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงเป็นการศึกษาการจำแนกเพศนกปรอดคอลายโดย DNA sexing และศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างข้อมูลลักษณะภายนอกกับเพศของนกที่ได้จากการทำ DNA sexing

นกปรอดคอลาย Stripe-throated Bulbul (*Pycnonotus finlaysoni*) อยู่ในอันดับ Passeriformes วงศ์ Pynonotidae มีพบกระจายพันธุ์อยู่ในจีนด้านตะวันตกเฉียงใต้ และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ในประเทศไทยพบเกือบทุกภาคของประเทศ ยกเว้นบางพื้นที่ของภาคกลางและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (ภาพ 2) ลักษณะสัณฐานวิทยา เป็นนกขนาดเล็กมีความยาวตั้งแต่ปลายปากถึงปลายหาง 19 ซม. ลักษณะภายนอกที่แตกต่างจากนกปรอดชนิดอื่นตรงที่มีลายขีดสีเหลืองกระจายบริเวณหน้าผาก ใบหน้า และคอหอย ลำตัวด้านบนสีเขียวแกมน้ำตาล ท้องตอนหน้าสีขาวแกมเทา ท้องด้านท้ายและขนคลุมโคนหางด้านล่างสีเหลือง [17] พบตามป่าเบญจพรรณ ป่าดงดิบชื้น ป่าดงดิบแล้ง ป่ารุ่น ทุ่งโล่ง ตั้งแต่พื้นราบจนกระทั่งความสูง 900 เมตรจากระดับน้ำทะเล มักพบอยู่เป็นคู่หรือเป็นฝูงเล็ก ๆ หากินบริเวณไม้พุ่ม ไม้พื้นล่าง ลูกไม้ บางครั้งพบตามยอดไม้ที่ค่อนข้างสูง กินอาหารหลากหลายได้แก่ ผลไม้ เมล็ด หนอน และแมลง [1; 2; 19] ผสมพันธุ์ในช่วงฤดูร้อนต่อฤดูฝน ส่วนใหญ่ทำรังตามพุ่มไม้ กิ่งของต้นไม้ใหญ่หรือเถาวัลย์ ซึ่งสูงจากพื้นดินประมาณ 0.6-4.5 เมตร รังเป็นรูปถ้วยมีเส้นผ่านศูนย์กลางภายนอก 9.15 ซม. เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 8.00 ซม. และลึก 3.61 ซม. รังประกอบด้วยกิ่งไม้เล็ก ๆ เส้นกลางใบของใบไม้และใบหญ้า นำมาสานหรือขัดกันหยาบ ๆ เชื่อมวัสดุให้ติดกันด้วยใยแมงมุมโดยเฉพาะบริเวณขอบรัง จากนั้นรองรังด้วยรากไม้หรือเถาวัลย์ที่ละเอียด รังมีไข่ 2 ฟอง ไข่สีครีม มีลายสีออกแดงและสีเทา ขนาดของไข่โดยเฉลี่ย 20.8 x 15.7 มม. ทั้งสองเพศช่วยกันทำรัง ฟักไข่ และเลี้ยงดูลูกอ่อนเริ่มฟักตั้งแต่วางไข่ฟองแรก ใช้ระยะเวลาฟักไข่ 13-14 วัน ลูกนกอายุ 12-13 วัน จะบินได้และทิ้งรังไป



ภาพ 2 การกระจายตัวของนกปรอดคอลาย (สีเทา) ในจีนด้านตะวันตกเฉียงใต้ และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (ข้อมูลจาก IUCN มิถุนายน 2556)

บทที่ 3 ระเบียบวิธีวิจัย

1. ทำการทดสอบการจำแนกเพศนก โดยเทคนิค DNA sexing โดยสุ่มเก็บตัวอย่างเลือดนกปรอดคอลายจากพื้นที่ป่าเบญจพรรณ ที่อำเภอเชียงดาว จังหวัดเชียงใหม่ ที่มีรายงานการพบประชากรนกปรอดคอลายในประเทศไทย ซึ่งจากข้อมูลของ Lekagul and Round [17] บ่งบอกว่า สามารถพบนกปรอดคอลายบริเวณป่าเบญจพรรณและป่าเต็งรังของประเทศไทย ที่มีความสูงไม่เกิน 900 เมตรจากระดับน้ำทะเล

2. กำหนดพื้นที่สำหรับการดักนกโดยใช้ตาข่ายดักนก (mist net) เพื่อทำการสุ่มดักนกปรอดคอลาย สำหรับเก็บตัวอย่างเลือด โดยกำหนดการเก็บตัวอย่างในเดือนมีนาคม และตุลาคม 2556 ตั้งแต่เวลา 7:00 น. ถึง 16:00 น. โดยใช้ตาข่ายความยาว 12 เมตร ขนาดรูตาข่าย 2.0 x 2.0 ซม. จำนวน 10 ผืน

3. เก็บข้อมูลพื้นฐานจากนกปรอดคอลายที่จับได้ เช่น ความยาวปาก (bill length) (มม.) ความยาวขา (tarsus length) (มม.) ความยาวปีก (wing length) (มม.) ความยาวหาง (tail length) (มม.) โดยวัดความยาวด้วย vernier calipers และน้ำหนัก (weight) (กรัม) โดยใช้เครื่องชั่งแบบดิจิตอล นกทุกตัวที่จับได้จะถูกทำเครื่องหมายโดยการใส่ห่วงขาสี เพื่อป้องกันการวัดขนาดซ้ำซ้อน

4. เก็บตัวอย่างเลือดสำหรับการจำแนกเพศนกปรอดคอลายในห้องปฏิบัติการโดย leg bleeding technique [5] เก็บเลือดโดยหยดเลือดลงบนกระดาษกรอง Whatman® ก่อนนำมาวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ

5. การสกัด genomic DNA จากตัวอย่างเลือดที่ได้ โดยใช้ Purelnk genomic DNA mini kit (Invitrogen® Kits) มีวิธีการดังนี้ นำตัวอย่างเลือดใส่ในสารละลาย proteinase K และ digestion buffer (10mM Tris-HCl, 2mM ethylenetetraacetic acid, 10mM NaCl, 1% SDS, 10 mg/ml dithioreitol) บ่มที่อุณหภูมิ 55°C เป็นเวลา 30 นาที (เขย่าทุก 5 นาที) จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 18,000g เป็นเวลา2-3 นาที แล้วแยกสารละลายที่ได้ออกมา จากนั้นเติม RNase และบ่มไว้ เป็นเวลา 2 นาที จึงเติม Binding Buffer พร้อมกับเขย่า และเติม 96-100% ethanol เขย่าให้เข้ากันเป็นเวลา 5 วินาที แล้วจึงทำการแยก DNA นำสารละลายทั้งหมดที่ได้ใส่ใน Spin Column แล้วปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 10,000g เป็นเวลา 1 นาที แล้วจึงล้าง DNA ด้วย Wash Buffer 1 และปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 10,000g 1 นาที เติม Wash Buffer 2 และปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 18,000g เป็นเวลา 3 นาที แล้วใส่ Elution Buffer และปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 18,000g เป็นเวลา 2 นาที เพื่อเก็บ genomic DNA จากนั้นเก็บรักษาตัวอย่าง DNA ไว้ที่ -20 °C

6. นำ DNA ที่ได้มาทำการเพิ่มปริมาณ ยีน CHD ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ primer P2 และ P8 [8] Primer P2: 5´-TCT GCA TCG CTA AAT CCT TT-3' และ Primer P8: 5´-

CTC CCA AGG ATG AGR AAY TG-3´ ทำการเพิ่มปริมาณยีนโดยดัดแปลงมาจาก Kamtaeja *et al.* (2012) [19] จำนวน 35 รอบ ตามส่วนประกอบของชุดทดสอบดังนี้ (ปริมาตรรวม = 25 µl)

1. 10X PCR buffer (invitrogen®)	2.5 µl
2. 50 mM $MgCl_2$	1.0 µl
3. 2.5 mM dNTP mixture	2.0 µl
4. 5 U/µl *Taq* DNA polymerase (invitrogen®)	0.5 µl
5. 10 µM of forward and reverse primers	1.0 µl (each)
6. 40 ng/ul DNA template	2.0 µl
7. diH_2O	15.0 µl

โปรแกรมการเพิ่มปริมาณยีนดังนี้

1. Start Denature step	94 ^{O}C	เป็นเวลา	5	นาที
2. Denature step	94 ^{O}C	เป็นเวลา	30	วินาที
3. Annealing step	55 ^{O}C	เป็นเวลา	30	วินาที
4. Extension step	72 ^{O}C	เป็นเวลา	30	วินาที
5. Final extension step	72 ^{O}C	เป็นเวลา	5	นาที

โดยทำซ้ำข้อ 2 ถึง 4 จำนวน 35 รอบ

8. ทำการวิเคราะห์ปริมาณยีน ที่เพิ่มปริมาณได้โดยทำ gel electrophoresis โดยใช้เจล agarose ความเข้มข้น 2% เพื่อสังเกตความแตกต่างของ DNA ที่เพิ่มปริมาณได้จากนกเพศผู้และเพศเมียภายใต้แสงยูวีหลังจากย้อม DNA ด้วยสารที่เรืองแสงภายใต้แสงยูวี

9. วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระว่างลักษณะภายนอกที่บันทึกได้ และเพศของนกที่วิเคราะห์ได้ในห้องปฏิบัติการ โดยการสร้างสมการ multiple logistic regression

บทที่ 4 ผลการวิจัย

พื้นที่ศึกษา

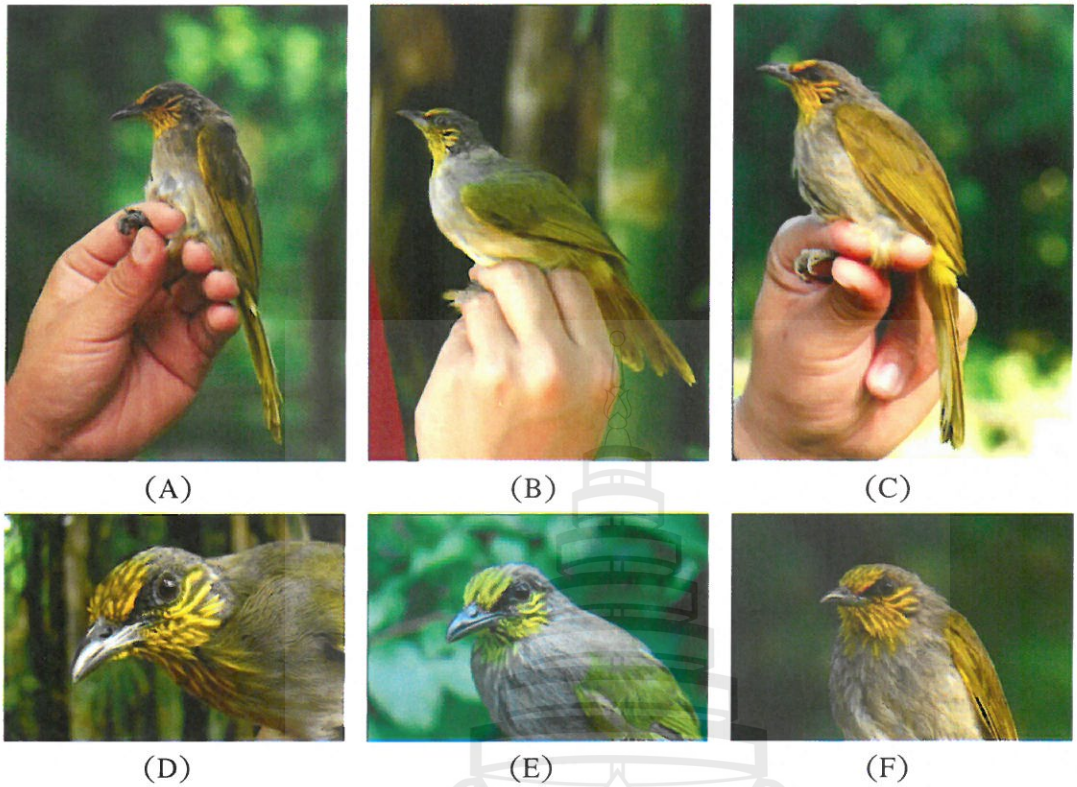
พื้นที่ศึกษาอยู่ในเขตพื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าดอยเชียงดาว (19°21' เหนือ และ 98°50' ตะวันออก) พื้นที่ประกอบด้วยพื้นที่ที่มีความลาดชันสูงเนื่องจากอยู่เชิงเขาหินปูน มีความสูงจากระดับน้ำทะเลอยู่ในช่วง 450 ถึง 750 เมตร ลักษณะของพันธุ์ไม้ของพื้นที่ศึกษาสามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภท ได้แก่ ป่าเต็งรัง (Dry evergreen forest) ที่ระดับความสูง 650-700 เมตรจากระดับน้ำทะเล และป่าเบญจพรรณผสมไผ่ (mixed deciduous forestwith bamboo) 450-650 เมตรจากระดับน้ำทะเล พรรณไม้เด่นที่พบ เช่น เต็ง (*Shorea obtusa* Wall. ex Blume) รักใหญ่ (*Gluta usitata* (Wall.) Ding Hou) ประดู่ป่า (*Pterocarpus macrocarpus* Kurz) เปล้าใหญ่ (*Croton roxburghii* N. P.Balakr.) ไผ่ไร่ (*Gigantochloa albociliata* Munro) เป็นต้น ลักษณะภูมิอากาศของเขาดอยเชียงดาวเป็นแบบภูมิอากาศแบบภาคพื้นทวีป แบ่งออกได้เป็น 3 ฤดู คือ ฤดูร้อนตั้งแต่เดือนกุมภาพันธ์-เดือนพฤษภาคม ฤดูฝนตั้งแต่เดือนพฤษภาคม-เดือน และฤดูหนาวตั้งแต่เดือนพฤศจิกายน-เดือนมกราคม มีอุณหภูมิเฉลี่ยต่ำสุดในกลางเดือนธันวาคม ถึงกลางเดือนมกราคม อุณหภูมิ อยู่ที่ 6.7 องศาเซลเซียส อากาศเย็นและแห้ง

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของนกปรอดคอลาย

นกปรอดคอลายมีลักษณะภายนอกแบบ monomorphism มีขนลำตัวด้านบนสีเขียวแกมน้ำตาล ท้องตอนหน้าสีขาวแกมเทา ท้องด้านท้ายและขนคลุมโคนหางด้านล่างสีเหลือง ขนปีกและหางสีน้ำตาลเทา ปลายขนปีกและขนหางมีสีเหลือง จะงอยปากสีดำหรือน้ำตาลเข้ม ขนบริเวณหัวตา (lore) มีสีดำ แข้งและนิ้วเท้าสีน้ำตาลเข้มหรือดำ และไม่ค่อนแข็งแรง หัวมีขนเส้นเล็กลายขีดสีเหลืองกระจายบริเวณหน้าผาก ใบหน้า และคอหอย [17] แต่ไม่พบสีขนที่เป็นลักษณะเฉพาะของนกเพศผู้และเพศเมีย ดังนั้นนกปรอดคอลายเพศผู้และเพศเมียจึงมีลักษณะสีขนเหมือนกัน (ภาคผนวก ข) และไม่สามารถจำแนกเพศโดยการตรวจอวัยวะเพศ เนื่องจากอวัยวะเพศของนกอยู่ภายในลำตัวนก และลักษณะชีวสัณฐานของนกปรอดทั้ง 27 ตัว ดังนี้ (ตาราง 1)

ตาราง 1 ข้อมูลชีวสัณฐาน 5 ลักษณะ ของนกปรอดคอลาย

ตัวที่	ความยาวปาก (มม.)	ความยาวหาง (มม.)	ความยาวปีก (มม.)	ความยาวแข้ง (มม.)	น้ำหนัก (กรัม)
1	18.2	79.0	78.0	20.3	31.1
2	18.5	82.0	79.0	20.3	29.9
3	18.5	80.0	80.0	19.8	29.6
4	18.5	85.0	81.0	20.4	31.1
5	17.0	80.0	78.0	19.0	29.5
6	17.8	80.0	74.0	20.4	27.0
7	17.5	83.0	80.0	20.3	30.3
8	17.0	87.0	82.0	20.4	30.8
9	18.2	84.0	78.0	18.9	29.5
10	18.1	79.0	75.0	19.2	28.0
11	18.3	84.0	81.0	19.7	27.9
12	17.4	84.0	75.0	20.3	27.2
13	17.8	82.0	80.0	19.1	30.8
14	18.5	82.0	77.0	20.6	32.7
15	18.4	85.0	84.0	20.1	31.7
16	18.5	79.0	83.0	19.1	29.0
17	18.4	85.0	79.0	19.2	27.3
18	18.6	90.0	86.0	20.1	32.5
19	18.3	90.0	84.0	20.1	30.9
20	17.8	83.0	78.0	19.6	27.1
21	17.0	86.0	82.0	19.8	28.8
22	18.2	85.0	82.0	19.3	30.8
23	19.1	82.0	81.0	19.8	27.5
24	18.2	80.0	82.0	19.5	25.3
25	18.9	87.0	80.0	19.5	33.8
26	18.6	88.0	83.0	19.6	35.9
27	18.3	85.0	82.0	20.0	33.2



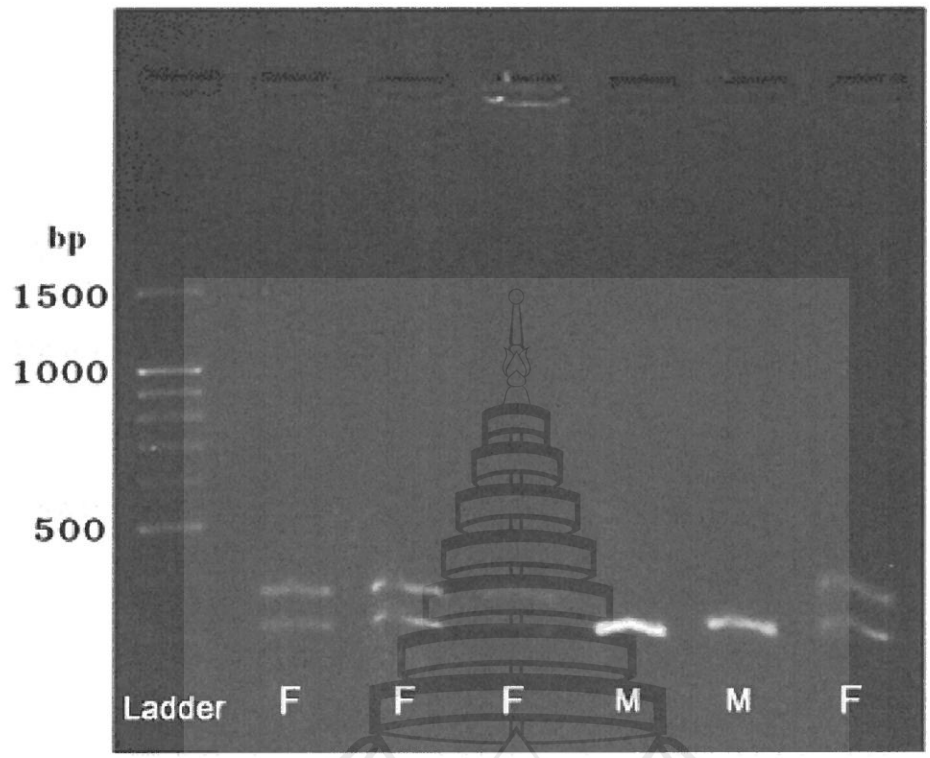
(A) (B) (C)

(D) (E) (F)

ภาพ 3 ลักษณะภายนอกของนกปรอดคอลายแสดงลักษณะที่เหมือนกันของนกแต่ละตัว: ภาพแบบเต็มตัว (ภาพ A, B และ C), ภาพแบบครึ่งตัวแถบขนสีเหลืองซึ่งปกคลุมบริเวณหน้าผาก แก้ม และคอ ซึ่งเป็นลักษณะประจำชนิดของนกปรอดคอลายแต่ไม่สามารถนำมาแยกความแตกต่างระหว่างตัวได้ (ภาพ D, E และ F)

การใช้ molecular technique ในการระบุเพศ

จากตัวอย่างเลือดนกปรอดคอลาย 33 ตัวอย่าง ซึ่งไม่สามารถจำแนกเพศได้ในภาคสนาม นำมาสกัด DNA และใช้เทคนิคชีวโมเลกุล โดยใช้ไพรเมอร์ P2/P8 [8] ซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน CHD บนโครโมโซมเพศของนก และการตรวจสอบขนาดขนาดยีน CHD ด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสด้วยความเข้มข้นของ agarose 2% (ภาพ 3) และสามารถตรวจพบตัวอย่างจำนวน 17 ตัวอย่าง แสดงลักษณะของโครโมโซมเพศแบบ homogametic sex หรือ ZZ ซึ่งมีขนาดของยีนบนโครโมโซมเพศเท่ากันที่ประมาณ 320 คู่เบส สามารถระบุเพศเป็น “เพศผู้” และมีจำนวน 16 ตัวอย่างแสดงลักษณะของโครโมโซมเพศแบบ heterogametic chromosome หรือ ZW ซึ่งมีขนาดของยีนบนโครโมโซมเพศที่ไม่เท่ากัน มีความยาวของยีนที่ประมาณ 320 คู่เบส และ 380 คู่เบส สามารถระบุเพศเป็น “เพศเมีย” จากความแตกต่างที่ชัดเจนของยีนที่ปรากฏบนเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส แสดงให้เห็นว่าการใช้ DNA สามารถระบุเพศของนกปรอดคอลายจากตัวอย่างทั้งหมดได้ และให้ผลที่แน่นอนกว่าวิธีการใช้ชีวสัณฐาน



ภาพ 4 ตัวอย่างเจลอีเล็กโตรโฟรีซิส (ความเข้มข้น 2%) แสดงแถบ DNA ที่แตกต่างกันของนกปรอดเพศผู้ (M) ยีน CHD-ZZ ขนาดประมาณ 320 คู่เบส และเพศเมีย (F) ยีน CHD-ZW ขนาดประมาณ 320 คู่เบส และ 380 คู่เบส

ชีวสัณฐานของนกปรอดคอลาย

จากการเก็บข้อมูลชีวสัณฐาน (ขนาดตัว) ของนกปรอดคอลายในภาคสนาม 5 ลักษณะ (ตาราง 2) ซึ่งเป็นข้อมูลเบื้องต้นที่ถูกนำมาใช้ในการจำแนกเพศของนกทั่วไป ข้อมูลชีวสัณฐานแสดงขนาดที่แตกต่างกันของนกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ 3 ลักษณะ และไม่มีความแตกต่างกัน 2 ลักษณะ พบว่านกเพศผู้มีขนาดใหญ่กว่านกเพศเมียเล็กน้อย อย่างไรก็ตามวิธีการใช้ชีวสัณฐานขนาดตัวเพียงอย่างเดียวอาจไม่เหมาะสมในการจำแนกเพศของนกปรอดคอลาย เนื่องจากการซ้อนทับกันของช่วงข้อมูล ดังนี้

- **ความยาวปีก**นกปรอดคอลายเพศผู้และเพศเมียมีความยาวปีกแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (t-test = 3.726, p = 0.001)โดยนกปรอดคอลายเพศผู้มีความยาวปีกอยู่ในช่วง 77.0 – 86.0 มิลลิเมตร (เฉลี่ย 82.0 ± 0.6 มิลลิเมตร) และเพศเมียมีความยาวปีก อยู่ในช่วง 74.0 – 82.0 มิลลิเมตร (เฉลี่ย 78.9 ± 0.6 มิลลิเมตร) จากข้อมูลความยาวปีกของนกพบว่า นกเพศผู้ 9 ตัวและเพศเมีย 13 ตัว ไม่สามารถจำแนกเพศโดยใช้ขนาดปีกได้

- ความยาวปาก นกปรอดคอลายเพศผู้และเพศเมียมีความยาวปากแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (t-test = 2.947, p = 0.006)โดยนกปรอดคอลายเพศผู้มีความยาวปากอยู่ในช่วง 17.0 – 19.9 มิลลิเมตร (เฉลี่ย 18.5 ± 0.1 มิลลิเมตร) และเพศเมียมีความยาวปาก อยู่ในช่วง 17.0 – 18.5 มิลลิเมตร (เฉลี่ย 17.9 ± 0.1 มิลลิเมตร) จากข้อมูลความยาวปากของนกพบว่า นกเพศผู้ 10 ตัวและเพศเมีย 16 ตัว ไม่สามารถจำแนกเพศโดยใช้ขนาดปากได้

- ความยาวหาง นกปรอดคอลายเพศผู้และเพศเมียมีความยาวหางแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (t-test = 2.466, p = 0.020)โดยนกปรอดคอลายเพศผู้มีความยาวหางอยู่ในช่วง 79.0 – 92.0 มิลลิเมตร (เฉลี่ย 85.3 ± 0.9มิลลิเมตร) และเพศเมียมีความยาวหาง อยู่ในช่วง 79.0 – 86.0 มิลลิเมตร (เฉลี่ย 82.5 ± 0.7มิลลิเมตร) จากข้อมูลความยาวหางของนกพบว่า นกเพศผู้ 12 ตัวและเพศเมีย 16 ตัว ไม่สามารถจำแนกเพศโดยใช้ความยาวหางได้

- ความยาวแข้งนกปรอดคอลายเพศผู้และเพศเมียมีความยาวแข้งไม่แตกต่างกันทางสถิติ (t-test = -0.737, p = 0.467)โดยนกปรอดคอลายเพศผู้มีความยาวแข้งอยู่ในช่วง 19.1 – 20.7 มิลลิเมตร (เฉลี่ย 19.8 ± 0.1มิลลิเมตร) และเพศเมียมีความยาวแข้ง อยู่ในช่วง 19.0 – 20.4 มิลลิเมตร (เฉลี่ย 19.9 ± 0.1มิลลิเมตร) จากข้อมูลความยาวแข้งของนกไม่สามารถจำแนกเพศได้

- น้ำหนักตัวนกปรอดคอลายเพศผู้และเพศเมียมีน้ำหนักตัวไม่แตกต่างกันทางสถิติ (t-test = 0.677, p = 0.504)โดยนกปรอดคอลายเพศผู้มีน้ำหนักตัวอยู่ในช่วง 25.3–35.9 มิลลิเมตร (เฉลี่ย 30.6 ± 0.8กรัม) และเพศเมียมีน้ำหนักตัวอยู่ในช่วง 27.0 –34.9 มิลลิเมตร (เฉลี่ย 30.0 ± 0.5กรัม) จากข้อมูลน้ำหนักตัวของนกไม่สามารถจำแนกเพศได้

ตาราง 2 ข้อมูลเปรียบเทียบชีวสัณฐาน 5 ลักษณะ ของนกปรอดคอลาย จำนวน 33 ตัว

ชีวสัณฐาน	เพศผู้ (17 ตัว)	เพศเมีย(16 ตัว)	t-test	p-value
ความยาวปีก (มม.)	82.0 ± 0.6	78.9 ± 0.6	3.726	0.001
ความยาวปาก (มม.)	18.5 ± 0.1	17.9 ± 0.1	2.947	0.006
ความยาวหาง (มม.)	85.3 ± 0.9	82.5 ± 0.7	2.466	0.020
ควาวยาวแข้ง (มม.)	19.8 ± 0.1	19.9 ± 0.1	-0.737	0.467
น้ำหนัก (กรัม)	30.6 ± 0.8	30.0 ± 0.5	0.677	0.504

สมการถดถอยพหุโลจิสติกทำนายเพศของนกปรอดคอลาย (Multiple logistic regression predicted sex)

จากข้อมูลเพศของนกปรอดซึ่งได้จากการใช้วิธีชีวโมเลกุล และข้อมูลชีวสัณฐานของนกปรอดคอลายแต่ละตัว สามารถนำมาสร้างสมการถดถอยพหุโลจิสติกเพื่อใช้วิเคราะห์เพศของนกปรอดคอลาย ซึ่งวิธีการนี้น่าจะทำให้การระบุเพศของนกปรอดในภาคสนามมีความรวดเร็วและน่าเชื่อถือมากขึ้น โดยใช้ข้อมูลชีวสัณฐาน 5 ลักษณะ ของนกปรอดคอลายเพศผู้ 14 ตัวอย่าง และเพศเมีย 13 ตัวอย่าง เนื่องจากเพศของนกปรอดเป็นตัวแปรแบบไม่ต่อเนื่องและแยกเป็น 2 ค่าชัดเจน จึงกำหนดให้เพศเมียเป็น 0 และเพศผู้เป็น 1 ดังแสดงในตาราง 3
ในการหาความสัมพันธ์ทางคณิตศาสตร์โดยสร้างสมการถดถอยพหุโลจิสติกจะกำหนดให้เพศเป็นตัวแปรตาม และความยาวปาก ความยาวหาง ความยาวปีก ความยาวแข้ง และน้ำหนักเป็นตัวแปรต้น

พิจารณาความน่าจะเป็นของโอกาสที่จะเป็นเพศผู้หรือเพศเมีย

$$P = \frac{e^{b_0+b_1x_1+b_2x_2+b_3x_3+b_4x_4+b_5x_5}}{1+e^{b_0+b_1x_1+b_2x_2+b_3x_3+b_4x_4+b_5x_5}}$$

โดย b_k เป็นค่าสัมประสิทธิ์ x_k เป็นตัวแปรต้น

จากการวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS จะได้ค่าสัมประสิทธิ์ b_0 = -69.354, b_1 = 1.639, b_2 = 0.280, b_3 = 0.419, b_4 = -0.667 และ b_5 = -0.136 ดังแสดงในตาราง 3

ตาราง 3 ค่าสัมประสิทธิ์ของการถดถอยพหุโลจิสติก

Variables in the Equation

		B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)
Step 1[a]	x1	1.639	1.021	2.578	1	.108	5.149
	x2	.280	.247	1.283	1	.257	1.323
	x3	.419	.269	2.424	1	.119	1.520
	x4	-.667	1.092	.373	1	.541	.513
	x5	-.136	.281	.233	1	.630	.873
	Constant	-69.354	38.622	3.225	1	.073	.000

a. Variable(s) entered on step 1: x1, x2, x3, x4, x5.

ดังนั้นจะได้สมการถดถอยพหุโลจิสติกดังนี้

$$P = \frac{e^{-69.354+1.639x_1+0.280x_2+0.419x_3-0.667x_4-0.136x_5}}{1+e^{-69.354+1.639x_1+0.280x_2+0.419x_3-0.667x_4-0.136x_5}}$$

หรือ

$$P = \frac{1}{1+e^{69.354-1.639x_1-0.280x_2-0.419x_3+0.667x_4+0.136x_5}}$$

เมื่อ x_1 = ความยาวของปากนกปรอดคอลาย

x_2 = ความยาวของหางนกปรอดคอลาย

x_3 = ความยาวของปีกนกปรอดคอลาย

x_4 = ความยาวของแข้งนกปรอดคอลาย

x_5 = น้ำหนักของนกปรอดคอลาย

โดย ค่า P มากกว่า 0.5 แสดงลักษณะของนกเพศผู้

ค่า P น้อยกว่า 0.5 แสดงลักษณะของนกเพศเมีย

จากตาราง 3 สามารถตีความผล EXP (B) ของค่าสัมประสิทธิ์แต่ละตัวได้ว่า ถ้าความยาวปาก ความยาวหาง ความยาวปีก และความยาวแข้งเพิ่มขึ้นอย่างละ 1 มิลลิเมตร โอกาสที่จะเป็นนกเพศผู้ 5.149 เท่า 1.323 เท่า 1.520 เท่า และ 0.513 เท่า ตามลำดับ และถ้าน้ำหนักเพิ่มขึ้น 1 กรัม โอกาสที่จะเป็นนกเพศผู้ 0.873 เท่า

จากสมการถดถอยพหุโลจิสติกที่ได้จากข้อมูลดังตาราง a สามารถใช้ทำนายโอกาสที่จะเป็นเพศผู้ (P>0.5) หรือเพศเมีย (P<0.5) ได้ถูกต้อง 21 ตัวอย่าง จาก 27 ตัวอย่าง หรือคิดเป็นร้อยละ 77.8 โดยสามารถแยกโอกาสที่จะเป็นเพศเมียได้ถูกต้องร้อยละ 76.9 (10 ตัวอย่าง จาก 13 ตัวอย่าง) และโอกาสที่จะเป็นเพศผู้ได้ถูกต้องร้อยละ 78.6 (11 ตัวอย่าง จาก 14 ตัวอย่าง) ดังตาราง 4

ตาราง 4 ความถูกต้องของการระบุเพศ

Classification Table[a]

Observed			Predicted		
			sex		Percentage Correct
			.00	1.00	
Step 1	sex	.00	10	3	76.9
		1.00	3	11	78.6
	Overall Percentage				77.8

a. The cut value is .500

ตาราง 5 ข้อมูลชีวสัณฐาน 5 ลักษณะ ของนกปรอดคอลายเพศผู้และเพศเมีย

เพศ (เพศเมีย = 0, เพศผู้ = 1)	x_1 ความยาวปาก (มม.)	x_2 ความยาวหาง (มม.)	x_3 ความยาวปีก (มม.)	x_4 ความยาวแข้ง (มม.)	x_5 น้ำหนัก (กรัม)
0	18.2	79.0	78.0	20.3	31.1
0	18.5	82.0	79.0	20.3	29.9
0	18.5	80.0	80.0	19.8	29.6
0	18.5	85.0	81.0	20.4	31.1
0	17.0	80.0	78.0	19.0	29.5
0	17.8	80.0	74.0	20.4	27.0
0	17.5	83.0	80.0	20.3	30.3
0	17.0	87.0	82.0	20.4	30.8
0	18.2	84.0	78.0	18.9	29.5
0	18.1	79.0	75.0	19.2	28.0
0	18.3	84.0	81.0	19.7	27.9
0	17.4	84.0	75.0	20.3	27.2
0	17.8	82.0	80.0	19.1	30.8
1	18.5	82.0	77.0	20.6	32.7
1	18.4	85.0	84.0	20.1	31.7
1	18.5	79.0	83.0	19.1	29.0
1	18.4	85.0	79.0	19.2	27.3
1	18.6	90.0	86.0	20.1	32.5
1	18.3	90.0	84.0	20.1	30.9
1	17.8	83.0	78.0	19.6	27.1
1	17.0	86.0	82.0	19.8	28.8
1	18.2	85.0	82.0	19.3	30.8
1	19.1	82.0	81.0	19.8	27.5
1	18.2	80.0	82.0	19.5	25.3
1	18.9	87.0	80.0	19.5	33.8
1	18.6	88.0	83.0	19.6	35.9
1	18.3	85.0	82.0	20.0	33.2

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้เป็นการนำองค์ความรู้เกี่ยวกับชีววิทยาระดับโมเลกุล มาใช้ในการระบุเพศของนกปรอดคอลายซึ่งเป็นนกที่ไม่สามารถใช้สีขนหรือลักษณะภายนอกจำแนกเพศได้ การจำแนกเพศโดยอาศัยความแตกต่างของยีน CHD บนโครโมโซม ZZ ของเพศผู้ และ ZW ของเพศเมีย ร่วมกับข้อมูลลักษณะชีวสัญฐาน (ขนาด) ของนกซึ่งเก็บจากภาคสนาม เพื่อหาความแตกต่างของนกเพศผู้และเพศเมียและสร้างสมการหาความสัมพันธ์ระหว่างชีวสัณฐานและเพศของนกปรอดคอลาย ข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยในนี้ช่วยให้เกิดการระบุเพศของนกปรอดคอลาย และทำให้การระบุเพศในปรอดคอลายมีความแม่นยำ และรวดเร็วมากยิ่งขึ้น อีกทั้งช่วยเพิ่มความถูกต้องของข้อมูลในการศึกษาพฤติกรรมของนกการศึกษาสัดส่วนประชากรของนกปรอดคอลายในประเทศไทย และผลกระทบของสิ่งแวดล้อมที่มีผลต่อโครงสร้างประชากรของนก ข้อมูลทั้งหมดสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการศึกษาประชากรของนกในกลุ่มอื่น ๆ ที่นกทั้งสองเพศมีลักษณะภายนอกคล้ายกัน โดยการวิจัยในครั้งนี้ออกแบบการศึกษาเป็น 3 ส่วน คือ การเก็บข้อมูลตัวอย่างเลือดและชีวสัณฐานของนกปรอดคอลายในภาคสนาม เพิ่มปริมาณยีน CHD และการใช้โมเดลทางคณิตศาสตร์เพื่อระบุเพศของนกปรอดคอลาย

การเก็บข้อมูลตัวอย่างเลือดและชีวสัณฐานภาคสนาม ข้อมูลภาคชีวสัณฐานของนกซึ่งเก็บจากนกปรอดคอลายตัวเต็มวัยทั้งสิ้น 33 ตัว โดยทำการดักนกภาคสนาม ณ เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเชียงดาว ในเดือนมีนาคม และตุลาคม 2556 โดยเก็บข้อมูลชีวสัณฐาน โดยการวัดขนาดอวัยวะของนก 5 ลักษณะ ได้แก่ ความยาวปาก ความยาวปีก ความยาวหาง ความยาวแข้ง และน้ำหนักตัว เพื่อนำข้อมูลมาใช้วิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ ร่วมกับข้อมูลการจำแนกเพศโดยใช้ยีน CHD และจากการศึกษาเบื้องต้นในภาคสนาม พบว่าไม่สามารถจำแนกเพศของนกตัวผู้และนกตัวเมียได้ เนื่องจากนกปรอดคอลายทั้งสองเพศมีลักษณะภายนอกที่ใกล้เคียงกันมาก ลักษณะสีขนของนกปรอดคอลายเป็นแบบ monomorphism ซึ่งนกในกลุ่มนี้เพศผู้และเพศเมียจะมีสีขนเหมือนกัน จนไม่สามารถสังเกตได้ด้วยตาเปล่า ตัวอย่างนกที่ลักษณะแบบนี้เช่น นกกินแมลง นกกระจิ๊ด นกเอี้ยง นกเดินดง เป็นต้น [17] วิธีการจำแนกเพศของนกกลุ่มนี้ในภาคสนามสามารถทำได้โดยการการวัดขนาด แต่เป็นวิธีที่ให้ผลไม่แม่นยำมากนัก และจำเป็นต้องให้จำนวนตัวอย่างค่อนข้างมาก ซึ่งในปัจจุบันมีการนำใช้วิธีชีวโมเลกุลมาใช้ร่วมกับวิธีการวัดขนาด ซึ่งช่วยให้การระบุเพศของนกมีความแม่นยำมากยิ่งขึ้น ยกตัวอย่างงานวิจัยที่ใช้วิธีการระบุเพศนกโดยใช้ทั้งวิธีการวัดขนาดร่วมกับวิธีชีวโมเลกุล เช่น การระบุเพศของนก Coal Tit (*Parus ater*) [20] นก Creamy-bellied thrush (*Turdus amaurochalinus*) [21] เป็นต้น

การศึกษาทางชีวโมเลกุลของนกในห้องปฏิบัติการโดยเก็บตัวอย่างเลือดจากนกทุกตัว เพื่อนำไปสกัดดีเอ็นเอเพื่อเพิ่มปริมาณยีน CHD ในห้องปฏิบัติการ โดยใช้ไพรเมอร์ P2/P8 โดยใช้ไพรเมอร์ P2/P8 [8] สามารถตรวจพบตัวอย่างที่มีโครโมโซมเพศแบบ homogametic sex

จำนวน 17 ตัวอย่าง สามารถระบุเพศเป็น "เพศผู้" และลักษณะของโครโมโซมเพศแบบ heterogametic chromosome จำนวน 16 ตัวอย่างสามารถระบุเพศเป็น "เพศเมีย" ไพร์เมอร์ที่นำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้ถูกจัดเป็น universal primers ไพรเมอร์นี้ให้ประสิทธิภาพที่ค่อนข้างดีในการเพิ่มปริมาณ DNA ในนกปรอดคอลาย และการระบุเพศสามารถทำได้ง่ายในห้องปฏิบัติ นอกจากนี้ไพรเมอร์นี้ยังสามารถใช้ได้กับนกหลายชนิด เช่น กลุ่ม non-passerines [22] วงศ์ Ciconiiformes [23] และ วงศ์ Passerines [24] ซึ่งเป็นประโยชน์อย่างยิ่งที่จะนำใช้สำหรับการระบุเพศของนกชนิดอื่น ๆ ของไทยในอนาคต

การเปรียบเทียบขนาดของยีน CHD และ DNA มาตรฐาน พบว่า ยีน CHD ที่เพิ่มได้ในการศึกษาครั้งนี้มี 2 ขนาด ได้แก่ ยีน CHD-Z ความยาวประมาณ 320 คู่เบส มีความยาวใกล้เคียงกับขนาดของยีน CHD-Z ที่พบในนกปรอด Chinese Bulbul (*P. sinensis*) และ Taiwan Bulbul (*P. taivanus*) ซึ่งมีความยาวของยีน CHD-Z ที่ 293 คู่เบส [25] เช่นเดียวกันกับยีน CHD-Z ที่พบในนกน้ำ 12 ชนิด ซึ่งมีขนาดประมาณ 300 คู่เบส [23] และยีน CHD-W ความยาวประมาณ 380 คู่เบส ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับ Chinese Bulbul (*P. sinensis*) ความยาว 380 คู่เบส, Grey-cheeked Fulvetta (*Alcippe morrisonia*) ความยาว 383 คู่เบส และ Black-throated Tit (*Aegithalos concinnus*) ความยาว 374 คู่เบส [26] ดังนั้น วิธีการชีวโมเลกุลนี้สามารถระบุเพศของนกได้รวดเร็วและสามารถยืนยันผลการทดสอบโดยการทำ PCR มากกว่าหนึ่งครั้ง และให้ผลที่แน่นอนกว่าวิธีการใช้ชีวสัณฐาน จากการทดสอบทางวิธีชีวโมเลกุลในห้องปฏิบัติการ 1 ตัวอย่างเลือดที่ใช้ทดสอบสามารถระบุเพศได้ภายในเวลา 6 ชั่วโมง ซึ่งข้อมูลเหล่านี้เป็นประโยชน์ต่อการศึกษาประชากรของนกในพื้นที่อาศัยตามธรรมชาติ และเป็นประโยชน์ต่อการศึกษานิเวศวิทยาของนกในภาคสนาม อย่างไรก็ตามวิธีการชีวโมเลกุลจำเป็นจะต้องมีการใช้ห้องปฏิบัติการ ซึ่งอาจไม่เหมาะสมต่อการศึกษากลุ่มประชากรที่อยู่ในป่าลึกและหน่วยงานซึ่งไม่มีห้องปฏิบัติการชีวโมเลกุลโดยเฉพาะ

การวิเคราะห์ความเป็นไปได้ในการใช้โมเดลทางคณิตศาสตร์เพื่อระบุเพศของนกปรอดคอลาย จากข้อมูลเพศจากการทดสอบด้วยวิธีชีวโมเลกุล และข้อมูลสัณฐานวิทยาของนกปรอดคอลายทั้งหมด 27 ตัว แยกเป็นจากนกเพศผู้ 14 ตัวอย่าง และเพศเมีย 13 ตัวอย่าง ข้อมูลชีวสัณฐานแสดงขนาดที่แตกต่างกันของนกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ 3 ลักษณะได้แก่ ความยาวปีก ความยาวปากและความยาวหาง และไม่มีความแตกต่างกัน 2 ลักษณะ ได้แก่ ความยาวแข้ง และน้ำหนักตัว โดยที่นกเพศผู้มีขนาดใหญ่กว่านกเพศเมียเล็กน้อย ดังนั้นเพื่อให้การระบุเพศเบื้องต้นในภาคสนามมีความน่าเชื่อถือมากยิ่งขึ้น จึงนำข้อมูลชีวสัณฐานมาสร้างสมการถดถอยพหุโลจิสติก (สมการ 1) เพื่อให้สามารถระบุเพศของนกปรอดคอลายได้ โดยไม่ต้องทำการทดสอบในห้องปฏิบัติการ อย่างไรก็ตามสมการดังกล่าวมีความแม่นยำร้อยละ 77.8 อาจจะเนื่องมาจากสร้างขึ้นจากกลุ่มตัวอย่างขนาดเล็ก (27 ตัวอย่าง) ซึ่งการเก็บข้อมูลชีวสัณฐานของนกในอนาคตหาก

สามารถเพิ่มจำนวนตัวอย่างให้มากขึ้น จะช่วยให้สามารถพัฒนาสมการที่มีความแม่นยำมากขึ้น และสามารถพัฒนานำไปประยุกต์ใช้ในการทำนายเพศของนกชนิดอื่นได้

ข้อเสนอแนะ

1. จากการดำเนินการวิจัยในภาคสนาม พบว่า ในช่วงที่ทำการเก็บตัวอย่างเป็นช่วงฤดูร้อนและฤดูหนาว ซึ่งอุณหภูมิบางช่วงของวันมีผลต่อกิจกรรมของนก และอุณหภูมิบางช่วงของวันร้อนมากกว่า 40 °C ซึ่งเป็นอันตรายต่อตัวนกทำให้สามารถจับนกได้ค่อนข้างน้อยและต้องหยุดจับนกหากอุณหภูมิสูง 40 °C จากงานวิจัยในครั้งนี้ พบว่าช่วงเวลาในการจับและเก็บตัวอย่างเลือดนกที่ดีที่สุดอยู่ในช่วงเวลา 6:00–12:00 น. เนื่องจากนกมีกิจกรรมค่อนข้างสูงและอุณหภูมิไม่สูงเกินไป

2. นกปรอดคอลายเป็นนกที่กินผลไม้เป็นหลัก และมีการกระจายตัวค่อนข้างสัมพันธ์กับผลไม้ในป่า ซึ่งทำให้การหาสถานที่ที่เหมาะสมในการดักจับค่อนข้างยาก หากไม่มีเจ้าหน้าที่ในพื้นที่ช่วยบอกตำแหน่ง หรือข้อมูลการกระจายตัวของพืชอาหารของนกในแต่ละฤดูกาล (ช่วงที่เก็บข้อมูล) ดังนั้นงานวิจัยในอนาคตหากต้องเก็บข้อมูลด้านประชากรของนกปรอดคอลาย จำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องทราบชนิดของอาหารของนกและการกระจายตัวของพืชอาหารหลักในป่า

3. จากการศึกษาในครั้งนี้งานในห้องปฏิบัติการค่อนข้างจะดำเนินการช้ากว่าที่กำหนดไว้ค่อนข้างมากอาจเนื่องจากปัญหาสำคัญบางประการ เช่น สภาวะของปฏิกิริยา PCR ตามที่ระบุไว้ใน Kamtaeja 2012 ไม่สามารถนำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้ได้อาจเนื่องจากสภาพของห้องปฏิบัติที่แตกต่างกัน ดังนั้น ในการศึกษาเทคนิคทางชีวโมเลกุลจากตัวอย่างที่แตกต่างกัน จำเป็นต้องมีการปรับรูปแบบของการทำ PCR เพื่อเพิ่มปริมาณยีน ให้เหมาะสมกับตัวอย่าง ซึ่งในขั้นตอนนี้ค่อนข้างจะใช้เวลาและอาศัยประสบการณ์ของผู้ทำการวิจัย ในการคิดค้นทดลอง เฟ้นหาสภาวะที่เหมาะสม เนื่องจากยังไม่มีข้อมูลในงานวิจัยด้านนี้แพร่หลายนัก และเมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมจึงจะสามารถทำการทดสอบกับตัวอย่างแบบเดียวกันได้รวดเร็วมากยิ่งขึ้นงานวิจัยชิ้นนี้จึงได้เกิดองค์ความรู้เกี่ยวกับการจำแนกเพศนกปรอดคอลายขึ้น ซึ่งจะสามารถนำไปปรับใช้กับการจำแนกเพศนกชนิดอื่น ๆต่อไปได้

4. การศึกษาเพศของนกปรอดในครั้งนี้ใช้องค์ความรู้และความเชี่ยวชาญหลายด้าน ได้แก่ ความรู้เกี่ยวกับนิเวศวิทยาของสัตว์ป่า ความรู้ด้านชีวโมเลกุล และความรู้คณิตศาสตร์ การจำแนกเพศจากการทดสอบทางชีวโมเลกุลสามารถจำแนกเพศของนกในธรรมชาติได้โดยไม่ทำลายประชากรนกปรอดคอลาย แต่ต้องอาศัยเครื่องมือเฉพาะทางในห้องปฏิบัติการ ซึ่งไม่สามารถทำได้หากต้องการระบุเพศของนกในขณะออกพื้นที่สำรวจ ในทำนองกลับกันการคำนวณโดยใช้สมการทางคณิตศาสตร์และอาศัยเพียงข้อมูลชีวสัณฐานของนกปรอดคอลายสามารถให้ผลที่รวดเร็วโดย

ไม่ต้องทดสอบในห้องปฏิบัติการ แต่ยังให้ความแม่นยำไม่มากนักจึงจำเป็นต้องใช้กลุ่มตัวอย่างขนาดใหญ่ขึ้น

เอกสารอ้างอิง

1. Kitamura S, Yumoto T, Poonswad P, Chuailua P, Plongmai K, Maruhashi T, Noma N: **Interactions between fleshy fruits and frugivores in a tropical seasonal forest in Thailand.** *Oecologia* 2002, **133**(4): 559-572.
2. Wydhayagarn C, Elliott S, Wangpakapattanawong P: **Bird communities and seedling recruitment in restoring seasonally dry forest using the framework species method in Northern Thailand.** *New Forests* 2009, **38**(1): 81-97.
3. Morinha F, Cabral JA, Bastos E: **Molecular sexing of birds: A comparative review of polymerase chain reaction (PCR)-based methods.** *Theriogenology* 2012, **78**(4): 703-714.
4. Silva KVD, Lobo-Hajdu G, Alves MAS: **Sex determination in *Turdus amaurochalinus* (Passeriformes: Muscicapidae): morphometrical analysis supported by CHD gene.** *Revista De Biologia Tropical* 2011, **59**(2): 789-794.
5. Dubiec A, Zagalska-Neubauer M: **Molecular techniques for sex identification in birds.** *Biological Letters* 2006, **43**(1): 3-12.
6. Vucicevic M, Stevanov,ÄêPavlovic M, Stevanovic J, Bosnjak J, Gajic B, Aleksic N, Stanimirovic Z: **Sex determination in 58 bird species and evaluation of CHD gene as a universal molecular marker in bird sexing.** *Zoo Biology* 2012, 32(3): 269-276.
7. Caetano LC, Ramos ES: **MHM assay: molecular sexing based on the sex-specific methylation pattern of the MHM region in chickens.** *Conservation Genetics* 2008, **9**(4): 985-987.
8. Griffiths R, Orr K: **The use of amplified fragment length polymorphism (AFLP) in the isolation of sex-specific markers.** *Mol Ecol* 1999, **8**(4): 671-674.
9. Ong H, Chinna K, Khoo S, Ng W, Wong B, Chow K, Chong L, Pillai K, Vellayan S: **Morphometric sex determination of Milky and Painted storks in captivity.** *Zoo Biology* 2012, 31(2): 219-228.

10. Wellbrock AHJ, Bauch C, Rozman J, Witte K: **Buccal swabs as a reliable source of DNA for sexing young and adult Common Swifts (*Apus apus*).** *Journal of Ornithology*: 2012, 153: 991-994.

11. Amada K: **Sex Determination using chd1 Genes in Cockatiel *Nymphicus hollandicus* by PCR Amplification of Fecal DNA.** *Ornithological Science* 2012, **11**(1): 65-68.

12. Alipanah M, Torkamanzehi A, Taghavi H: **Sex determination in ostrich (*Struthio camelus*) using DNA markers.** *Canadian Journal of Animal Science* 2010, **90**(3): 357-360.

13. Birkhead TR, Hatchwell BJ, Lindner R, Blomqvist D, Pellatt EJ, Griffiths R, Lifjeld JT: **Extra-pair paternity in the Common Murre.** *The Condor* 2001, **103**(1): 158-162.

14. Costantini V, Guaricci AC, Laricchiuta P, Rausa F, Lacalandra GM: **DNA sexing in Humboldt Penguins (*Spheniscus humboldti*) from feather samples.** *Anim Reprod Sci* 2008, **106**(1-2): 162-167.

15. Nogueira DM, Alves MA: **Iris colour as an indicator of age feature in female Brazilian tanagers (Passeriformes: Emberizidae) confirmed by a molecular sexing technique.** *Rev Biol Trop* 2008, **56**(4): 1629-1633.

16. Vali N, Doosti A: **Molecular study for the sex identification in Japanese quails (*Coturnix Japonica*).** *African Journal of Biotechnology* 2011, **10**(80): 18593-18596.

17. Lekagul B, Round P: **A guide to the birds of Thailand. 1-457.** In.: Bangkok; 1991.

18. Sambrook J, Russell DW: **Molecular cloning: a laboratory manual**, vol. 1: CSHL press; 2001.

19. Kamtaeja S, Sitasuwan N, Chomdej S, Jatisatienr A, Mennill DJ: **Species-distinctiveness in the vocal behaviour of six sympatric bulbuls (genus *Pycnonotus*) in South-East Asia.** *Emu* 2012, **112**(3): 199-208.

20. King JR, Griffiths R: **Sexual dimorphism of plumage and morphology in the Coal Tit *Paser ater*.** *Bird Study* 1994, 41: 7-14.

21. Silva KVKA, Lôbo-Hajdu G, Alves MAS: **Sex determination in *Turdus amaurochalinus* (Passeriformes: Muscicapidae): morphometrical analysis supported by CHD gene.** *Revista de Biología Tropical* 2011, 59(2): 789-794.

22. Griffiths R, Double MC, Orr K, Dawson RJG: **A DNA test to sex most birds.** *Molecular Ecology* 1998, 7: 1071-1075.

23. Tomasulo AM, Lama SND, Rocha CD: **Molecular method of sexing waterbirds without DNA extraction.** *Waterbirds* 2002, 25(2): 245-248.

24. Wang N, Li J, Liu Y, Zhang Z: **Improvement on molecular sex identification primers for Passeriform bird species.** *Chinese Birds* 2010, 1(1): 65-69.

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

26. Lee JCL, Tsai L-C, Hwa P-Y, Chan C-L, Huang A, Chin S-C, Wang L-C, Lin J-T, Linacre A, Hsieh H-M: **A novel strategy for avian species and gender identification using the CHD gene.** *Molecular and Cellular Probes* 2010, 24: 27-31.

ภาคผนวก ก.

(A)

(B)

(C)

(D)

ภาพ ก วิธีการดำเนินงานภาคสนาม: อุปกรณ์การเก็บข้อมูลภาคสนาม ตารางบันทึกข้อมูล อุปกรณ์วัดขนาด เครื่องชั่งแบบดิจิตอลและอุปกรณ์การเก็บตัวอย่างเลือด (A), วิธีการวัดความยาวปีกนกโดยการใช้ไม้บรรทัดความละเอียด 1.0 มม. (B), การเก็บตัวอย่างเลือดนก Leg bleeding technique โดยการใช้เข็มฉีดยาขนาดเล็กสะกิดเบา ๆ ที่เส้นเลือดบริเวณแข้ง (C), จากนั้นหยดเลือด (spot) ลงบนกระดาษกรองที่สะอาดแล้วเก็บตัวอย่างเลือดนั้นไว้ที่อุณหภูมิห้อง

ภาคผนวก ค.

ตาราง ค ชีวสัณฐานของนกปรอดคอลายเพศผู้จำนวน 17ตัว

Sample No.	อายุ	จำนวนแถบ DNA	ปาก (มม.)	หาง (มม.)	ปีก (มม.)	แข้ง (มม.)	น้ำหนัก (กรัม)
1	ตัวเต็มวัย	1	18.5	82.0	77.0	20.6	32.7
2	ตัวเต็มวัย	1	18.4	85.0	84.0	20.1	31.7
3	ตัวเต็มวัย	1	18.5	79.0	83.0	19.1	29.0
4	ตัวเต็มวัย	1	18.6	92.0	85.0	20.0	
5	ตัวเต็มวัย	1	18.4	85.0	79.0	19.2	27.3
6	ตัวเต็มวัย	1	18.6	90.0	86.0	20.1	32.5
7	ตัวเต็มวัย	1	18.3	90.0	84.0	20.1	30.9
8	ตัวเต็มวัย	1	17.8	83.0	78.0	19.6	27.1
9	ตัวเต็มวัย	1	17.0	86.0	82.0	19.8	28.8
10	ตัวเต็มวัย	1	18.2	85.0	82.0	19.3	30.8
11	ตัวเต็มวัย	1	19.1	82.0	81.0	19.8	27.5
12	ตัวเต็มวัย	1	18.2	80.0	82.0	19.5	25.3
13	ตัวเต็มวัย	1	18.9	87.0	80.0	19.5	33.8
14	ตัวเต็มวัย	1	18.6	88.0	83.0	19.6	35.9
15	ตัวเต็มวัย	1	19.1		83.0	19.4	32.1
16	ตัวเต็มวัย	1	19.9	86.0	83.0	20.7	
17	ตัวเต็มวัย	1	18.3	85.0	82.0	20.0	33.2

ตาราง ง ชีวสัณฐานของนกปรอดคอลายเพศเมียจำนวน 16 ตัว

Sample No.	อายุ	จำนวนแถบ DNA	ปาก (มม.)	หาง (มม.)	ปีก (มม.)	แข้ง (มม.)	น้ำหนัก (กรัม)
1	ตัวเต็มวัย	2	18.2	79.0	78.0	20.3	31.1
2	ตัวเต็มวัย	2	18.5	82.0	79.0	20.3	29.9
3	ตัวเต็มวัย	2	18.5	80.0	80.0	19.8	29.6
4	ตัวเต็มวัย	2	18.5	85.0	81.0	20.4	31.1
5	ตัวเต็มวัย	2		86.0	81.0	20.3	34.9
6	ตัวเต็มวัย	2	17.0	80.0	78.0	19.0	29.5
7	ตัวเต็มวัย	2	17.8	80.0	74.0	20.4	27.0
8	ตัวเต็มวัย	2	17.5	83.0	80.0	20.3	30.3
9	ตัวเต็มวัย	2	17.0	87.0	82.0	20.4	30.8
10	ตัวเต็มวัย	2	18.2	84.0	78.0	18.9	29.5
11	ตัวเต็มวัย	2	18.1	79.0	75.0	19.2	28.0
12	ตัวเต็มวัย	2	18.3	84.0	81.0	19.7	27.9
13	ตัวเต็มวัย	2	17.6		81.0	20.0	32.3
14	ตัวเต็มวัย	2	17.4	84.0	75.0	20.3	27.2
15	ตัวเต็มวัย	2		83.0	79.0	20.3	29.5
16	ตัวเต็มวัย	2	17.8	82.0	80.0	19.1	30.8

ประวัตินักวิจัย

นางสาว นันทนิจ จารุเศรณีย์/ Miss Nanthanit Jaruseranee

1. รหัสบัตรประจำตัวประชาชน3521000272451
2. ตำแหน่งปัจจุบัน หน่วยงานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก หมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ E-mail address

   ตำแหน่ง อาจารย์

   ที่อยู่ สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง 333 หมู่ 1 ตำบลท่าสุด อำเภอเมือง จังหวัดเชียงราย 57100

   เบอร์โทรศัพท์ : 053-916770

   E-mail : N.jaruseranee@sci.mfu.ac.th
3. ประวัติการศึกษา

   วิทยาศาสตรบัณฑิต มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ (2541-2545)

   วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ (2545-2547)

   ดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี (2547-2554)

4. ประวัติการทำงาน

   -

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ เทคโนโลยีฟาจ และ เทคนิคทางอณูชีววิทยา เทคนิค DNA cloning และ expression ใน *E.coli*)

ประวัติการนำเสนอผลงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โปรดระบุชื่อเรื่องของผลงาน ชื่อการประชุม สถานที่ วัน เวลา ตามระบบสากล

1. Montarop Yamabhai, Potjamas Pansri, Nanthnit Jaruseranee, and Suphap Emrat. Phage display technology for the study of molecular interactions. Second Protein Research Network Symposium on Proteins: Structure, Function, and Proteomics. Conference Center, Chulabhorn Research Institute, 22-23 September, 2005, Bangkok, Thailand (poster)
2. Nanthnit Jaruseranee, Potjamas Pansri, Suphap Emrat, and Montarop Yamabhai.Isolation of specific binding peptides by phage display technology. 31st

Congress on Science and Technology of Thailand 18th-20th Oct. 2005. Technopolis, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, Thaialnd.(oral)

3. Montarop Yamabhai, Sirima Sukasem, Puntarika Pesatcha, NanthnitJaruseraneeWichuda Jankangram, Surachai Rattanasuk, Suphap Emrat, Secretion of Bacillus hydrolytic enzymes in Escherichia coli expression system. 10th International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms, Prague, Czech Republic, June 24-28, 2006. (poster)
4. Jaruseranee, N., Pansri, P., Sukasam, S.and Yamabhai, M., Phage Displayed Alpha-amylase. The 11th Biological Sciences Graduate Congress "Explorations Towards the Improved Quality of Life, Sustainable Development, and Secured Future" December 15-17, 2006 Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand (oral)
5. Nanthanit Jaruseranee, Teeradech Mookum and Somboon Kamtaeja. 2013. A molecular technique for sex determination of the Stripe-throated Bulbuls (Pycnonotus finlaysoni). Thai Wildlife Seminar 34th, Kasetsart University, Bangkok. (19-20, December 2013, poster)

ประวัติการเผยแพร่ผลงานวิจัย ทั้งภายในและภายนอกประเทศ โปรดระบุชื่อเรื่องผลงาน ชื่อวารสาร ตามระบบสากล

1. M. Yamabhai, S. Emrat, S. Sukasem, P. Pesatcha, N. Jaruseranee, B. Buranabanyat, Secretion of recombinant Bacillus hydrolytic enzymes using Escherichia coli expression systems, Journal of Biotechnology 133 (1) (2008) 50-57.
2. P. Pansri, N. Jaruseranee, K. Rangnoi, P. Kristensen, M. Yamabhai, A compact phage display human scFv library for selection of antibodies to a wide variety of antigens, Vol. 9, BMC biotechnology, 2009
3. Yamabhai M, Buranabanyat B, Jaruseranee N, Songsiriritthigul C. Efficient E. coli expression systems for the production of recombinant β-mannanases and other bacterial extracellular enzymes. Bioengineered 2011; 2:45 - 49.
4. Rangnoi, Kuntalee, Jaruseranee, Nanthnit, O'Kennedy, Richard, Pansri, Potjamas, Yamabhai, Montarop, One-Step Detection of Aflatoxin-B1 Using scFv-Alkaline Phosphatase-Fusion Selected from Human Phage Display Antibody Library, Molecular Biotechnology, 2011 Volume: 49, Issue: 3, Page: 240-249

5. Feisal Khoushab, Nanthnit Jaruseranee, Waraporn Tanthanuch, Montarop Yamabhai, Formation of chitin-based nanomaterials using a chitin-binding peptide selected by phage-display, International Journal of Biological Macromolecules, Volume 50, Issue 5, 1 June 2012, Pages 1267-1274.

นาย สมบูรณ์ คำเตจา/Mr Somboon Kamtaeja

1. รหัสบัตรประจำตัวประชาชน3 5103 00110 27 8
2. ตำแหน่งปัจจุบัน หน่วยงานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก หมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ E-mail address

   ตำแหน่ง อาจารย์

   ที่อยู่ สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม 156 หมู่ 5 ต.พลายชุมพล อ.เมือง จ.พิษณุโลก 65000

   โทรศัพท์ 055-267106 ต่อ 4221

   E-mail: sbkamtaeja@gmail.com
3. ประวัติการศึกษา

   ปริญญาตรี สาขาสัตววิทยา 2541-2545 คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

   ปริญญาโท สาขาวิชาชีววิทยา 2545-2548 คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

   ปริญญาเอก สาขาวิชาชีววิทยา 2550-2555 คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
4. ประวัติการทำงาน

   -
6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

   ปักษีวิทยา, อณูชีววิทยา

ประวัติการนำเสนอผลงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โปรดระบุชื่อเรื่องของผลงาน ชื่อการประชุม สถานที่ วัน เวลา ตามระบบสากล

1. **สมบูรณ์ คำเตจา.** 2554. การสื่อสารด้วยเสียงของนกปรอดสกุล *Pycnonotus*. งานสัมมนาสัตว์ป่าเมืองไทย ครั้งที่ 32 (นำเสนอผลงานทางวาจา).
2. **Kamtaeja S.**2012. Stripe-throated Bulbul, Pycnonotus finlaysoni, moults in favorable climatic conditions. Association for Tropical Biology & Conservation, Asia-Pacific chapter conference, Xishuangbanna, China (poster).

3. Nanthanit Jaruseranee, Teeradech Mookum and Somboon Kamtaeja. 2013. A molecular technique for sex determination of the Stripe-throated Bulbuls (Pycnonotus finlaysoni). Thai Wildlife Seminar 34th, Kasetsart University, Bangkok. (19-20, December 2013, poster)

ประวัติการเผยแพร่ผลงานวิจัย ทั้งภายในและภายนอกประเทศ โปรดระบุชื่อเรื่องผลงาน ชื่อวารสาร ตามระบบสากล

1. จันจิรา เดียวเจริญ, ภัททิรา ตาคำ, และ **สมบูรณ์ คำเตจา**. 2557. ความต้องการทางนิเวศวิทยาของนกปรอดสองชนิดบนต้นสะเดา. Ecological Niche of Two Sympatric Bulbuls Studying on Neems Trees. รายงานสืบเนื่องจากการประชุมวิชาการระดับชาติ "พิบูลสงครามวิจัย" และนิทรรศการ "การพัฒนาศักยภาพการท่องเที่ยว" จากท้องถิ่นสู่อาเซียน 2557. หน้า 406-412. (proceeding).
2. ธีระศักดิ์ ใจมิภักดิ์, **สมบูรณ์ คำเตจา**, สวัสดิ์ สนิทจันทร์ และ นริทธิ์ สีตะสุวรรณ. 2556. การสื่อสารด้วยเสียงของนกแต้วแล้วธรรมดา (*Pitta moluccensis*). วารสารสัตว์ป่าเมืองไทยม, ปีที่ 20, ฉบับที่ 1, หน้า 83-96.
3. พิมสุดา อาษารบ, สุนิษา แก้วฟู, และ**สมบูรณ์ คำเตจา**. 2556. การใช้ประโยชน์จากพื้นที่นาข้าวมีผลต่อนกกินเมล็ดพืชหรือไม่? สิ่งแวดล้อมนเรศวร ครั้งที่ 9, 204-210. (proceeding).
4. เมริน รอมทรัพย์, วิภาพร เชื้อเถาว์, สุพรรษา ทองดอนย้อย และ**สมบูรณ์ คำเตจา**. 2556. การสำรวจความหนาแน่นของประชากรนกยางในพื้นที่นาข้าว. สิ่งแวดล้อมนเรศวร ครั้งที่ 9, 198-202 (proceeding).
5. **Kamtaeja S**, Sitasuwan N, Chomdej S, Jatisatienr A, and Mennill D.J. 2012. Species-distinctiveness in the vocal behaviour of six sympatric bulbuls (genus *Pycnonotus*) in Southeast Asia. Emu, 112 (3), 199-208.
6. นุชจรีย์ สิงคราช **สมบูรณ์ คำเตจา** และนริทธิ์ สีตะสุวรรณ. 2552. ความสัมพันธ์ระหว่างนกกินปลีท้ายทอยน้ำเงิน (*Hypogramma hypogrammicum*) และตองแตบ (*Macaranga denticulata* (Bl.) M.-A.). วารสารสัตว์ป่าเมืองไทย ปีที่ 16, หน้า 62-71.
7. ฉัตรมงคล สุวรรณภูมิ, วีระ วงค์คำ, ชิตชล ผลารักษ์, ทัตพร คุณประเสริฐ, เอกพจน์ เจริญศิริวงศ์ธนา, ศานิต ปิยพัฒนากร, **สมบูรณ์ คำเตจา**, วารณี ประดิษฐ์ และสิริวดี ชมเดช. 2552. การใช้ไมโครแซทเทลไลท์ 7 ตำแหน่งในการศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมในธรรมชาติของกบทูด *Limnonectes blythii*ระหว่างประชากรในจังหวัดแม่ฮ่องสอน และประเทศพม่า. วารสารการประชุมสภาวะโลกร้อน, หน้า 239-246.

นาย ธีรเดช หมูคำ (MR THEERADECH MOOKUM)

1. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3580300127669

2. ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์ประจำ

3. อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง 333 หมู่ 1 ต. ท่าสุด อ. เมือง จ. เชียงราย 57100 หมายเลขโทรศัพท์มือถือ 089-9986269 โทรสาร 053916776
   E-mail: theeradech@mfu.ac.th

4. ประวัติการศึกษา ต้องระบุสถาบันการศึกษา สาขาวิชาและปีที่จบการศึกษา

คุณวุฒิ	สาขาวิชา	สถาบัน	ปีที่จบ
ปริญญาเอก	คณิตศาสตร์	มหาวิทยาลัยมหิดล	2010
ปริญญาโท	คณิตศาสตร์ประยุกต์	มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	2004
ปริญญาตรี	คณิตศาสตร์	มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	2002

5. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ
   - Mathematical modeling of two-fluid flow and heat transfer.
   - Mathematical modeling of electromagnetic field.

ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ
งานวิจัยที่กำลังทำ: ชื่อข้อเสนอการวิจัย การพัฒนาเตาเผาเซรามิกประหยัดพลังงานสำหรับโครงการหนึ่งตำบลหนึ่งผลิตภัณฑ์ แหล่งทุน วช
สถานภาพในการทำวิจัยว่า กำลังดำเนินการ

งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : *(เฉพาะเผยแพร่ในวารสารวิชาการ peer reviewed ไม่เกิน 5 ปี)*

1. Mookum T, Wiwatanapataphee B, Wu YH. Turbulent Flow and Heat Transfer Problem in the Electromagnetic Continuous Casting Process.INTERNATIONAL JOURNAL OF MATHEMATICS AND COMPUTERS IN SIMULATION. 2011;5(4):310-317.

2. Wiwatanapataphee B., Mookum T., Wu Y.H., Numerical simulation of two-fluid flow and meniscus interface movement in the electromagnetic continuous steel casting process, Discrete and Continuous Dynamical Systems - Series B, 2011, 16(4): 1171-1183.
3. Mookum T, Wiwatanapataphee B, Wu YH. MODELING OF TWO-FLUID FLOW AND HEAT TRANSFER WITH SOLIDIFICATION IN CONTINUOUS STEEL CASTING PROCESS UNDER ELECTROMAGNETIC FORCE. International Journal of Pure and Applied Mathematics. 2010;63(2):183-95.
4. Mookum T, Wiwatanapataphee B, Wu YH. NUMERICAL SIMULATION OF THREE-DIMENSIONAL FLUID FLOW AND HEAT TRANSFER IN ELECTROMAGNETIC STEEL CASTING.International Journal of Pure and Applied Mathematics. 2009;52(3):373-90.

การนำเสนอผลงานในที่ประชุมทางวิชาการระดับนานาชาติ

1. Mookum T., Hossain M.M.T., Wiwatanapataphee B, Wu YH. Numerical Simulation of three-Dimension Fluid Flow and Heat Transfer in the Electromegnetic Streel Casting Process.Proceeding of International Symposium on Applied Computing and Computational Sciences, 1-3 August 2008, Hong Kong China.
2. Mookum T, Wiwatanapataphee B, Wu YH. The Effect of Turbulence on Two-Fluid Flow and Heat Transfer in Continuous Steel Casting Process. Proceedings of the 4thWSEAS International Conference on Finite Differences - Finite Elements - Finite Volumes - Boundary Elements. 2011;53-6.
3. Nanthanit Jaruseranee, Teeradech Mookum and Somboon Kamtaeja. 2013. A molecular technique for sex determination of the Stripe-throated Bulbuls (Pycnonotus finlaysoni). Thai Wildlife Seminar 34th, Kasetsart University, Bangkok. (19-20, December 2013, poster)