



## โครงการ

# การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

**ชื่อโครงการ** การตรวจสอบการผสมข้ามสายพันธุ์ระหว่างนกกาบบัวและนกระสาปากเหลือง  
โดยใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ  
Identification of hybrids of painted stork and milky stork  
using DNA fingerprint

**ชื่อนิสิต** นายกฤตธี เปี่ยมสง่า **เลขประจำตัว** 5832004023

**ภาควิชา** ชีววิทยา

**ปีการศึกษา** 2561

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการวิจัย	: การตรวจสอบการผสมข้ามสายพันธุ์ระหว่างนกกาบบัว และนกกระสาปากเหลืองโดยใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ
นิสิตผู้ดำเนินโครงการ	: นายกฤตธี เปี่ยมสง่า
อาจารย์ที่ปรึกษา	: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อัมพร วิเวกแก้ว
ภาควิชา	: ชีววิทยา

---

### บทคัดย่อ

การผสมข้ามสายพันธุ์ คือการผสมพันธุ์ระหว่างสิ่งมีชีวิตที่มีความใกล้ชิดกันทางวิวัฒนาการ และมีกลไกแบ่งแยกทางการสืบพันธุ์ไม่สมบูรณ์ ซึ่งลูกผสมที่เกิดขึ้นอาจเป็นตัวกลางในการถ่ายเท เคลื่อนย้ายยีนระหว่างประชากรของสิ่งมีชีวิตทั้งสองชนิดได้ การศึกษาเกี่ยวกับการผสมข้ามสายพันธุ์ ในสัตว์ปีก โดยเฉพาะในกลุ่มนกน้ำที่มีความเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์นั้นพบได้ค่อนข้างจำกัด การศึกษา ก่อนหน้าพบการผสมข้ามสายพันธุ์ระหว่างนกกาบบัวและนกกระสาปากเหลืองในสภาพกรงเลี้ยงในประเทศไทยมาเลเซียและสิงคโปร์ ดังนั้นในการศึกษานี้จึงสนใจใช้เทคนิคทางด้านชีวโมเลกุลมา ตรวจสอบการผสมข้ามสายพันธุ์ระหว่างนกทั้งสองชนิดนี้ในประเทศไทย โดยเก็บตัวอย่างเลือดของนกกาบบัวจำนวน 174 ตัว จากสวนสัตว์ดุสิต กรุงเทพมหานคร และนกกระสาปากเหลืองจำนวน 49 ตัว จากสวนสัตว์นครราชสีมา จังหวัดนครราชสีมา จากนั้นสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือดที่เก็บมาทั้งหมด เพิ่มปริมาณนิวเคลียร์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) โดยใช้ไพรเมอร์ LR7 และวิเคราะห์ผลลายพิมพ์ดีเอ็นเอของทุกตัวอย่างด้วยวิธี gel electrophoresis และ genotyping ผลการศึกษาพบอัลลีลจำนวน 122 และ 115 อัลลีล ในจีโนมของนกกาบบัวและนกกระสาปากเหลือง ตามลำดับ และพบอัลลีลที่มีความจำเพาะและสามารถใช้ระบุชนิดของนกกระสาปากเหลืองได้จำนวน 2 อัลลีล ได้แก่ อัลลีลที่มีขนาด 1055 และ 1077 คู่เบส และเมื่อตรวจสอบอัลลีลทั้งหมดในกลุ่มของนก intermediate ที่มีลักษณะคล้ายนกกาบบัว ก็พบอัลลีลที่จำเพาะต่อนกกระสาปากเหลืองในจีโนมของนก intermediate เหล่านั้น ผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าการผสมข้ามสายพันธุ์ระหว่างนกกาบบัวและนกกระสาปากเหลืองในสภาพกรงเลี้ยงในประเทศไทย

**คำสำคัญ:** การถ่ายเทเคลื่อนย้ายยีน, การผสมกลับ, กลไกแบ่งแยกทางการสืบพันธุ์, นกน้ำ, วงศ์นกกระสา

---

**Research title** : Identification of hybrids of painted stork and milky stork using DNA fingerprint  
**Student name** : Mr. Krittee Piamsanga  
**Advisor** : Asst. Prof. Dr. Amporn Wiwegweaw  
**Department** : Biology

---

### Abstract

Hybridization is a mating between incompletely reproductive isolating species. As a consequence, introgression or gene flow of genetic materials between populations may occur through backcrossing process. In birds, especially endangered wading birds, study of introgressive hybridization is rarely reported. Previous studies have revealed the occurrence of interspecific hybridization between painted stork (*M. leucocephala*) and milky stork (*M. cinerea*) in captivities in Malaysia and Singapore. This study therefore aimed to assess possible hybridization between these bird species in Thailand by using molecular techniques. Blood samples of painted (n = 174) and milky storks (n = 49) were individually collected from Dusit Zoo, Bangkok and Nakhon Ratchasima Zoo, Nakhon Ratchasima Province, respectively. Genomic DNA was extracted from blood samples of all collected storks and DNA fingerprinting was performed for genotyping all stork individuals using LR7 marker via Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD) technique. Based on gel electrophoresis and genotyping analyses, the total numbers of 122 and 115 alleles were found in genomes of painted and milky storks, respectively. Of these, 2 alleles (1055 and 1070 bp) are unique to milky stork and are considered to be diagnostic markers for species identification. Moreover, the detection of these diagnostic alleles in intermediate individuals would indicate the historical hybridization between these two species in captivity.

**Keywords:** Introgression, backcross, reproductive isolation, wading birds, Ciconiidae

---

## กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาในครั้งนี้จะไม่สามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ หากปราศจากความร่วมมือและความช่วยเหลืออย่างดียิ่งจากบุคคลหลายท่านดังนี้

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อัมพร วิเวกแก้ว อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ ผู้ที่คอยให้คำปรึกษาและให้ความช่วยเหลือในการจัดทำโครงการนี้ เป็นผู้สอนเทคนิคและให้ความรู้ด้านเทคนิคการปฏิบัติการในห้องทดลอง เทคนิคทางด้านชีววิทยาโมเลกุล และการเขียนรายงานผลการศึกษา รวมถึงสนับสนุนและให้ความช่วยเหลือในส่วนการออกภาคสนาม

ขอกราบขอบพระคุณสัตวแพทย์หญิง เสาวภางศ์ สนั่นหนู ทีมสัตวแพทย์ และเจ้าหน้าที่สวนสัตว์ดุสิตและสวนสัตว์นครราชสีมา ที่คอยให้ความช่วยเหลือตลอดการเก็บตัวอย่างเพื่อนำมาใช้วิจัยในการศึกษาครั้งนี้

ขอขอบคุณนางสาวรังสิณี สันคมที่คอยให้ความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างในการออกภาคสนาม รวมถึงให้คำปรึกษาและถ่ายทอดทักษะเกี่ยวกับเทคนิคที่ใช้ในห้องปฏิบัติการทางด้านชีววิทยาโมเลกุล ในขั้นตอนต่างๆ ตลอดการทำงานวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณเพื่อนๆและสมาชิกจากห้องปฏิบัติการ Vertebrate Population Genetics and Conservation ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่คอยช่วยเหลือและให้คำปรึกษาตลอดระยะเวลาการดำเนินงาน

ขอขอบพระคุณบิดา มารดา และครอบครัวที่ให้การสนับสนุนในทุกๆ ด้านโดยเฉพาะอย่างยิ่งด้านการศึกษา ที่ทำให้โครงการนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณองค์การสวนสัตว์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ ที่เอื้อเฟื้อสถานที่สำหรับการเก็บตัวอย่าง และอนุญาตให้ใช้สัตว์สำหรับการวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ภาควิชาชีววิทยา และคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่สนับสนุนเงินทุนสำหรับการทำโครงการในครั้งนี้

## สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ .....	ข
กิตติกรรมประกาศ .....	ค
สารบัญ.....	ง
สารบัญตาราง.....	จ
สารบัญภาพ.....	ช
บทที่ 1 บทนำ .....	1
1.1 ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจในการนำเสนอโครงการ .....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ.....	3
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม .....	8
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงาน.....	10
3.1 แผนการศึกษา.....	10
3.1.1 การขออนุญาตเก็บตัวอย่าง.....	10
3.1.2 พื้นที่ศึกษาและสถานที่เก็บตัวอย่าง .....	10
3.1.3 การเก็บตัวอย่าง .....	12
3.1.4 ขั้นตอนการดำเนินงานในห้องปฏิบัติการ .....	15
3.1.4.1 การสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสารเคมีสำเร็จรูป.....	15
3.1.4.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction; PCR) .....	16
3.1.4.3 การตรวจสอบขนาดของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis .....	17
3.1.4.3.1 ไพรเมอร์ D-03.....	17
3.1.4.3.2 ไพรเมอร์ LR7 .....	17
3.1.4.4 การทำ fragment analysis ด้วยวิธี GeneScan.....	18
บทที่ 4 ผลการทดลอง .....	19
4.1 ผลการสกัดดีเอ็นเอ.....	19

4.2 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายและการตรวจสอบขนาดของ RAPD fragment ด้วยวิธี gel electrophoresis.....	19
4.2.1 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ D-03.....	19
4.2.2 ผลจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ LR7.....	27
4.3 ผลการทำ genotyping ด้วยวิธี Genescan .....	39
บทที่ 5 วิจัยรณัผลการทดลอง .....	54
สรุปผลการศึษา.....	56
เอกสารอ้างอิง .....	57

## สารบัญตาราง

ตารางที่ 1	ขนาดของ RAPD fragment ในจีโนมของนกกาบบัวจำนวน 123 ตัวอย่าง ที่เพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ D-03.....	22
ตารางที่ 2	ขนาดของ RAPD fragment ในจีโนมของนกกระสาปากเหลืองจำนวน 31 ตัวอย่าง ที่เพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ D-03.....	26
ตารางที่ 3	ขนาดของ RAPD fragment ในจีโนมของนกกาบบัวจำนวน 170 ตัวอย่าง ที่เพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ LR7 .....	31
ตารางที่ 4	ขนาดของ RAPD fragment ในจีโนมของนกกระสาปากเหลืองจำนวน 49 ตัวอย่าง ที่เพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ LR7 .....	37
ตารางที่ 5	รายชื่อตัวอย่างที่ส่งไปหาขนาดของอัลลีลที่โลคัส LR7 ที่ด้วยวิธี Genescan.....	40
ตารางที่ 6	ขนาดของอัลลีลทั้งหมดที่โลคัส LR7 ของนกที่มีลักษณะสัญญาณภายนอก คล้ายนกกาบบัวพันธุ์แท้ .....	41
ตารางที่ 7	ขนาดของอัลลีลทั้งหมดที่โลคัส LR7 ของนกที่มีลักษณะสัญญาณภายนอก คล้ายนกกาบบัวพันธุ์ผสม.....	44
ตารางที่ 8	ขนาดของอัลลีลทั้งหมดที่โลคัส LR7 ของนกที่มีลักษณะสัญญาณภายนอก คล้ายนกกระสาปากเหลืองพันธุ์แท้และพันธุ์ผสม .....	49
ตารางที่ 9	การเปรียบเทียบขนาดอัลลีลทั้งหมดของโลคัส LR7 ระหว่างนกทั้ง 4 กลุ่ม.....	52

## สารบัญภาพ

ภาพที่ 1	ลักษณะสัณฐานภายนอกของนกกาบบัวและนกกระสาปากเหลืองที่ยังไม่โตเต็มวัย.....	4
ภาพที่ 2	ลักษณะสัณฐานภายนอกต่างๆ ของนกกาบบัวที่โตเต็มวัย .....	5
ภาพที่ 3	ลักษณะสัณฐานภายนอกต่างๆ ของนกกระสาปากเหลืองที่โตเต็มวัย .....	6
ภาพที่ 4	นกที่มีลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกกำลังระหว่างนกกาบบัวและนกกระสาปากเหลือง ที่พบในพื้นที่สวนสัตว์ดุสิต (รูปกลาง และรูปด้านล่าง).....	7
ภาพที่ 5	นกกาบบัวที่เพาะเลี้ยงไว้ในกรงเลี้ยงที่มีลักษณะปิดในพื้นที่สวนสัตว์ดุสิต .....	11
ภาพที่ 6	นกกระสาปากเหลืองที่เพาะเลี้ยงไว้ในกรงเลี้ยงที่มีลักษณะปิด ในพื้นที่สวนสัตว์นครราชสีมา.....	11
ภาพที่ 7	เจ้าหน้าที่สวนสัตว์จับนกกระสาปากเหลืองออกมาจากกรงเลี้ยง.....	12
ภาพที่ 8	การชั่งน้ำหนักนกเพื่อนำมาใช้คำนวณปริมาตรสำหรับการเก็บตัวอย่างเลือด .....	13
ภาพที่ 9	ห้วงหมายเลขที่นำมาใส่ขานกสำหรับระบุหมายเลขประจำตัวนก .....	13
ภาพที่ 10	สถานีที่ใช้บันทึกภาพถ่ายลักษณะสัณฐานภายนอกของนก (ก) และลักษณะสัณฐานภายนอกต่างๆ 5 ลักษณะได้แก่ (ข) สีขนบริเวณลำตัว, (ค) ขนสีชมพูบริเวณโคนปีก, (ง) แถบขนสีดำบริเวณอก, (จ) ความเป็นระเบียบของขนสีดำบนปีก และ (ฉ) สีขนคลุมขอบปีก ที่ได้ทำการบันทึกไว้สำหรับการวิเคราะห์ข้อมูลทางด้านการสัณฐานวิทยา.....	14
ภาพที่ 11	การเก็บตัวอย่างเลือดนกโดยเจาะเลือดบริเวณ subclavian vein ใต้ปีกนก (ซ้าย) หลอดไมโครเซนตริฟิวซ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตรสำหรับเก็บตัวอย่างเลือด (ขวา) .....	15
ภาพที่ 12	ตัวอย่างเลือดที่หยดบนกระดาษกรองเพื่อใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ.....	15
ภาพที่ 13	ชุดอุปกรณ์สำหรับทำ agarose gel electrophoresis .....	18
ภาพที่ 14	การตรวจสอบขนาดของ RAPD fragment ที่เพิ่มปริมาณด้วยไพโรเมอร์ D-03 ด้วย 1% agarose gel electrophoresis ที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที ของนกกาบบัวตัวอย่างที่ 1-62.....	20
ภาพที่ 15	การตรวจสอบขนาดของ RAPD fragment ที่เพิ่มปริมาณด้วยไพโรเมอร์ D-03 ด้วย 1% agarose gel electrophoresis ที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที ของนกกาบบัวตัวอย่างที่ 63-125 .....	21
ภาพที่ 16	การตรวจสอบขนาดของ RAPD fragment ที่เพิ่มปริมาณด้วยไพโรเมอร์ D-03 ด้วย 1% agarose gel electrophoresis ที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที ของนกกระสาปากเหลืองตัวอย่างที่ 1-31 .....	25



- ภาพที่ 17** การตรวจสอบขนาดของ RAPD fragment ที่เพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ LR7 ด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis ที่ 75 โวลต์ เป็นเวลา 95 นาที ของนกกาบบัวตัวอย่างที่ 1-30, 32-45 และ 47-64..... 28
- ภาพที่ 18** การตรวจสอบขนาดของ RAPD fragment ที่เพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ LR7 ด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis ที่ 75 โวลต์ เป็นเวลา 95 นาที ของนกกาบบัวตัวอย่างที่ 65-86, 88-117, 119-127 และ 129..... 29
- ภาพที่ 19** การตรวจสอบขนาดของ RAPD fragment ที่เพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ LR7 ด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis ที่ 75 โวลต์ เป็นเวลา 95 นาที ของนกกาบบัวตัวอย่างที่ 130-138, 140, 142-169 และ 171-178 ..... 30
- ภาพที่ 20** การตรวจสอบขนาดของ RAPD fragment ที่เพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ LR7 ด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis ที่ 75 โวลต์ เป็นเวลา 95 นาที ของนกกระสาปากเหลืองตัวอย่างที่ 1-49 ..... 36

## บทที่ 1 บทนำ

### 1.1 ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจในการนำเสนอโครงการ

การผสมข้ามสายพันธุ์ (hybridization) คือการผสมพันธุ์ระหว่างสิ่งมีชีวิตที่มีความใกล้ชิดกันทางวิวัฒนาการที่มีโครงสร้างทางพันธุกรรมแตกต่างกัน เช่น การผสมพันธุ์ระหว่างสิ่งมีชีวิตที่อยู่ในวงศ์หรือสกุลเดียวกัน โดยปกติสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดจะมีกลไกการแบ่งแยกทางการสืบพันธุ์ ทำหน้าที่ป้องกันไม่ให้สิ่งมีชีวิตต่างชนิดกันผสมพันธุ์กันได้ หรือหากผสมพันธุ์กันได้ก็ไม่สามารถให้กำเนิดลูกผสมได้ หรือให้กำเนิดลูกผสมที่เป็นหมัน (Futuyma, 1997) โดยกลไกการแบ่งแยกทางการสืบพันธุ์นี้สามารถเกิดขึ้นได้ทั้งก่อนการเกิดการปฏิสนธิ (prezygotic reproductive isolation) หรือ/และหลังปฏิสนธิ (postzygotic reproductive isolation) (Futuyma, 1997) แต่ในบางกรณีกลไกการแบ่งแยกทางการสืบพันธุ์นี้อาจจะไม่สมบูรณ์ ดังนั้นหากสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกันมีการกระจายตัวทับซ้อนกันหรือเข้ามาอาศัยอยู่ในพื้นที่เดียวกัน ก็อาจจะมีโอกาสเสี่ยงที่จะผสมข้ามสายพันธุ์ได้ (Arnold, 1997, 2006) ปัจจุบันมีรายงานเกี่ยวกับการเกิดการผสมข้ามสายพันธุ์ในสัตว์มีกระดูกสันหลังในธรรมชาติเป็นจำนวนมากเช่น ในปลา (Hubbs, 1955) สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Fitzpatrick, 2004) รวมถึงในนกด้วย ยกตัวอย่างเช่น การผสมพันธุ์ระหว่างนก golden-winged warbler *Vermivora chrysoptera* กับนก blue-winged warbler (*V. cyanoptera*) และระหว่างไก่ฟ้า *Phasianus colchicus* กับไก่บ้าน *Gallus gallus domesticus* (Audubon, 2013) นอกจากนี้ในนกน้ำที่มีลำตัวขนาดใหญ่ เช่น นกกาบบัว *Mycteria leucocephala* และนกกระสาปากเหลือง *M. cinerea* ก็มีรายงานพบความเป็นไปได้ในการเกิดการผสมข้ามสายพันธุ์ (Yee et al., 2013)

นกกาบบัว (painted stork) และนกกระสาปากเหลือง (milky stork) จัดเป็นนกน้ำขนาดใหญ่ในวงศ์ Ciconiidae มีการกระจายพันธุ์ในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น ในประเทศกัมพูชา อินโดนีเซีย มาเลเซีย และไทย สามารถพบได้บริเวณพื้นที่ชุ่มน้ำต่างๆ เช่น บริเวณที่ลุ่มน้ำจืด ทุ่งนา ริมชายฝั่ง ทะเลสาบ และป่าชายเลน โดยจะหากินสัตว์น้ำที่อยู่บริเวณนั้น เช่น ปลา กุ้ง หอย ปู กบ เขียด ด้วยการอ้าปากแช่ไว้ในน้ำ เมื่อเหยื่อเคลื่อนที่ผ่านบริเวณปากจะจับเหยื่อทันทีแล้วขบซ้ำจนกว่าเหยื่อจะตาย หรือใช้จะงอยปากจุ่มลงไปจิกเหยื่อทันที ในช่วงฤดูผสมพันธุ์นกกาบบัวและนกกระสาปากเหลืองจะมีการจับคู่ผสมพันธุ์เพียงคู่เดียวเท่านั้น (monogamy) โดยมักจะสร้างรังแบบง่ายๆ แต่แข็งแรงเพื่อเตรียมพร้อมสำหรับลูก ซึ่งรังที่สร้างมักอยู่บนยอดของต้นไม้ที่สูงประมาณ 6-9 เมตร ด้วยการใช้กิ่งไม้ที่สามารถหาได้จากบริเวณใกล้เคียงมาวางซ้อนกันเป็นแอ่งคล้ายกับรังนกทั่วไป โดยทั่วไปนกทั้งสองชนิดนี้สามารถวางไข่ได้ถึง 1-4 ฟองต่อรอบ ใช้เวลาฟักไข่ประมาณ 4 สัปดาห์ ซึ่งระหว่างที่ยังเป็นลูกนกที่พึ่งฟักออกมาจากไข่ พ่อนกและแม่นกยังคงต้องหาอาหารและเลี้ยงดูลูกนกอยู่ (parental care) เช่น ในวันที่อากาศร้อนจะกางปีกออกเพื่อให้แสงบังลูกนก หรือผลัดกันเฝ้ารังเพื่อป้องกันศัตรูที่จะมากินลูกนก หลังจากนั้น 6-7 สัปดาห์ ลูกนกจึงเริ่มบินออกจากรัง (thainationalparks, 2019 a) ในช่วงที่ยังไม่โตเต็มวัยนกสองชนิดนี้จะมีลักษณะสัณฐานภายนอกที่คล้ายคลึงกันมาก โดยขนบนลำตัวจะมีสีน้ำตาลอ่อน ขนตรงส่วนคอมีลายตามขอบสีดำ และไม่มีลายแถบคาดบนส่วนอก (zoothailand, 2019) (ภาพที่ 1) ซึ่งทำให้ยากต่อการระบุชนิด แต่เมื่อโตเต็มวัย

แล้วนกกาบบัว มีขนาดลำตัวประมาณ 93-102 เซนติเมตร เมื่อกางปีกจะมีความยาวประมาณ 150-160 เซนติเมตร น้ำหนักประมาณ 2-3.5 กิโลกรัม ตัวผู้และตัวเมียมีลักษณะที่คล้ายกัน แต่ตัวผู้มักจะมีขนาดใหญ่กว่าตัวเมีย (thainationalparks, 2019 a) มีปากยาวสีเหลืองเมื่อโตเต็มวัย ปลายปากมักมนและโค้งเล็กน้อย ลำตัวสีขาว หัวเล็ก คอค่อนข้างยาว ปีกกว้างและยาว บริเวณปีกมีแถบสีขาวสลับดำ ออกและปลายหางมีแถบสีดำ ขนโคนปีก ขนคลุมขนปีกแฉวนอก และขนบริเวณโคนหางเป็นสีชมพู (จารุจินต์ นภิตะภัก, 2555) (ภาพที่ 2) สามารถพบการกระจายพันธุ์ของนกกาบบัวในประเทศกัมพูชา ภูฏาน บังกลาเทศ อินเดีย ลาว พม่า เนปาล ปากีสถาน ศรีลังกา เวียดนาม และไทย ปัจจุบันจัดอยู่ในสถานภาพใกล้ถูกคุกคาม (near threatened) (IUCN, 2016 a) ส่วนนกกกระสาปากเหลืองนั้นมีขนาดลำตัวประมาณ 91-95 เซนติเมตร (thainationalparks, 2019 b) ซึ่งถือได้ว่ามีรูปร่างและสีสันทคล้ายกับนกกาบบัว แต่ขนลำตัวขาว ขนปีกบินและหางดำ ไม่มีสีชมพูที่โคนหางและไม่มีแถบออกและขนสีขาวสลับดำที่ขนคลุมใต้ปีกเหมือนนกกาบบัว หนึ่งเป็ลี่ยบริเวณหัวพื้นที่น้อยกว่าและมีสีแดงคล้ำ (จารุจินต์ นภิตะภัก, 2555) (ภาพที่ 3) นกกกระสาปากเหลืองมีการกระจายพันธุ์ในประเทศกัมพูชา อินโดนีเซีย และมาเลเซีย ในประเทศไทย นกกกระสาปากเหลืองจัดเป็นนกที่พบเจอได้ยากในธรรมชาติ ส่วนใหญ่เป็นนกอพยพหรือหนีจากการเลี้ยงมาอาศัยอยู่ในธรรมชาติ โดยมักพบนกกกระสาปากเหลือง 1-2 ตัวปะปนร่วมกับฝูงนกกาบบัวในบริเวณที่นกทั้งสองชนิดนี้มีพื้นที่การกระจายตัวทับซ้อนกัน ปัจจุบัน ICUN red list จัดให้นกกกระสาปากเหลืองอยู่ในสถานะใกล้สูญพันธุ์ (endangered) (IUCN, 2016 b) เนื่องจากแหล่งที่อยู่อาศัยถูกทำลายหรือถูกรบกวนโดยมนุษย์ รวมทั้งถูกล่าสำหรับเป็นอาหารและเพื่อการซื้อขายอีกด้วย ส่งผลให้จำนวนประชากรลดลงอย่างรวดเร็วอย่างต่อเนื่อง นอกจากนี้ จากการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของนกในวงศ์ Ciconiidae พบว่านกกาบบัวมีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้ชิดกับนกกกระสาปากเหลืองมากที่สุด (Slikas, 1997)

ประเทศไทยเป็นอีกประเทศหนึ่งที่มีการเพาะเลี้ยงและขยายพันธุ์นกทั้งสองชนิดนี้หรือชนิดใดชนิดหนึ่งในสภาพกรงเลี้ยงในพื้นที่สวนสัตว์ต่างๆ เช่น สวนสัตว์ดุสิต สวนสัตว์เชียงใหม่ สวนสัตว์นครราชสีมา สวนสัตว์ขอนแก่น จากข้อมูลพบว่า ในอดีตช่วงปี พ.ศ. 2541 ถึงปี พ.ศ. 2557 ทางสวนสัตว์ดุสิตได้มีการเพาะเลี้ยงและขยายพันธุ์นกทั้งสองชนิดนี้ไว้ด้วยกัน (ปัจจุบันทางสวนสัตว์ได้ย้ายนกกกระสาปากเหลืองไปเพาะเลี้ยงที่สวนสัตว์นครราชสีมาแทน) โดยเลี้ยงไว้ในกรงขนาดใหญ่ที่มีพื้นที่เปิดบริเวณเดียวกัน จึงทำให้นกทั้งสองชนิดนี้สามารถพบเจอกันได้ ประกอบกับจากการสำรวจเบื้องต้นของเจ้าหน้าที่ที่สวนสัตว์ดุสิต พบว่ามีนกบางตัวในฝูงของนกกาบบัวที่เพาะเลี้ยงที่สวนสัตว์ดุสิตมีลักษณะสัณฐานวิทยานอกก้ำกึ่ง (intermediate) (ภาพที่ 4) ระหว่างนกกาบบัวและนกกกระสาปากเหลือง กล่าวคือมีสีขนบริเวณลำตัวที่ไม่ชัดเจน ขนบริเวณโคนปีกมีสีชมพูอ่อนหรือไม่มี มีแถบขนสีดำบริเวณอกไม่ชัดเจน และมีสีขนคลุมขอบปีกที่ไม่ชัดเจน แต่ด้วยลักษณะสัณฐานวิทยานอกเพียงอย่างเดียวไม่สามารถระบุได้แน่ชัดว่านกดังกล่าวควรจัดเป็นนกกาบบัวหรือนกกกระสาปากเหลือง ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่านกที่มีลักษณะก้ำกึ่งดังกล่าวอาจเป็นลูกผสมระหว่างนกทั้งสองชนิด ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงสนใจที่จะนำเทคนิคทางด้านชีววิทยาโมเลกุล (nuclear DNA) มาใช้วิเคราะห์ร่วมกับข้อมูลทางด้านสัณฐานวิทยา เพื่อระบุชนิดและตรวจสอบการผสมข้ามสายพันธุ์ระหว่างนกกาบบัวและนกกกระสาปากเหลือง โดยส่วนของ nuclear DNA นั้นจะใช้เทคนิคลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) ในการตรวจสอบ เนื่องจากดีเอ็นเอเป็นสารพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายทอดมาจากพ่อและ

แม้ มีลักษณะเฉพาะและไม่สามารถเปลี่ยนแปลงได้ โดยสิ่งมีชีวิตแต่ละตัวจะมีสารพันธุกรรมที่ไม่เหมือนกัน (ยกเว้นกรณีแฝดไข่เดียวกัน) ซึ่งการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอในสิ่งมีชีวิตแต่ละตัว (ชนิด) นั้นสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนหรือชิ้นส่วนดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตที่สนใจโดยตรง แต่เนื่องจากวิธีนี้ต้องใช้งบประมาณในการทำค่อนข้างสูงเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีอื่นๆ ดังนั้นการศึกษาส่วนใหญ่จึงเลือกใช้วิธีที่เรียกว่า RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ตัดชิ้นส่วนหรือจีโนมของสิ่งมีชีวิตที่ศึกษา แล้วเปรียบเทียบขนาดและรูปแบบของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ด้วยวิธี gel electrophoresis อย่างไรก็ตาม นอกจากการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะแล้ว การใช้เทคนิคพีซีอาร์หรือปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction; PCR) มาเพิ่มปริมาณยีนหรือชิ้นส่วนของดีเอ็นเอเป้าหมายต่างๆ ในจีโนมก็สามารถใช้ศึกษาเปรียบเทียบรูปแบบของแถบดีเอ็นเอในสิ่งมีชีวิตแต่ละตัว (ชนิด) ได้ ดังนั้นสำหรับการศึกษาในครั้งนี้จะเลือกใช้เทคนิค RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA; ใช้ไพรเมอร์เดี่ยว) ในการระบุชนิดหรือลูกผสมระหว่างนกกาบบัวและนกกกระสาปากเหลือง โดยผลการศึกษาที่ได้สามารถใช้เป็นฐานข้อมูลสำคัญในการวางแผนการอนุรักษ์ ขยายพันธุ์ และการปล่อยนกกาบบัวและนกกกระสาปากเหลืองคืนสู่ธรรมชาติต่อไปในอนาคตได้

## 1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ

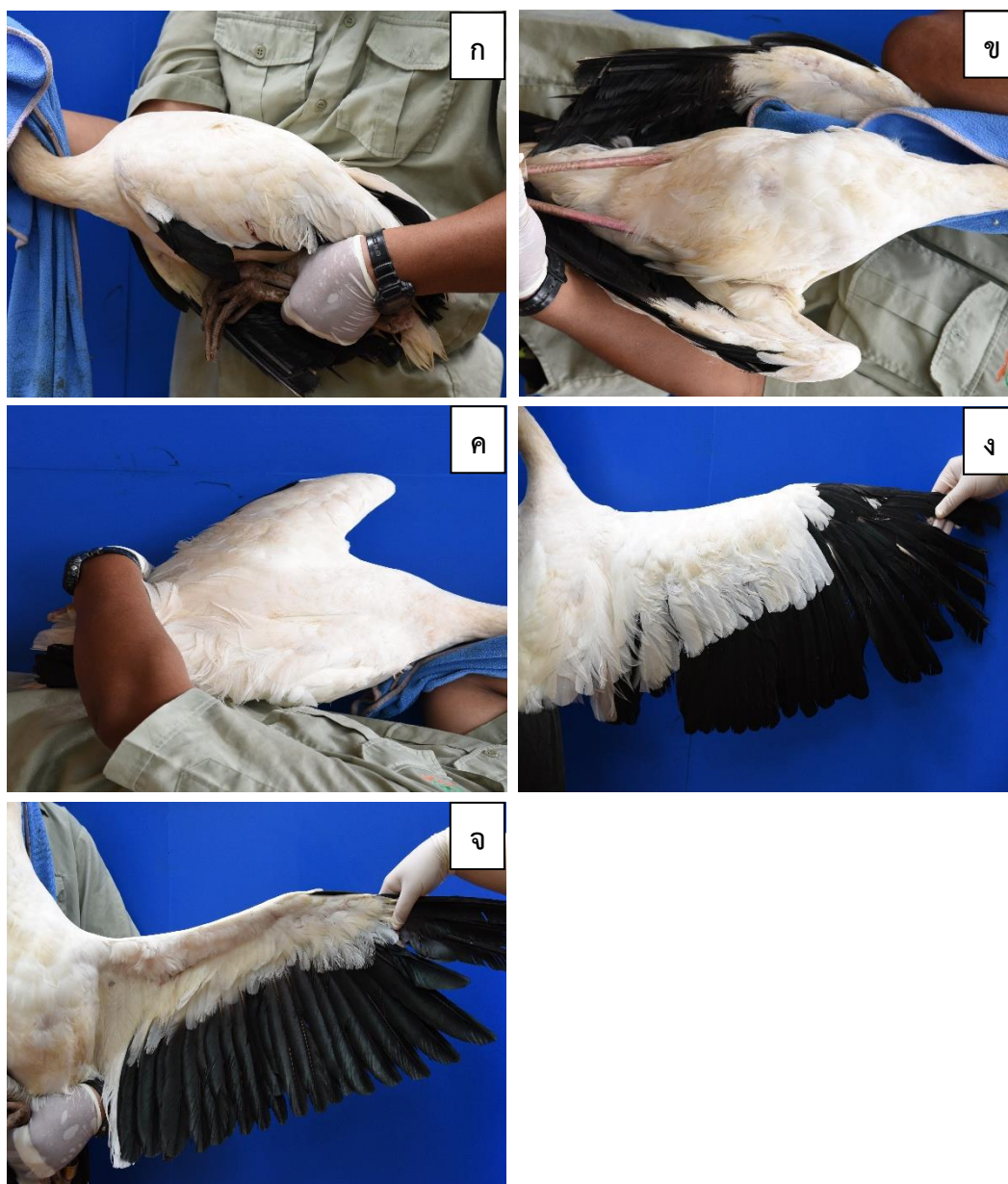
1. เพื่อตรวจหาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เหมาะสมที่สามารถใช้ระบุชนิดของนกกาบบัวและนกกกระสาปากเหลืองได้
2. เพื่อตรวจสอบการผสมข้ามสายพันธุ์ระหว่างนกกาบบัวและนกกกระสาปากเหลืองในสภาพกรงเลี้ยง



ภาพที่ 1 ลักษณะสัณฐานภายนอกของนกกาบบัวที่ยังไม่โตเต็มวัย (juvenile) (ก-ง)  
ลักษณะสัณฐานภายนอกของนกกระสาปากเหลืองที่ยังไม่โตเต็มวัย (juvenile) (จ-ช)



ภาพที่ 2 ลักษณะสัณฐานภายนอกต่างๆ ของนกกาบบัวที่โตเต็มวัย (adult) (ก-จ)



ภาพที่ 3 ลักษณะสัณฐานภายนอกต่างๆ ของนกกกระสาปากเหลืองที่โตเต็มวัย (adult) (ก-จ)

Painted stork



Intermediate



Milky stork



ภาพที่ 4 นกที่มีลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกกำลังก้ำกึ่งระหว่างนกกาบบัวและนกกระสาปากเหลือง  
ที่พบในพื้นที่สวนสัตว์ดุสิต (รูปกลาง และรูปด้านล่าง)



## บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม

เนื่องจากนกกาบบัวและนกกระสาปากเหลืองเป็นนกอพยพ จึงทำให้ยากต่อการเก็บตัวอย่างมาใช้ในการศึกษา ดังนั้นส่วนใหญ่รายงานเกี่ยวกับนกทั้งสองชนิดนี้จะเป็นรายงานจากการเก็บตัวอย่างในสวนสัตว์ ซึ่งก่อนหน้านี้ได้มีรายงานเกี่ยวกับการพบนกลูกผสมที่เกิดจากการผสมข้ามสายพันธุ์ระหว่างนกกาบบัวและนกกระสาปากเหลืองในสวนสัตว์ 2 แห่ง ได้แก่สวนสัตว์ Malaysian National Zoo (Negara) ประเทศมาเลเซีย และ สวนสัตว์ Jurong Bird Park ประเทศสิงคโปร์ โดยสวนสัตว์ Malaysian National Zoo (Negara) ประเทศมาเลเซีย เป็นสถานที่แรกที่มีรายงานพบโดย Yee และคณะในปี ค.ศ. 2013 (Yee et al., 2013) ที่คาดว่าพบนกที่มีลักษณะสัณฐานภายนอกก้ำกึ่งระหว่างนกทั้งสองชนิด จึงได้ทำการบันทึกข้อมูลลักษณะสัณฐานภายนอกบริเวณส่วนต่างๆของนกร่วมกับเก็บตัวอย่างจากเลือดของนกทั้งสองชนิดด้วย FTA cards ที่ออกแบบมาให้เหมาะสมกับการเก็บตัวอย่างเลือดและง่ายต่อการเคลื่อนย้าย เพื่อนำไปใช้วิเคราะห์ข้อมูลทางด้านชีวโมเลกุล ด้วยการใช้นิเทศ DNA fingerprint โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 6 คู่ ได้แก่ WSU09U/WSU09L, WSU13U/WSU13L, D-03, D-05, LR7, และ RAM2 ผลการศึกษาพบว่า ไพรเมอร์ WSU09U/WSU09L ซึ่งเป็นไมโครแซทเทลไลท์ (microsatellites) มีขนาดของแถบ DNA ทั้งหมด 2 แบน ได้แก่ 550 และ 600 คู่เบส ซึ่งแบนขนาด 550 คู่เบส พบในทุกตัวอย่าง แต่แบนขนาด 600 คู่เบส พบเฉพาะในนกกระสาปากเหลืองและนกลูกผสมบางตัวเท่านั้น ส่วนไพรเมอร์ WSU13U/WSU13L มีขนาดของแถบ DNA ทั้งหมด 8 แบน ซึ่งมี 4 แบน ได้แก่ แบนขนาด 270, 300, 500 และ 600 คู่เบส ที่พบได้ในทุกตัวอย่าง แต่มี 2 แบนคือ 400 และ 800 คู่เบส ที่พบได้เฉพาะในนกกาบบัวเท่านั้น และอีก 2 แบน (900 และ 1000 คู่เบส) พบได้ในนกกระสาปากเหลืองเท่านั้น ทั้งนี้พบว่านกลูกผสมบางตัวมีเครื่องหมายทางพันธุกรรมระหว่างนกทั้งสองชนิด ในส่วนของไพรเมอร์ที่เป็น RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) นั้นพบว่า ไพรเมอร์ D-03 และ D-05 ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างนกทั้งสองชนิดนี้ได้ แต่ไพรเมอร์ LR7 พบแบนที่มีขนาด 300, 400 และ 500 คู่เบส รวมถึงไพรเมอร์ RAM2 พบแบนที่มีขนาด 650, 1000, 1800 และ 3000 คู่เบส ปรากฏในตัวอย่งนกที่เป็นลูกผสมเท่านั้น ดังนั้นจึงสามารถใช้แบนขนาดดังกล่าวจากทั้งสองไพรเมอร์ เป็นเครื่องหมายทางพันธุกรรมในการระบุชนิดที่เป็นลูกผสมได้ ซึ่งจากผลการใช้นิเทศหลายพิมพ์ดีเอ็นเอดังกล่าว มีความสอดคล้องกับผลการศึกษาลักษณะสัณฐานภายนอกทั้งหมด 6 ลักษณะ โดยมี 2 ลักษณะหลักที่สามารถนำมาใช้ในการจำแนกชนิดนกได้ คือ ขนสีชมพูบริเวณโคนปีก และ ความเป็นระเบียบของขนสีด้าบนปีก ซึ่งนกลูกผสมบางตัวจะมีขนสีชมพูบริเวณปีกที่มีสีอ่อนกว่าปกติ หรือ บริเวณปีกที่จะมีความเป็นระเบียบของขนสีด้าไม่ชัดเจน ซึ่งจะต่างจากนกกาบบัวพันธุ์แท้ที่มีสีขนชัดเจน

สวนสัตว์แห่งที่สองคือสวนสัตว์ Jurong Bird Park ประเทศสิงคโปร์ ซึ่งเป็นการรายงานของ Baveja และคณะในปี ค.ศ. 2018 (Baveja et al., 2018) ที่พบนกลูกผสมที่เกิดจากการผสมข้ามสายพันธุ์ระหว่างนกกาบบัวและนกกระสาปากเหลืองในสวนสัตว์ โดยรายงานดังกล่าวมีจุดประสงค์หลักในการตรวจสอบการผสมข้ามสายพันธุ์ระหว่างนกกาบบัวที่เป็นลูกผสมกับนกกระสาปากเหลืองท้องถิ่นที่เป็นพันธุ์แท้ จากการศึกษาพันธุกรรมในกลุ่มประชากรของนกกระสาปากเหลืองในประเทศสิงคโปร์

โดยเก็บตัวอย่างจากทั้งนกที่อยู่ในธรรมชาติ/เคยหลุดออกไป, นกที่เลี้ยงในกรงเลี้ยง และ นกที่ไม่ทราบต้นกำเนิด ซึ่งได้เพาะเลี้ยงอยู่ในสวนสัตว์ Jurong Bird Park และวิเคราะห์ข้อมูลลักษณะสัณฐานภายนอก 3 ลักษณะด้วยกัน ได้แก่ แถบขนสีดำบริเวณอก, ขนสีชมพูบริเวณโคนปีก/ขนคลุมขอบปีก และ ความเป็นระเบียบของขนสีดำบนปีก นำมาวิเคราะห์ร่วมกับการเก็บตัวอย่างจากเลือดและเนื้อเยื่อเพื่อนำไปใช้วิเคราะห์ข้อมูลทางด้านจีโนมเลกุลโดยใช้วิธี double digest RAD sequencing (ddRADseq) ซึ่งวิธีดังกล่าวเป็นการใช้เครื่องหมายพันธุกรรมจำนวนมาก หลากๆ โกลไกในการวิเคราะห์ผล (multiloci analysis) โดยผลการศึกษาที่ได้พบในกลุ่มผสมในประชากรของนกกระสาปากเหลืองที่เลี้ยงไว้ในสวนสัตว์ โดยในกลุ่มผสมดังกล่าวประกอบด้วย F1 hybrid, F2 hybrid, backcross (F1 x นกกระสาปากเหลือง) และ backcross (F1 x นกกาบบัว)

จากข้อมูลดังกล่าวข้างต้น ผู้วิจัยจึงสนใจตรวจสอบการผสมข้ามสายพันธุ์ระหว่างนกกาบบัวและนกกระสาปากเหลืองที่เคยเพาะเลี้ยงไว้ในสวนสัตว์ดุสิตในประเทศไทย โดยจะทำการวิเคราะห์ข้อมูลทั้งทางสัณฐานวิทยาและพันธุกรรม (เฉพาะนิวเคลียร์ดีเอ็นเอ) จากนั้นจะนำผลการศึกษาที่ได้ไปวิเคราะห์ผลร่วมกับข้อมูลที่ได้จากไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอเพื่อระบุว่ามีตัวใดบ้างที่เป็นลูกผสมระหว่างนกกาบบัวและนกกระสาปากเหลือง เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานสำคัญให้กับเจ้าหน้าที่สวนสัตว์ในการคัดแยกนกกลุ่มผสมออกจากกลุ่มประชากรพันธุ์แท้และป้องกันมิให้นกกลุ่มผสมหลุดออกไปในธรรมชาติได้

### บทที่ 3 วิธีการดำเนินงาน

#### 3.1 แผนการศึกษา

##### 3.1.1 การขออนุญาตเก็บตัวอย่าง

3.1.1.1 ทำเอกสารขออนุญาตเก็บตัวอย่างนกกาบบัวและนกกระสาปากเหลืองจากองค์การสวนสัตว์ ในพระบรมราชูปถัมภ์

3.1.1.2 ขอเอกสารอนุมัติจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลอง โดยขออนุญาตจากคณะกรรมการการควบคุมดูแล การเลี้ยง และการใช้สัตว์ทดลองทางวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

##### 3.1.2 พื้นที่ศึกษาและสถานที่เก็บตัวอย่าง

1). สวนสัตว์ดุสิต แขวงดุสิต กรุงเทพมหานคร

สวนสัตว์ดุสิตเป็นสวนสัตว์เปิดที่อยู่ใจกลางกรุงเทพมหานคร มีเนื้อที่ 118 ไร่ ภายในสวนสัตว์ประกอบด้วยสัตว์ป่านานาชนิด ทั้งหมดประมาณ 1,343 ตัว (dooasia, 2019) สำหรับการเพาะเลี้ยงนกกาบบัวที่สวนสัตว์ดุสิตนั้น เริ่มขึ้นในปี พ.ศ. 2540 โดยเลี้ยงไว้ในกรงเหล็กขนาดใหญ่ ที่มีพื้นที่หญ้า รวมถึงแอ่งน้ำคล้ายกับสภาพแหล่งที่อยู่อาศัยในธรรมชาติ (ภาพที่ 4) โดยเริ่มต้นจากพ่อแม่พันธุ์ทั้งหมด 70 ตัว และปัจจุบันมีจำนวนมากกว่า 200 ตัว ต่อมาในปี พ.ศ. 2541 ได้มีการนำนกกระสาปากเหลืองมาเลี้ยงร่วมกับนกกาบบัวด้วย แต่ใน ปี พ.ศ. 2557 ทางสวนสัตว์ดุสิตได้ย้ายนกกระสาปากเหลืองทั้งหมดจำนวน 17 ตัวไปเพาะเลี้ยงที่สวนสัตว์นครราชสีมาแทน ในการศึกษาครั้งนี้ได้เก็บตัวอย่างนกกาบบัวและนกที่มีลักษณะก้ำกึ่ง (intermediate) ทั้งหมด 174 ตัว ในเดือนสิงหาคม พ.ศ. 2561

2). สวนสัตว์นครราชสีมา อำเภอเมืองนครราชสีมา จังหวัดนครราชสีมา

สวนสัตว์แห่งนี้มีพื้นที่ทั้งหมด 545 ไร่ มีการแสดงสัตว์ป่านานาชนิด ทั้งหมดประมาณ 1,800 ตัว (korat.zoothailand, 2019) สำหรับการเพาะเลี้ยงนกกระสาปากเหลืองที่สวนสัตว์นครราชสีมา นั้นเริ่มขึ้นในปี พ.ศ. 2557 จนถึง ปัจจุบันได้เพาะเลี้ยงไว้ในกรงเลี้ยงทั้งหมด 3 กรง กรงแรกจะเป็นกรงขนาดใหญ่ที่เลี้ยงไว้สำหรับให้นักท่องเที่ยวได้ชม ซึ่งได้เพาะเลี้ยงนกกระสาปากเหลืองไว้ทั้งหมด 17 ตัว ในส่วนกรงที่สองและสามจะเป็นกรงขนาดเล็ก ซึ่งได้เลี้ยงไว้สำหรับเพาะพันธุ์ โดยในแต่ละกรงเลี้ยงจะมีนกกระสาปากเหลืองจำนวน 16 ตัว (ภาพที่ 5) ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการเก็บตัวอย่างนกกระสาปากเหลืองทั้งหมด 49 ตัว จากทั้ง 3 กรง



ภาพที่ 5 นกกาบบัวที่เพาะเลี้ยงไว้ในกรงเลี้ยงที่มีลักษณะปิดในพื้นที่สวนสัตว์ดุสิต



ภาพที่ 6 นกกระสาปากเหลืองที่เพาะเลี้ยงไว้ในกรงเลี้ยงที่มีลักษณะปิดในพื้นที่สวนสัตว์นครราชสีมา

### 3.1.3 การเก็บตัวอย่าง

ในการเก็บตัวอย่างนก เริ่มจากเจ้าหน้าที่ประจำสวนสัตว์ที่มีความเชี่ยวชาญใช้ตาข่ายหรือมือเปล่าจับนกออกมาจากกรงเลี้ยง (ภาพที่ 6) จากนั้นนำนกที่จับได้มาชั่งน้ำหนักเพื่อคำนวณหาปริมาตรเลือดที่สามารถเจาะได้ ซึ่งจะคิดจาก 10% ของน้ำหนักตัวนก (ภาพที่ 7) ทำการระบุหมายเลขตัวอย่างโดยติดห่วงหมายเลขพลาสติกที่บริเวณขาของนกแต่ละตัว (ภาพที่ 8) และถ่ายภาพลักษณะสีขนภายนอกต่างๆ ทั้งหมด 5 ลักษณะได้แก่ สีขนบริเวณลำตัว, ขนสีชมพูบริเวณโคนปีก, แถบขนสีดำบริเวณอก, ความเป็นระเบียบของขนสีดำบนปีก และสีขนคลุมขอบปีก (ภาพที่ 9) สำหรับประกอบการวิเคราะห์ข้อมูลสีขนฐานวิทยา เมื่อทำการบันทึกภาพถ่ายเสร็จแล้ว สัตวแพทย์ผู้ร่วมโครงการหรือสัตวแพทย์ประจำสวนสัตว์จะเก็บตัวอย่างเลือดโดยใช้เข็มฉีดยา (syringe) เบอร์ 24G x 1 นิ้ว ขนาด 1 มิลลิลิตร เจาะเลือดปริมาตร 400-500 ไมโครลิตรจากหลอดเลือด subclavian vein ที่บริเวณใต้ปีกของนก นำเลือดที่เจาะได้ใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวซ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มีสารละลาย EDTA สำหรับป้องกันการแข็งตัวของเลือด (ภาพที่ 10) จากนั้นนำนกไปไว้ในกรงเลี้ยงแยก เพื่อสังเกตพฤติกรรมเป็นเวลา 30 นาที หากไม่พบว่านกแสดงพฤติกรรมผิดปกติ ก็จะนำนกปล่อยกลับเข้าสู่กรงเลี้ยงดังเดิม นำตัวอย่างเลือดของนกกบบัวและกระสาปากเหลืองที่เก็บได้กลับมายังห้องปฏิบัติการ โดยจะแบ่งตัวอย่างเลือดไว้ 2 ส่วน คือส่วนแรกนำเลือดประมาณ 60 ไมโครลิตร หยดลงกระดาษกรองสำหรับใช้สกัดดีเอ็นเอในห้องปฏิบัติการได้ทันที ส่วนที่เหลือปริมาตรประมาณ 440 ไมโครลิตรจะเก็บรักษาสภาพไว้ที่ -80 องศาเซลเซียสในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร (ภาพที่ 11)



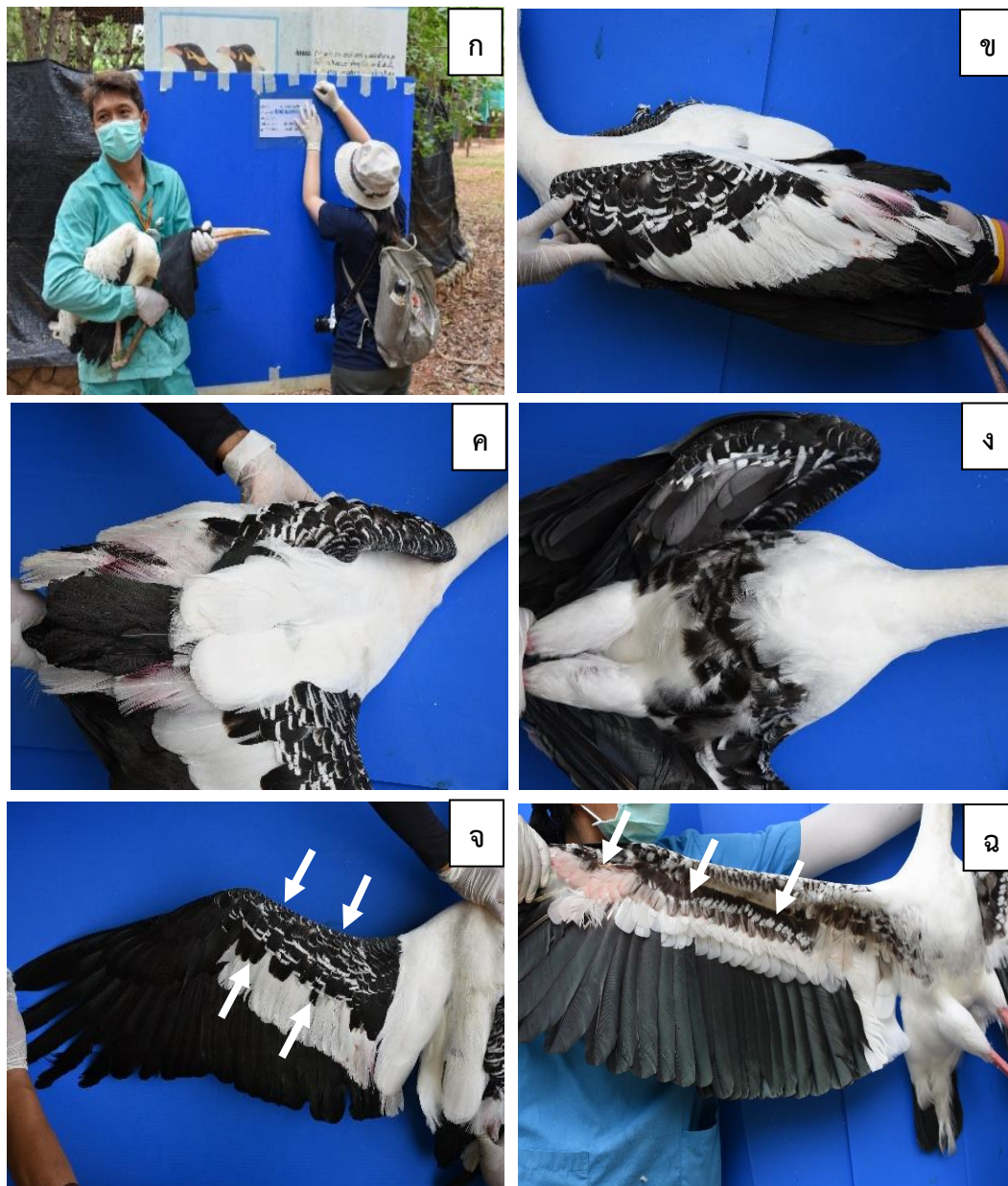
ภาพที่ 7 เจ้าหน้าที่สวนสัตว์จับนกกระสาปากเหลืองออกมาจากกรงเลี้ยง



ภาพที่ 8 การชั่งน้ำหนักนกเพื่อนำมาใช้คำนวณปริมาตรสำหรับการเก็บตัวอย่างเลือด



ภาพที่ 9 ห่วงหมายเลขที่นำมาใส่ขานกสำหรับระบุหมายเลขประจำตัวนก



ภาพที่ 10 สถานที่ใช้บันทึกภาพถ่ายลักษณะสัณฐานภายนอกของนก (ก) และลักษณะสัณฐานภายนอกต่างๆ 5 ลักษณะได้แก่ (ข) สีขนบริเวณลำตัว, (ค) ขนสีชมพูบริเวณโคนปีก, (ง) แถบขนสีดำบริเวณอก, (จ) ความเป็นระเบียบของขนสีดำบนปีก และ (ฉ) สีขนคลุมขอบปีก ที่ได้ทำการบันทึกไว้สำหรับการวิเคราะห์ข้อมูลทางด้านการศึกษา



ภาพที่ 11 การเก็บตัวอย่างเลือดนกโดยเจาะเลือดบริเวณ subclavian vein ใต้ปีกนก (ซ้าย) หลอดไมโครเซนตริฟิวซ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตรสำหรับเก็บตัวอย่างเลือด (ขวา)



ภาพที่ 12 ตัวอย่างเลือดที่หยดบนกระดาษกรองเพื่อใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ

### 3.1.4 ขั้นตอนการดำเนินงานในห้องปฏิบัติการ

#### 3.1.4.1 การสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสารเคมีสำเร็จรูป

สกัดดีเอ็นเอจากเลือดที่หยดบนกระดาษกรองของนกกาบัวและนกกระสาปากเหลือง โดยใช้ชุดสารเคมีสำเร็จรูป FavorPrep™ Tissue Genomic DNA Extraction Mini Kit โดยสกัดตามคู่มือสกัดดีเอ็นเอของบริษัท Favorgen ซึ่งมีขั้นตอนการทำงานดังนี้

- 1) ใส่สารละลาย FATG1 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวซ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลังจากนั้นตัดกระดาษกรองบริเวณที่หยดเลือดไว้ เป็นพื้นที่ประมาณ 5-10 ตารางมิลลิเมตร
- 2) ใส่ proteinase K (10 mg/ml) ปริมาตร 20 ไมโครลิตรลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวซ์ ในข้อที่ 1 สำหรับ ย่อยนิวเคลียร์เมมเบรนและเซลล์เมมเบรนที่มีโปรตีนเป็นส่วนประกอบ เพื่อให้ดีเอ็นเอออกมาอยู่ในสารละลาย จากนั้นนำไป vortex และ spin down ให้สารละลายทำปฏิกิริยาได้อย่างทั่วถึง แล้วนำไปเร่งปฏิกิริยาของ proteinase K ด้วยการ incubate ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และนำไป spin down เพื่อให้ไอน้ำที่เกาะอยู่บนหลอดตกลงมารวมกับสารละลายข้างล่าง



- 3) ใส่สารละลาย FATG2 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร หลังจากนั้นนำไป vortex และ spin down เพื่อให้สารละลายทำปฏิกิริยาได้อย่างทั่วถึง แล้วเร่งปฏิกิริยาด้วยการ incubate ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไป vortex และ spin down เพื่อให้ไอน้ำที่เกาะอยู่บนหลอดตกลงมารวมกับสารละลายข้างล่าง และนำไป centrifuge ที่ความเร็ว 14,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที
- 4) ย้ายสารละลายปริมาตร 580 ไมโครลิตร จากหลอดไมโครเซนตริฟิวซ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตรด้วยไมโครปิเปต ใส่ไปในหลอด mini column ที่ประกอบรวมกับหลอด collecting tube แล้วนำหลอดดังกล่าวไป centrifuge ที่ความเร็ว 14,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้สารอื่นๆ ที่ไม่ใช่ดีเอ็นเอลงไปอยู่ใน collecting tube หลังจากนั้นทิ้งของเหลวที่อยู่ใน collecting tube
- 5) ใส่สารละลาย W1 buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วนำไป centrifuge ที่ความเร็ว 14,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เพื่อล้างสารละลายที่ตกค้างอยู่บนแผ่นเมมเบรน ของ mini column ทิ้งของเหลวที่อยู่ใน collecting tube และใส่สารละลาย wash buffer ปริมาตร 750 ไมโครลิตร นำไป centrifuge ที่ความเร็ว 14,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งของเหลวที่อยู่ใน collecting tube
- 6) นำหลอดที่มี mini column ไป centrifuge ที่ความเร็ว 14,000 rpm เป็นเวลา 3 นาที เพื่อให้สารละลายอื่นๆ ที่ตกค้างอยู่บนเมมเบรนหล่นมาใน collecting tube จากนั้นย้าย mini column ไปใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวซ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตรหลอดใหม่ ใส่สารละลาย elution buffer ปริมาตร 60 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที แล้วนำไป centrifuge ที่ความเร็ว 14,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที หลังจากนั้นสามารถใช้สารในหลอดดังกล่าวเป็น DNA template ในขั้นตอนถัดไปได้

### 3.1.4.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction; PCR)

ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส คือกระบวนการสังเคราะห์ชิ้นส่วนดีเอ็นเอในหลอดทดลองซึ่งจะเลียนแบบวิธีเดียวกับการสังเคราะห์ชิ้นส่วนดีเอ็นเอในสิ่งมีชีวิต เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายให้มีปริมาณมากขึ้น ในการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้เทคนิค Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD) โดยใช้

ไพรเมอร์จำนวน 2 คู่ ได้แก่ D-03 ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ คือ 5'-GTCGCCGTCA-3' และ LR7 ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ คือ 5'-TTGAGTCAACTCTGGACCGG-3' (Yee et al., 2013) โดยใช้ final volume ที่ 10 ไมโครลิตร ที่ประกอบด้วย DNA template 2 ไมโครลิตร, EmeraldAmp PCR Master Mix 5 ไมโครลิตร, MilliQ water 2 ไมโครลิตร และไพรเมอร์ 1 ไมโครลิตร ทั้งนี้ได้ใช้ negative control เพื่อตรวจสอบว่ามีการปนเปื้อนระหว่างทำการทดลองหรือไม่ โดยมีส่วนประกอบเหมือนกับการทำ PCR ข้างต้น แต่ใส่ MilliQ water แทน DNA template ในส่วนของ PCR condition สำหรับไพรเมอร์ทั้ง 2 คู่นี้ ใช้ PCR condition เดียวกัน คือ pre-denaturing ที่ 94 องศาเซลเซียส 3 นาที หลังจากนั้นตามด้วย 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 34 องศาเซลเซียส 30 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที ทั้งหมด 20 รอบ สุดท้ายคือ final extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

### 3.1.4.3 การตรวจสอบขนาดของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis

#### 3.1.4.3.1 ไพรเมอร์ D-03

นำ PCR product ที่สนใจมาตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอด้วยการแยกทางไฟฟ้าผ่านเครื่อง electrophoresis (ภาพที่ 12) ในขั้นตอนการเตรียม agarose gel นั้นจะเตรียมโดยใช้ผงเจลจาก SeaKem® GTG agarose นำมาผสมกับสารละลาย 0.5xTBE buffer ให้มีความเข้มข้นของ agarose gel 1% (w/v) แล้วนำไปให้ความร้อนเพื่อให้สารละลายดังกล่าวรวมเป็นเนื้อเดียวกัน หลังจากนั้นเทลงใน gel tray ที่มี comb เพื่อให้มี well สำหรับใส่สาร รอ agarose gel แข็งตัวประมาณ 15-20 นาที จึงดึง comb ออก แล้วย้าย agarose gel ไปยัง electrophoresis tank ที่มีสารละลาย 0.5xTBE buffer ท่วมอยู่เหนือ agarose gel หลังจากนั้นจึงทำการหยอด PCR product ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ลงในแต่ละ well และเพื่อให้ทราบขนาดของดีเอ็นเอจึงได้ใส่ 100 bp DNA ladder ปริมาตร 2 ไมโครลิตรด้วย และตั้งค่าเครื่อง electrophoresis ที่กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นระยะเวลา 60 นาที ซึ่งจะทำให้ดีเอ็นเอแยกออกจากกันตามขนาดของดีเอ็นเอนั้นๆ จากนั้นนำ agarose gel ไปส่องดูผล ด้วยเครื่อง safe imager transilluminator ภายใต้แสงสีฟ้า (blue light) จากนั้นนำผลที่ได้ ไปเปรียบเทียบขนาดและรูปแบบของแถบดีเอ็นเอ เพื่อหาแถบดีเอ็นเอที่เหมาะสมที่สามารถนำไปใช้ระบุ ชนิดของนกแต่ละชนิดต่อไป

#### 3.1.4.3.2 ไพรเมอร์ LR7

สำหรับไพรเมอร์ LR7 นั้นจะมีขั้นตอนหลักๆ คล้ายกับไพรเมอร์ D-03 แต่จะแตกต่างที่เตรียม agarose gel ให้มีความเข้มข้น 1.5% (w/v) และตั้งค่าเครื่อง electrophoresis ที่กระแสไฟฟ้า 75 โวลต์ เป็นระยะเวลา 95 นาที



ภาพที่ 13 ชุดอุปกรณ์สำหรับทำ agarose gel electrophoresis ประกอบด้วย power supply, electrophoresis tank และ gel casting system

#### 3.1.4.4 การทำ fragment analysis ด้วยวิธี GeneScan

เนื่องจากผลการตรวจสอบขนาดของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis จากทั้งไพรเมอร์ D-03 และ LR7 ยังไม่สามารถทราบขนาดของอัลลีลอย่างละเอียดได้ ดังนั้นเพื่อหาขนาดและจำนวนของอัลลีลของนกทั้งสองชนิดนี้ จึงส่ง PCR product ที่ได้ไปทำ genotyping ด้วยวิธี Genescan ซึ่งขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างสำหรับทำ genotyping นั้นจะเหมือนกับขั้นตอนการทำ PCR ปกติในข้อ 3.1.4.2 แต่ใช้ไพรเมอร์ LR7 ที่มีการติดสีเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ (6-FAM) แทนไพรเมอร์ปกติ และเปลี่ยนจากการเตรียม PCR mixture ที่ final concentration 10 ไมโครลิตร เป็น 30 ไมโครลิตรแทน โดยในการศึกษานี้ได้ใช้ไพรเมอร์ LR7 เพียงไพรเมอร์เดียวเท่านั้น หลังจากนั้นนำ PCR product ที่ได้ส่งไปหาขนาดอัลลีลที่บริษัท MacroGen Inc. ประเทศสาธารณรัฐเกาหลี จากนั้นนำผลที่ได้มาวิเคราะห์โปรด้วยโปรแกรม GeneMarker V3.0.0 เพื่อตรวจหาขนาดและจำนวนของอัลลีลทั้งหมดในกลุ่มประชากรของนกกาบบัวและนกกระสาปากเหลือง เพื่อหาเครื่องหมายทางพันธุกรรมสำหรับประเมินความเป็นไปได้ในการผสมข้ามสายพันธุ์ระหว่างนกทั้งสองชนิดนี้ต่อไป

## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

#### 4.1 ผลการสกัดดีเอ็นเอ

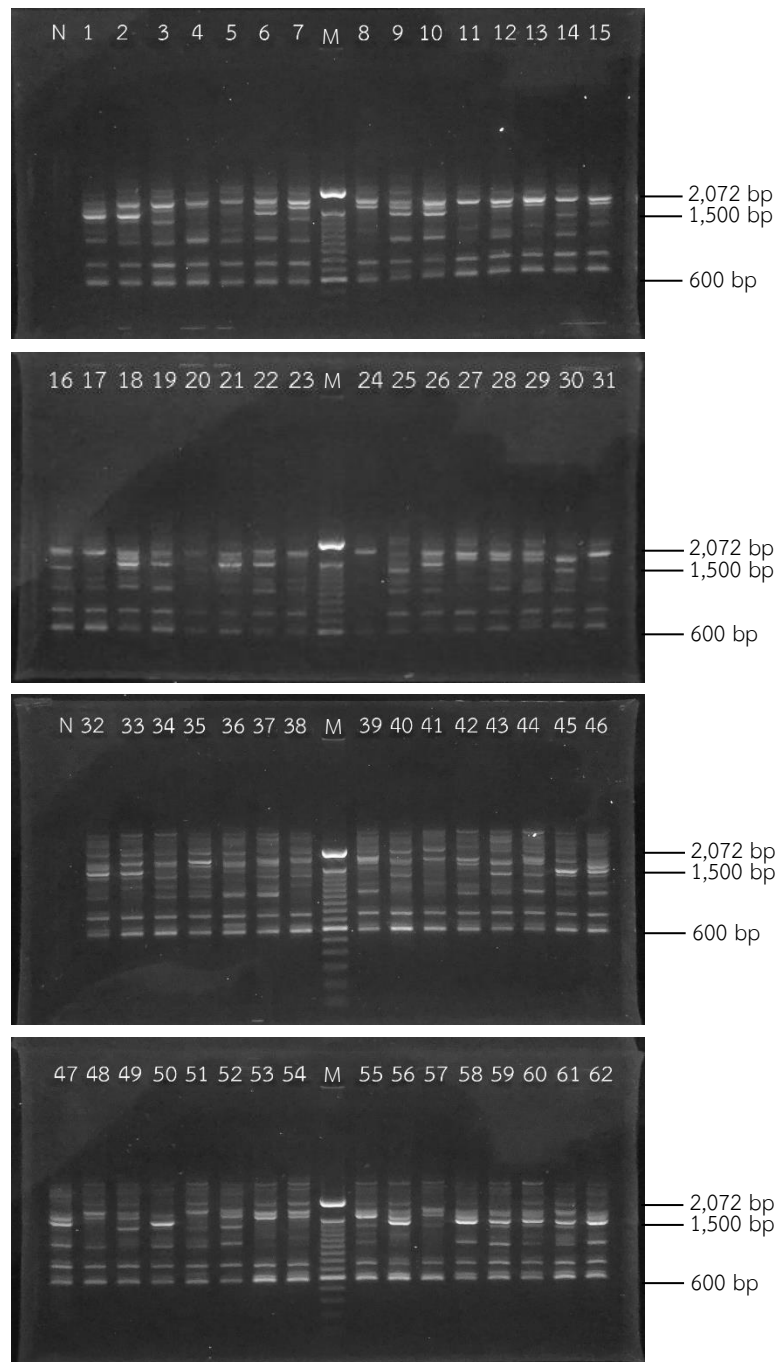
การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือดของนกกาบบัวและนกกระสาปากเหลืองด้วยชุดสารเคมีสำเร็จรูปพบว่าดีเอ็นเอที่ได้มีปริมาณและความเข้มข้นมากเพียงพอที่จะนำไปใช้เป็น DNA template สำหรับการทำ PCR ได้ ซึ่งในการศึกษารั้งนี้ได้ทำการสกัด DNA ของตัวอย่างเลือดจากนกกาบบัวจำนวน 174 ตัวอย่าง และนกกระสาปากเหลืองจำนวน 49 ตัวอย่าง

#### 4.2 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายและการตรวจสอบขนาดของ RAPD fragment ด้วยวิธี gel electrophoresis

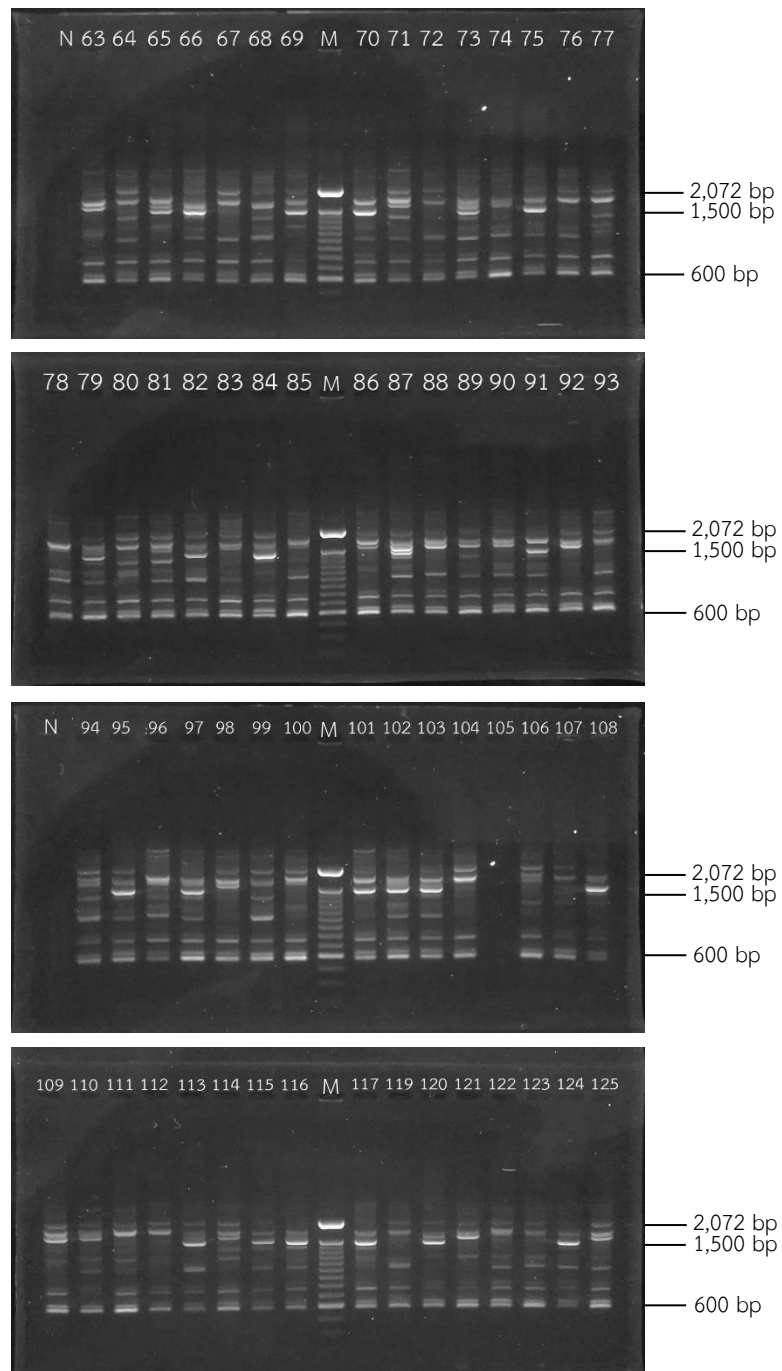
##### 4.2.1 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ D-03

จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยไพรเมอร์ D-03 แล้วนำมาตรวจหาขนาดด้วยวิธี agarose gel electrophoresis ของนกกาบบัวจำนวน 123 ตัวอย่าง (ภาพที่ 13) พบว่ามีขนาดของแถบ DNA (RAPD fragment) ทั้งหมด 11 แบน ได้แก่แบนที่มีขนาด 600, 650, 750, 800, 1050, 1100, 1200, 1350, 1500, 1700 และ 1800 โดยพบว่านกกาบบัวทุกตัวอย่างมีการปรากฏของแบนขนาด 600, 650, 750, 800, 1200 และ 1800 เหมือนกัน ส่วนแบนที่มีขนาด 1050, 1100, 1350, 1500 และ 1700 พบได้ในนกกาบบัวบางตัวอย่างเท่านั้น (รายละเอียดดังตารางที่ 1) ในส่วนของนกกระสาปากเหลืองจำนวน 31 ตัวอย่างนั้น (ภาพที่ 14) พบว่ามีขนาดของแถบ DNA ทั้งหมด 11 แบน ได้แก่แบนที่มีขนาด 600, 650, 750, 800, 1050, 1100, 1200, 1350, 1500, 1700 และ 1800 โดยพบว่านกกระสาปากเหลืองทุกตัวอย่างมีการปรากฏของแบนขนาด 600, 650, 750, 800, 1200 และ 1800 เหมือนกัน ส่วนแบนที่มีขนาด 1050, 1100, 1350, 1500 และ 1700 พบในบางตัวอย่างเท่านั้น (รายละเอียดดังตารางที่ 2)

เมื่อเปรียบเทียบขนาดของ RAPD fragment ที่ได้ระหว่างประชากรของนกกาบบัวและนกกระสาปากเหลืองพบว่าทั้ง 11 แบนที่เพิ่มปริมาณได้มีขนาดเท่ากัน และไม่พบแบนที่มีขนาดแตกต่างระหว่างนกทั้งสองชนิด ดังนั้นผลที่ได้จากการทำ gel electrophoresis ของไพรเมอร์ D-03 จึงไม่สามารถใช้ในการระบุชนิดนกได้



ภาพที่ 14 การตรวจสอบขนาดของ RAPD fragment ที่เพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ D-03 ด้วย 1% agarose gel electrophoresis ที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที ของนกกาบบัวตัวอย่างที่ 1-62



ภาพที่ 15 การตรวจสอบขนาดของ RAPD fragment ที่เพิ่มปริมาณด้วยไพรมอร์ D-03 ด้วย 1% agarose gel electrophoresis ที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที ของนกกาบบัวตัวอย่างที่ 63-125

ตารางที่ 1 ขนาดของ RAPD fragment ในจีโนมของนกกาบบัวจำนวน 123 ตัวอย่าง ที่เพิ่ม  
ปริมาณด้วยไพรเมอร์ D-03

ขนาด ตัวอย่าง	600	650	750	800	1050	1100	1200	1350	1500	1700	1800
PS01	600	650	750	800	1050	-	1200	1350	1500	1700	1800
PS02	600	650	750	800	1050	-	1200	1350	1500	-	1800
PS03	600	650	750	800	1050	1100	1200	1350	1500	1700	1800
PS04	600	650	750	800	1050	1100	1200	1350	1500	-	1800
PS05	600	650	750	800	1050	-	1200	1350	1500	-	1800
PS06	600	650	750	800	1050	-	1200	1350	1500	1700	1800
PS07	600	650	750	800	1050	-	1200	1350	1500	1700	1800
PS08	600	650	750	800	-	-	1200	-	-	1700	1800
PS09	600	650	750	800	1050	-	1200	-	1500	1700	1800
PS10	600	650	750	800	1050	-	1200	-	1500	1700	1800
PS11	600	650	750	800	-	-	1200	-	-	-	1800
PS12	600	650	750	800	1050	1100	1200	1350	-	1700	1800
PS13	600	650	750	800	-	-	1200	-	-	1700	1800
PS14	600	650	750	800	1050	-	1200	1350	-	-	1800
PS15	600	650	750	800	-	-	1200	-	-	1700	1800
PS16	600	650	750	800	1050	1100	1200	1350	-	-	1800
PS17	600	650	750	800	1050	-	1200	-	-	-	1800
PS18	600	650	750	800	1050	-	1200	1350	1500	1700	1800
PS19	600	650	750	800	1050	-	1200	-	1500	-	1800
PS20	600	650	750	800	-	-	1200	1350	-	-	1800
PS21	600	650	750	800	1050	-	1200	1350	1500	1700	1800
PS22	600	650	750	800	1050	1100	1200	-	1500	1700	1800
PS23	600	650	750	800	1050	1100	1200	-	-	-	1800
PS24	600	650	750	800	-	-	1200	-	-	-	1800
PS25	600	650	750	800	1050	-	1200	1350	1500	-	1800
PS26	600	650	750	800	1050	-	1200	1350	1500	1700	1800
PS27	600	650	750	800	-	-	1200	-	1500	1700	1800
PS28	600	650	750	800	1050	-	1200	1350	1500	1700	1800
PS29	600	650	750	800	1050	1100	1200	-	-	1700	1800
PS30	600	650	750	800	1050	-	1200	1350	-	1700	1800
PS31	600	650	750	800	-	-	1200	-	1500	-	1800
PS32	600	650	750	800	1050	-	1200	1350	1500	1700	1800
PS33	600	650	750	800	1050	-	1200	1350	1500	-	1800
PS34	600	650	750	800	1050	1100	1200	1350	1500	-	1800
PS35	600	650	750	800	1050	1100	1200	1350	1500	1700	1800
PS36	600	650	750	800	1050	-	1200	-	1500	1700	1800
PS37	600	650	750	800	1050	-	1200	1350	1500	1700	1800
PS38	600	650	750	800	-	-	1200	1350	1500	-	1800
PS39	600	650	750	800	-	1100	1200	-	1500	1700	1800
PS40	600	650	750	800	1050	-	1200	1350	1500	1700	1800
PS41	600	650	750	800	1050	-	1200	-	-	-	1800
PS42	600	650	750	800	1050	-	1200	1350	1500	1700	1800

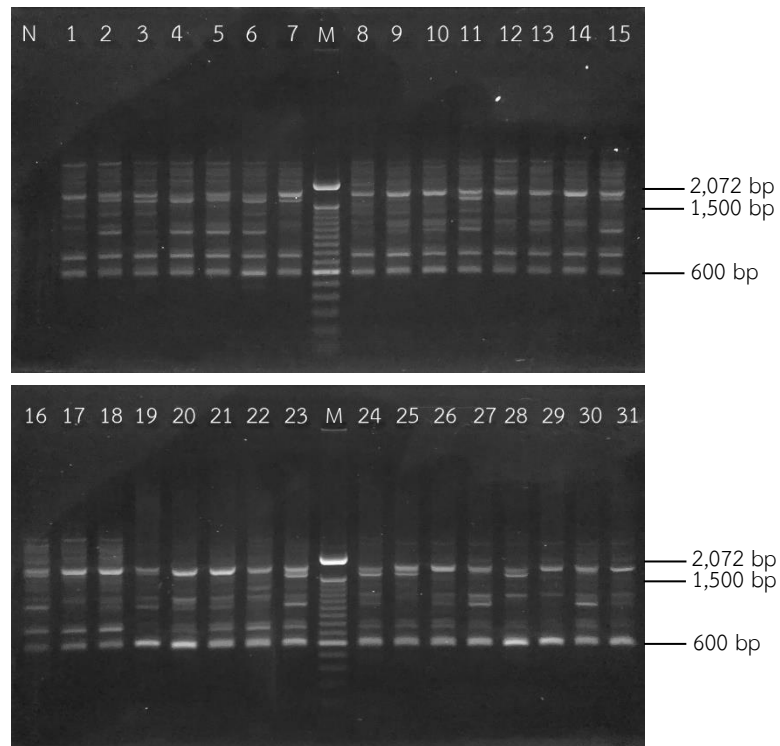
ตารางที่ 1 (ต่อ)

ขนาด ตัวอย่าง	600	650	750	800	1050	1100	1200	1350	1500	1700	1800
PS43	600	650	750	800	1050	-	1200	1350	-	1700	1800
PS44	600	650	750	800	1050	-	1200	1350	-	1700	1800
PS45	600	650	750	800	1050	1100	1200	1350	-	-	1800
PS46	600	650	750	800	1050	-	1200	1350	1500	1700	1800
PS47	600	650	750	800	1050	1100	1200	1350	1500	1700	1800
PS48	600	650	750	800	1050	-	1200	-	1500	1700	1800
PS49	600	650	750	800	-	1100	1200	1350	1500	1700	1800
PS50	600	650	750	800	1050	1100	1200	1350	1500	-	1800
PS51	600	650	750	800	1050	1100	1200	1350	-	1700	1800
PS52	600	650	750	800	1050	-	1200	1350	1500	1700	1800
PS53	600	650	750	800	-	-	1200	-	1500	1700	1800
PS54	600	650	750	800	-	1100	1200	-	1500	1700	1800
PS55	600	650	750	800	1050	1100	1200	1350	1500	-	1800
PS56	600	650	750	800	-	-	1200	1350	1500	1700	1800
PS57	600	650	750	800	-	-	1200	1350	-	-	1800
PS58	600	650	750	800	1050	-	1200	1350	1500	-	1800
PS59	600	650	750	800	1050	-	1200	1350	-	1700	1800
PS60	600	650	750	800	1050	-	1200	1350	1500	1700	1800
PS61	600	650	750	800	1050	1100	1200	1350	1500	-	1800
PS62	600	650	750	800	1050	-	1200	1350	1500	1700	1800
PS63	600	650	750	800	-	1100	1200	-	1500	1700	1800
PS64	600	650	750	800	1050	-	1200	1350	1500	-	1800
PS65	600	650	750	800	-	-	1200	-	1500	1700	1800
PS66	600	650	750	800	1050	-	1200	1350	1500	1700	1800
PS67	600	650	750	800	1050	-	1200	-	1500	-	1800
PS68	600	650	750	800	1050	-	1200	1350	-	1700	1800
PS69	600	650	750	800	1050	-	1200	-	1500	-	1800
PS70	600	650	750	800	1050	1100	1200	-	1500	-	1800
PS71	600	650	750	800	1050	-	1200	1350	-	1700	1800
PS72	600	650	750	800	1050	-	1200	-	-	-	1800
PS73	600	650	750	800	1050	1100	1200	1350	1500	1700	1800
PS74	600	650	750	800	1050	1100	1200	1350	-	1700	1800
PS75	600	650	750	800	1050	1100	1200	-	1500	-	1800
PS76	600	650	750	800	1050	-	1200	-	-	-	1800
PS77	600	650	750	800	1050	1100	1200	1350	-	-	1800
PS78	600	650	750	800	1050	1100	1200	-	-	1700	1800
PS79	600	650	750	800	1050	1100	1200	1350	1500	1700	1800
PS80	600	650	750	800	-	1100	1200	1350	1500	-	1800
PS81	600	650	750	800	1050	-	1200	1350	-	1700	1800
PS82	600	650	750	800	1050	-	1200	-	1500	-	1800
PS83	600	650	750	800	1050	-	1200	-	-	1700	1800
PS84	600	650	750	800	1050	-	1200	1350	-	1700	1800
PS85	600	650	750	800	1050	-	1200	1350	-	1700	1800



ตารางที่ 1 (ต่อ)

ขนาด ตัวอย่าง	600	650	750	800	1050	1100	1200	1350	1500	1700	1800
PS86	600	650	750	800	-	-	1200	1350	-	1700	1800
PS87	600	650	750	800	1050	1100	1200	1350	1500	1700	1800
PS88	600	650	750	800	1050	-	1200	-	-	1700	1800
PS89	600	650	750	800	1050	-	1200	1350	-	1700	1800
PS90	600	650	750	800	1050	1100	1200	-	-	1700	1800
PS91	600	650	750	800	1050	1100	1200	1350	1500	-	1800
PS92	600	650	750	800	-	-	1200	-	-	1700	1800
PS93	600	650	750	800	1050	1100	1200	-	1500	1700	1800
PS94	600	650	750	800	1050	1100	1200	1350	-	1700	1800
PS95	600	650	750	800	1050	-	1200	1350	1500	1700	1800
PS96	600	650	750	800	1050	1100	1200	1350	-	1700	1800
PS97	600	650	750	800	1050	1100	1200	1350	1500	1700	1800
PS98	600	650	750	800	-	-	1200	-	1500	1700	1800
PS99	600	650	750	800	1050	-	1200	1350	-	-	1800
PS100	600	650	750	800	-	-	1200	-	1500	-	1800
PS101	600	650	750	800	-	-	1200	1350	1500	-	1800
PS102	600	650	750	800	1050	1100	1200	-	1500	1700	1800
PS103	600	650	750	800	1050	-	1200	1350	1500	1700	1800
PS104	600	650	750	800	-	-	1200	1350	-	1700	1800
PS105	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PS106	600	650	750	800	-	1100	1200	1350	-	1700	1800
PS107	600	650	750	800	-	-	1200	1350	-	-	1800
PS108	600	650	750	800	-	-	1200	1350	1500	1700	1800
PS109	600	650	750	800	-	-	1200	1350	1500	1700	1800
PS110	600	650	750	800	1050	-	1200	-	-	1700	1800
PS111	600	650	750	800	1050	-	1200	1350	-	-	1800
PS112	600	650	750	800	-	-	1200	-	-	-	1800
PS113	600	650	750	800	1050	1100	1200	-	1500	-	1800
PS114	600	650	750	800	-	-	1200	1350	-	1700	1800
PS115	600	650	750	800	1050	-	1200	1350	1500	-	1800
PS116	600	650	750	800	1050	-	1200	1350	1500	1700	1800
PS117	600	650	750	800	1050	-	1200	1350	1500	-	1800
PS119	600	650	750	800	1050	1100	1200	-	-	-	1800
PS120	600	650	750	800	-	-	1200	1350	1500	1700	1800
PS121	600	650	750	800	-	-	1200	1350	-	1700	1800
PS122	600	650	750	800	1050	-	1200	-	-	-	1800
PS123	600	650	750	800	1050	-	1200	-	-	-	1800
PS124	600	650	750	800	1050	-	1200	1350	1500	-	1800
PS125	600	650	750	800	1050	-	1200	-	-	1700	1800



ภาพที่ 16 การตรวจสอบขนาดของ RAPD fragment ที่เพิ่มปริมาณด้วยไพรมอร์ D-03 ด้วย 1% agarose gel electrophoresis ที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที ของนกระสาปากเหลืองตัวอย่างที่ 1-31

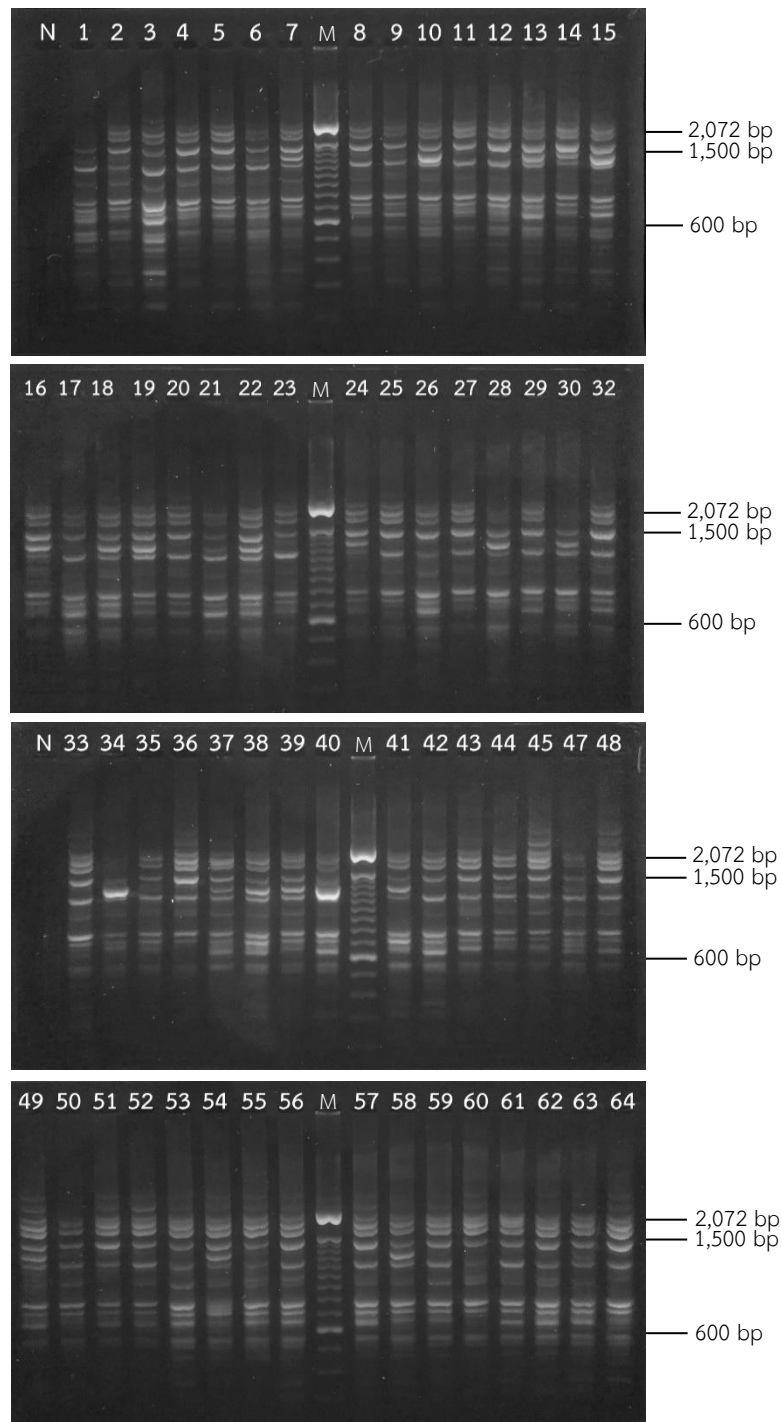
ตารางที่ 2 ขนาดของ RAPD fragment ในจีโนมของนกกระสาปากเหลืองจำนวน 31 ตัวอย่าง ที่เพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ D-03

ขนาด ตัวอย่าง	600	650	750	800	1050	1100	1200	1350	1500	1700	1800
MS01	600	650	750	800	-	1100	1200	1350	1500	-	1800
MS02	600	650	750	800	1050	1100	1200	1350	1500	1700	1800
MS03	600	650	750	800	-	-	1200	1350	1500	1700	1800
MS04	600	650	750	800	1050	1100	1200	-	1500	1700	1800
MS05	600	650	750	800	1050	1100	1200	-	1500	1700	1800
MS06	600	650	750	800	1050	1100	1200	1350	-	1700	1800
MS07	600	650	750	800	-	1100	1200	-	1500	1700	1800
MS08	600	650	750	800	1050	-	1200	1350	1500	-	1800
MS09	600	650	750	800	1050	1100	1200	1350	1500	1700	1800
MS10	600	650	750	800	1050	1100	1200	1350	1500	-	1800
MS11	600	650	750	800	1050	-	1200	1350	-	1700	1800
MS12	600	650	750	800	-	-	1200	-	-	-	1800
MS13	600	650	750	800	1050	-	1200	1350	1500	-	1800
MS14	600	650	750	800	-	-	1200	-	1500	-	1800
MS15	600	650	750	800	1050	1100	1200	-	1500	1700	1800
MS16	600	650	750	800	1050	-	1200	1350	1500	1700	1800
MS17	600	650	750	800	-	-	1200	-	1500	1700	1800
MS18	600	650	750	800	1050	1100	1200	1350	1500	-	1800
MS19	600	650	750	800	1050	-	1200	-	-	-	1800
MS20	600	650	750	800	1050	1100	1200	1350	1500	-	1800
MS21	600	650	750	800	1050	1100	1200	-	1500	-	1800
MS22	600	650	750	800	-	-	1200	1350	1500	-	1800
MS23	600	650	750	800	1050	1100	1200	1350	1500	1700	1800
MS24	600	650	750	800	1050	1100	1200	1350	1500	1700	1800
MS25	600	650	750	800	-	-	1200	1350	-	1700	1800
MS26	600	650	750	800	-	-	1200	1350	1500	1700	1800
MS27	600	650	750	800	1050	-	1200	-	1500	-	1800
MS28	600	650	750	800	1050	1100	1200	-	1500	-	1800
MS29	600	650	750	800	-	-	1200	-	1500	1700	1800
MS30	600	650	750	800	-	-	1200	-	1500	-	1800
MS31	600	650	750	800	1050	1100	1200	-	1500	-	1800

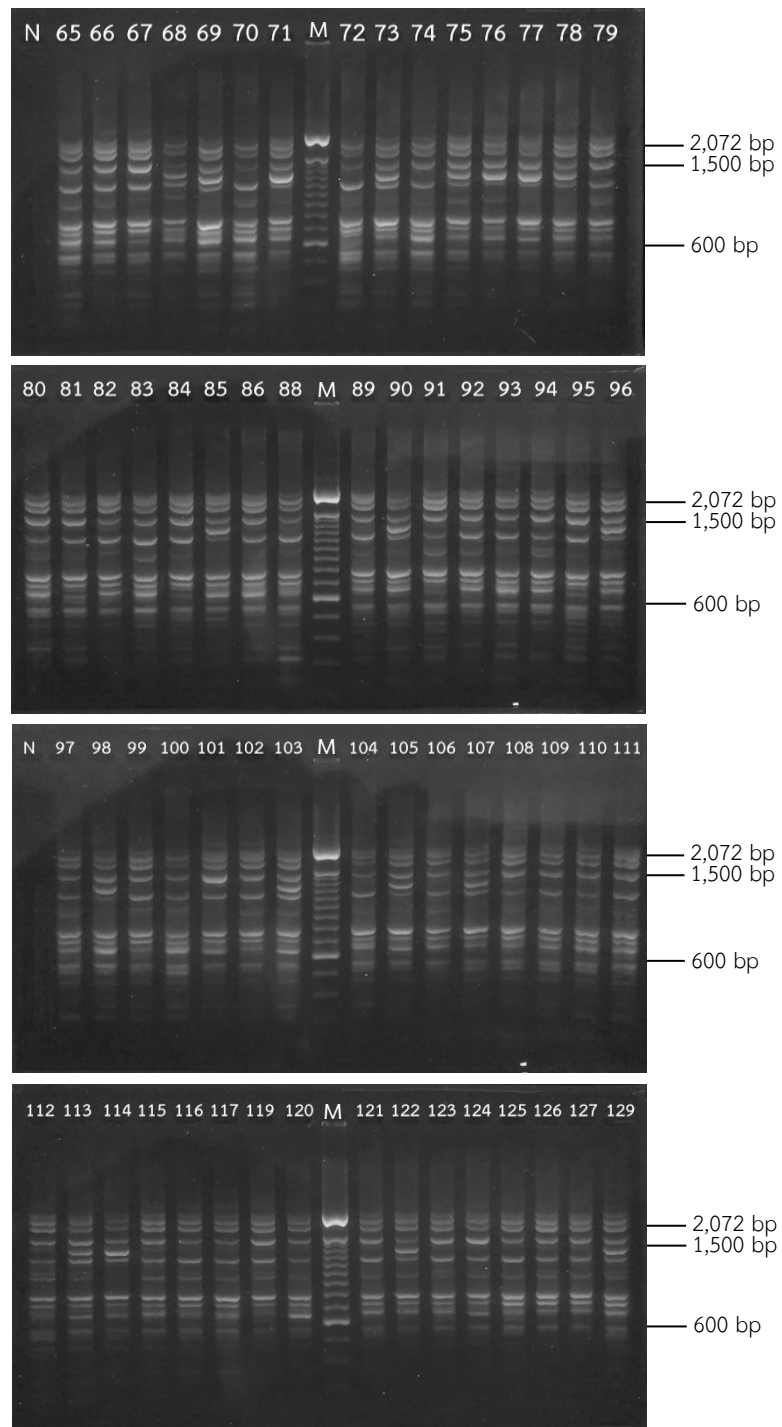
#### 4.2.2 ผลจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ LR7

เนื่องจากไพรเมอร์ D-03 นั้นมีจำนวนของแถบ DNA ที่น้อยซึ่งจึงอาจไม่เหมาะกับการนำมาใช้หาความแตกต่างระหว่างนกทั้งสองชนิดนี้ ดังนั้นผู้วิจัยจึงทดลองใช้ไพรเมอร์ LR7 มาศึกษาเพิ่มเติม และพบว่าจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยไพรเมอร์ LR7 แล้วนำมาตรวจหาขนาดด้วยวิธี agarose gel electrophoresis ของนกกาบบัวจำนวน 170 ตัวอย่าง (ภาพที่ 15) พบว่ามีขนาดของ (RAPD fragment) ทั้งหมด 12 แถบ ได้แก่แถบที่มีขนาด 550, 650, 690, 720, 780, 950, 1000, 1150, 1250, 1350, 1450 และ 1800 โดยพบว่านกกาบบัวทุกตัวอย่างมีการปรากฏของแถบขนาด 550, 650, 690, 720, 780, 1150, 1450 และ 1800 เหมือนกัน ส่วนแถบที่มีขนาด 950, 1000, 1250 และ 1350 พบได้ในนกกาบบัวบางตัวอย่างเท่านั้น (รายละเอียดดังตารางที่ 3) ในส่วนของนกกระสาปากเหลืองจำนวน 49 ตัวอย่างนั้น (ภาพที่ 16) พบว่ามีขนาดของแถบ DNA ทั้งหมด 12 แถบ ได้แก่แถบที่มีขนาด 550, 650, 690, 720, 780, 950, 1000, 1150, 1250, 1350, 1450 และ 1800 โดยพบว่านกกระสาปากเหลืองทุกตัวอย่างมีการปรากฏของแถบขนาด 550, 650, 690, 720, 780, 1150, 1450 และ 1800 เหมือนกัน ส่วนแถบที่มีขนาด 950, 1000, 1250 และ 1350 พบในบางตัวอย่างเท่านั้น (รายละเอียดดังตารางที่ 4)

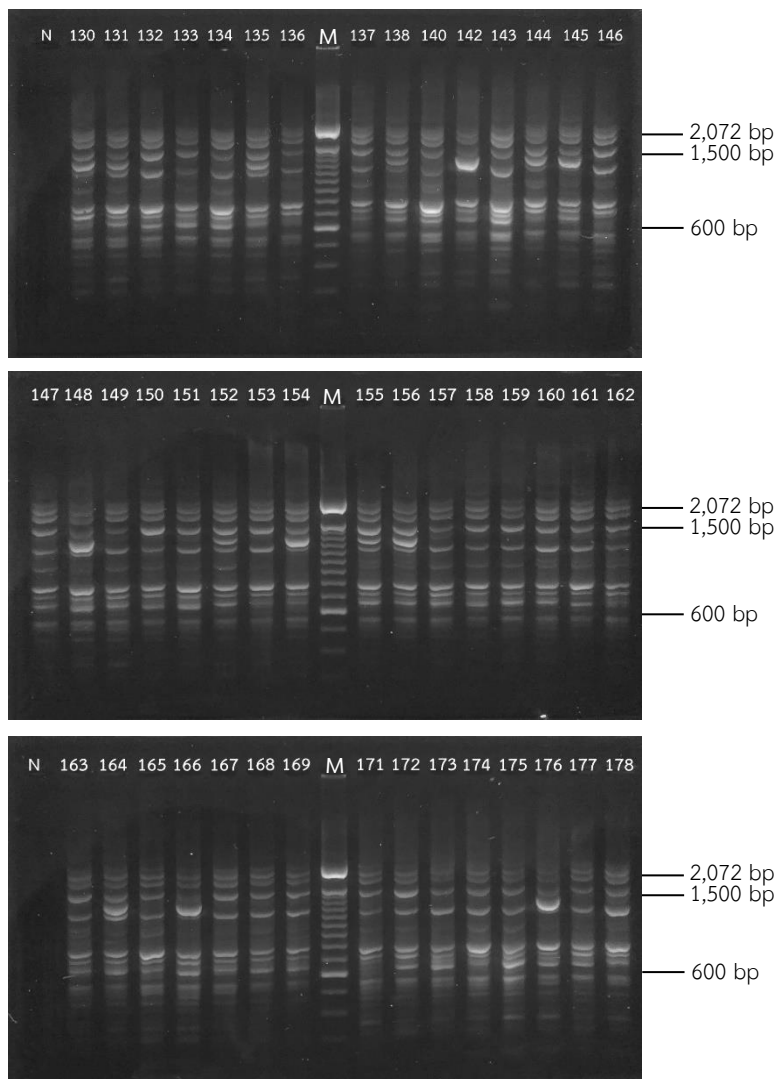
เมื่อเปรียบเทียบขนาดของ RAPD fragment ที่ได้ระหว่างประชากรของนกกาบบัวและนกกระสาปากเหลืองพบว่าทั้ง 12 แถบที่เพิ่มปริมาณได้มีขนาดเท่ากันซึ่งมีจำนวนแถบมากกว่าไพรเมอร์ D-03 จำนวน 1 แถบ และไม่พบแถบที่มีขนาดแตกต่างระหว่างนกทั้งสองชนิด ดังนั้นผลที่ได้จากการทำ gel electrophoresis ของไพรเมอร์ LR7 จึงไม่สามารถใช้ในการระบุชนิดนกได้เช่นกัน



ภาพที่ 17 การตรวจสอบขนาดของ RAPD fragment ที่เพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ LR7 ด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis ที่ 75 โวลต์ เป็นเวลา 95 นาที ของนกกาบบัวตัวอย่างที่ 1-30, 32-45 และ 47-64



ภาพที่ 18 การตรวจสอบขนาดของ RAPD fragment ที่เพิ่มปริมาณด้วยไพโรเมอร์ LR7 ด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis ที่ 75 โวลต์ เป็นเวลา 95 นาที ของนกกาบบัวตัวอย่างที่ 65-86, 88-117, 119-127 และ 129



ภาพที่ 19 การตรวจสอบขนาดของ RAPD fragment ที่เพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ LR7 ด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis ที่ 75 โวลต์ เป็นเวลา 95 นาที ของนกกาบบัวตัวอย่างที่ 130-138, 140, 142-169 และ 171-178

ตารางที่ 3 ขนาดของ RAPD fragment ในจีโนมของนกกาบบัวจำนวน 170 ตัวอย่าง ที่เพิ่ม ปริมาณด้วยไพรเมอร์ LR7

ขนาด ตัวอย่าง	550	650	690	720	780	950	1000	1150	1250	1350	1450	1800
PS01	550	650	690	720	780	950	-	1150	1250	-	1450	1800
PS02	550	650	690	720	780	950	-	1150	1250	-	1450	1800
PS03	550	650	690	720	780	950	-	1150	-	-	1450	1800
PS04	550	650	690	720	780	950	-	1150	-	-	1450	1800
PS05	550	650	690	720	780	950	1000	1150	1250	-	1450	1800
PS06	550	650	690	720	780	950	1000	1150	1250	-	1450	1800
PS07	550	650	690	720	780	950	-	1150	1250	-	1450	1800
PS08	550	650	690	720	780	950	-	1150	1250	-	1450	1800
PS09	550	650	690	720	780	950	1000	1150	1250	-	1450	1800
PS10	550	650	690	720	780	950	1000	1150	1250	-	1450	1800
PS11	550	650	690	720	780	950	-	1150	-	-	1450	1800
PS12	550	650	690	720	780	950	-	1150	-	-	1450	1800
PS13	550	650	690	720	780	-	-	1150	1250	-	1450	1800
PS14	550	650	690	720	780	-	1000	1150	1250	-	1450	1800
PS15	550	650	690	720	780	950	1000	1150	1250	-	1450	1800
PS16	550	650	690	720	780	950	1000	1150	1250	-	1450	1800
PS17	550	650	690	720	780	950	-	1150	-	-	1450	1800
PS18	550	650	690	720	780	950	1000	1150	1250	-	1450	1800
PS19	550	650	690	720	780	950	-	1150	1250	-	1450	1800
PS20	550	650	690	720	780	950	1000	1150	-	-	1450	1800
PS21	550	650	690	720	780	950	-	1150	1250	-	1450	1800
PS22	550	650	690	720	780	950	1000	1150	1250	-	1450	1800
PS23	550	650	690	720	780	950	-	1150	-	1350	1450	1800
PS24	550	650	690	720	780	-	-	1150	1250	-	1450	1800
PS25	550	650	690	720	780	950	-	1150	-	-	1450	1800
PS26	550	650	690	720	780	950	-	1150	-	1350	1450	1800
PS27	550	650	690	720	780	950	1000	1150	-	1350	1450	1800
PS28	550	650	690	720	780	950	1000	1150	1250	-	1450	1800
PS29	550	650	690	720	780	950	-	1150	-	1350	1450	1800
PS30	550	650	690	720	780	950	-	1150	1250	-	1450	1800
PS32	550	650	690	720	780	950	1000	1150	-	-	1450	1800
PS33	550	650	690	720	780	950	1000	1150	-	1350	1450	1800
PS34	550	650	690	720	780	950	1000	1150	1250	-	1450	1800
PS35	550	650	690	720	780	950	1000	1150	-	1350	1450	1800
PS36	550	650	690	720	780	950	1000	1150	-	1350	1450	1800
PS37	550	650	690	720	780	950	-	1150	1250	-	1450	1800
PS38	550	650	690	720	780	950	-	1150	1250	-	1450	1800



ตารางที่ 3 (ต่อ)

ขนาด ตัวอย่าง	550	650	690	720	780	950	1000	1150	1250	1350	1450	1800
PS39	550	650	690	720	780	950	1000	1150	1250	-	1450	1800
PS40	550	650	690	720	780	950	-	1150	-	-	1450	1800
PS41	550	650	690	720	780	-	-	1150	1250	-	1450	1800
PS42	550	650	690	720	780	950	-	1150	-	1350	1450	1800
PS43	550	650	690	720	780	950	1000	1150	-	1350	1450	1800
PS44	550	650	690	720	780	950	1000	1150	1250	-	1450	1800
PS45	550	650	690	720	780	950	-	1150	-	1350	1450	1800
PS47	550	650	690	720	780	950	1000	1150	1250	-	1450	1800
PS48	550	650	690	720	780	950	1000	1150	-	1350	1450	1800
PS49	550	650	690	720	780	950	1000	1150	1250	-	1450	1800
PS50	550	650	690	720	780	950	1000	1150	-	-	1450	1800
PS51	550	650	690	720	780	-	-	1150	-	1350	1450	1800
PS52	550	650	690	720	780	950	1000	1150	-	1350	1450	1800
PS53	550	650	690	720	780	950	-	1150	-	1350	1450	1800
PS54	550	650	690	720	780	950	1000	1150	1250	-	1450	1800
PS55	550	650	690	720	780	950	1000	1150	-	1350	1450	1800
PS56	550	650	690	720	780	950	1000	1150	-	1350	1450	1800
PS57	550	650	690	720	780	950	1000	1150	-	1350	1450	1800
PS58	550	650	690	720	780	950	-	1150	1250	-	1450	1800
PS59	550	650	690	720	780	950	-	1150	-	-	1450	1800
PS60	550	650	690	720	780	950	1000	1150	-	-	1450	1800
PS61	550	650	690	720	780	950	1000	1150	-	1350	1450	1800
PS62	550	650	690	720	780	950	1000	1150	-	-	1450	1800
PS63	550	650	690	720	780	950	-	1150	1250	-	1450	1800
PS64	550	650	690	720	780	-	1000	1150	-	-	1450	1800
PS65	550	650	690	720	780	950	-	1150	-	1350	1450	1800
PS66	550	650	690	720	780	950	-	1150	-	1350	1450	1800
PS67	550	650	690	720	780	-	1000	1150	-	1350	1450	1800
PS68	550	650	690	720	780	-	1000	1150	1250	-	1450	1800
PS69	550	650	690	720	780	-	-	1150	1250	-	1450	1800
PS70	550	650	690	720	780	950	-	1150	-	-	1450	1800
PS71	550	650	690	720	780	950	-	1150	1250	-	1450	1800
PS72	550	650	690	720	780	950	1000	1150	-	-	1450	1800
PS73	550	650	690	720	780	-	-	1150	1250	-	1450	1800
PS74	550	650	690	720	780	-	-	1150	-	-	1450	1800
PS75	550	650	690	720	780	950	-	1150	1250	-	1450	1800
PS76	550	650	690	720	780	950	-	1150	1250	-	1450	1800
PS77	550	650	690	720	780	-	-	1150	1250	-	1450	1800
PS78	550	650	690	720	780	-	-	1150	1250	-	1450	1800

ตารางที่ 3 (ต่อ)

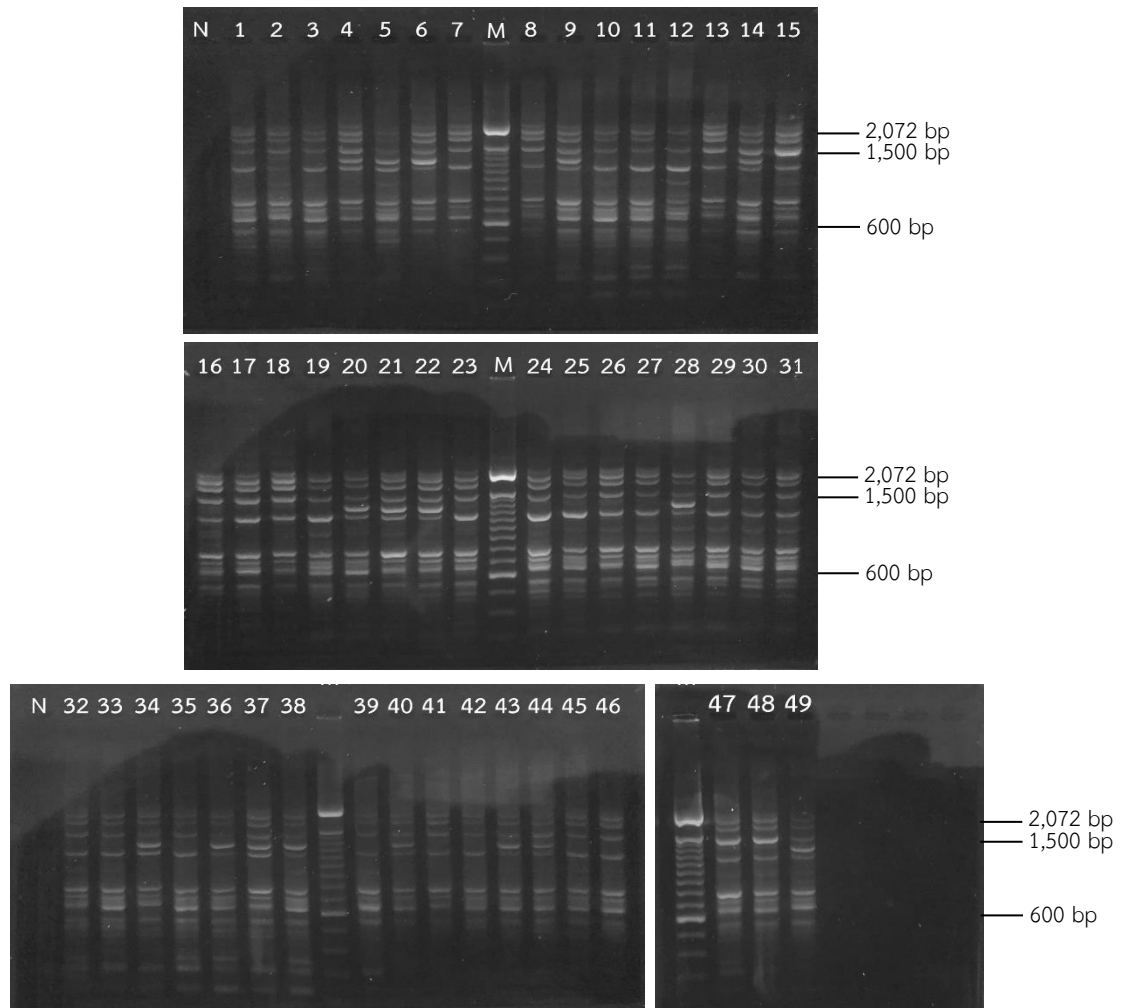
ขนาด ตัวอย่าง	550	650	690	720	780	950	1000	1150	1250	1350	1450	1800
PS79	550	650	690	720	780	950	1000	1150	-	1350	1450	1800
PS80	550	650	690	720	780	950	1000	1150	-	1350	1450	1800
PS81	550	650	690	720	780	950	1000	1150	-	1350	1450	1800
PS82	550	650	690	720	780	-	1000	1150	-	1350	1450	1800
PS83	550	650	690	720	780	950	-	1150	-	-	1450	1800
PS84	550	650	690	720	780	950	1000	1150	-	1350	1450	1800
PS85	550	650	690	720	780	950	-	1150	1250	-	1450	1800
PS86	550	650	690	720	780	950	1000	1150	-	1350	1450	1800
PS88	550	650	690	720	780	950	1000	1150	-	1350	1450	1800
PS89	550	650	690	720	780	950	-	1150	-	-	1450	1800
PS90	550	650	690	720	780	950	1000	1150	1250	-	1450	1800
PS91	550	650	690	720	780	950	1000	1150	-	1350	1450	1800
PS92	550	650	690	720	780	950	-	1150	-	1350	1450	1800
PS93	550	650	690	720	780	950	1000	1150	-	1350	1450	1800
PS94	550	650	690	720	780	950	1000	1150	-	1350	1450	1800
PS95	550	650	690	720	780	950	-	1150	-	1350	1450	1800
PS96	550	650	690	720	780	950	1000	1150	1250	-	1450	1800
PS97	550	650	690	720	780	950	1000	1150	-	-	1450	1800
PS98	550	650	690	720	780	-	-	1150	1250	-	1450	1800
PS99	550	650	690	720	780	950	1000	1150	-	-	1450	1800
PS100	550	650	690	720	780	950	1000	1150	-	-	1450	1800
PS101	550	650	690	720	780	-	-	1150	-	1350	1450	1800
PS102	550	650	690	720	780	950	-	1150	-	1350	1450	1800
PS103	550	650	690	720	780	950	-	1150	1250	-	1450	1800
PS104	550	650	690	720	780	950	1000	1150	-	1350	1450	1800
PS105	550	650	690	720	780	950	1000	1150	1250	1350	1450	1800
PS106	550	650	690	720	780	950	1000	1150	-	-	1450	1800
PS107	550	650	690	720	780	-	-	1150	1250	-	1450	1800
PS108	550	650	690	720	780	950	1000	1150	-	1350	1450	1800
PS109	550	650	690	720	780	950	1000	1150	-	-	1450	1800
PS110	550	650	690	720	780	950	1000	1150	-	1350	1450	1800
PS111	550	650	690	720	780	950	-	1150	-	-	1450	1800
PS112	550	650	690	720	780	950	1000	1150	-	1350	1450	1800
PS113	550	650	690	720	780	950	1000	1150	1250	1350	1450	1800
PS114	550	650	690	720	780	-	-	1150	1250	1350	1450	1800
PS115	550	650	690	720	780	950	-	1150	-	1350	1450	1800
PS116	550	650	690	720	780	950	1000	1150	-	1350	1450	1800
PS117	550	650	690	720	780	950	-	1150	-	1350	1450	1800
PS119	550	650	690	720	780	950	1000	1150	-	1350	1450	1800

ตารางที่ 3 (ต่อ)

ขนาด ตัวอย่าง	550	650	690	720	780	950	1000	1150	1250	1350	1450	1800
PS120	550	650	690	720	780	950	-	1150	-	1350	1450	1800
PS121	550	650	690	720	780	950	-	1150	-	1350	1450	1800
PS122	550	650	690	720	780	950	-	1150	1250	1350	1450	1800
PS123	550	650	690	720	780	950	1000	1150	-	1350	1450	1800
PS124	550	650	690	720	780	950	1000	1150	-	1350	1450	1800
PS125	550	650	690	720	780	950	-	1150	-	1350	1450	1800
PS126	550	650	690	720	780	950	1000	1150	-	1350	1450	1800
PS127	550	650	690	720	780	950	-	1150	-	1350	1450	1800
PS129	550	650	690	720	780	950	1000	1150	1250	1350	1450	1800
PS130	550	650	690	720	780	950	-	1150	1250	-	1450	1800
PS131	550	650	690	720	780	950	1000	1150	1250	-	1450	1800
PS132	550	650	690	720	780	-	1000	1150	-	-	1450	1800
PS133	550	650	690	720	780	950	-	1150	-	-	1450	1800
PS134	550	650	690	720	780	950	-	1150	-	-	1450	1800
PS135	550	650	690	720	780	-	-	1150	1250	-	1450	1800
PS136	550	650	690	720	780	950	1000	1150	-	-	1450	1800
PS137	550	650	690	720	780	950	-	1150	-	-	1450	1800
PS138	550	650	690	720	780	950	-	1150	1250	-	1450	1800
PS140	550	650	690	720	780	950	1000	1150	-	-	1450	1800
PS142	550	650	690	720	780	-	-	1150	1250	-	1450	1800
PS143	550	650	690	720	780	-	-	1150	-	-	1450	1800
PS144	550	650	690	720	780	950	1000	1150	1250	-	1450	1800
PS145	550	650	690	720	780	950	1000	1150	1250	-	1450	1800
PS146	550	650	690	720	780	950	1000	1150	-	-	1450	1800
PS147	550	650	690	720	780	950	-	1150	-	1350	1450	1800
PS148	550	650	690	720	780	950	1000	1150	1250	-	1450	1800
PS149	550	650	690	720	780	950	-	1150	-	1350	1450	1800
PS150	550	650	690	720	780	950	1000	1150	-	1350	1450	1800
PS151	550	650	690	720	780	950	-	1150	-	1350	1450	1800
PS152	550	650	690	720	780	950	-	1150	1250	-	1450	1800
PS153	550	650	690	720	780	950	-	1150	-	1350	1450	1800
PS154	550	650	690	720	780	-	-	1150	1250	-	1450	1800
PS155	550	650	690	720	780	950	1000	1150	1250	-	1450	1800
PS156	550	650	690	720	780	950	1000	1150	1250	1350	1450	1800
PS157	550	650	690	720	780	950	1000	1150	-	1350	1450	1800
PS158	550	650	690	720	780	950	1000	1150	-	1350	1450	1800
PS159	550	650	690	720	780	950	-	1150	-	1350	1450	1800
PS160	550	650	690	720	780	950	1000	1150	-	1350	1450	1800
PS161	550	650	690	720	780	950	1000	1150	-	1350	1450	1800

ตารางที่ 3 (ต่อ)

ขนาด ตัวอย่าง	550	650	690	720	780	950	1000	1150	1250	1350	1450	1800
PS162	550	650	690	720	780	950	1000	1150	-	1350	1450	1800
PS163	550	650	690	720	780	950	1000	1150	-	-	1450	1800
PS164	550	650	690	720	780	950	-	1150	1250	-	1450	1800
PS165	550	650	690	720	780	950	1000	1150	-	-	1450	1800
PS166	550	650	690	720	780	950	-	1150	1250	-	1450	1800
PS167	550	650	690	720	780	950	1000	1150	-	1350	1450	1800
PS162	550	650	690	720	780	950	1000	1150	-	1350	1450	1800
PS163	550	650	690	720	780	950	1000	1150	-	-	1450	1800
PS164	550	650	690	720	780	950	-	1150	1250	-	1450	1800
PS165	550	650	690	720	780	950	1000	1150	-	-	1450	1800
PS166	550	650	690	720	780	950	-	1150	1250	-	1450	1800
PS167	550	650	690	720	780	950	1000	1150	-	1350	1450	1800
PS168	550	650	690	720	780	950	1000	1150	-	1350	1450	1800
PS169	550	650	690	720	780	950	-	1150	-	1350	1450	1800
PS171	550	650	690	720	780	950	-	1150	-	-	1450	1800
PS172	550	650	690	720	780	950	-	1150	-	1350	1450	1800
PS173	550	650	690	720	780	950	-	1150	-	-	1450	1800
PS174	550	650	690	720	780	950	1000	1150	-	-	1450	1800
PS175	550	650	690	720	780	950	-	1150	-	-	1450	1800
PS176	550	650	690	720	780	950	-	1150	1250	-	1450	1800
PS177	550	650	690	720	780	-	-	1150	-	-	1450	1800
PS178	550	650	690	720	780	950	1000	1150	1250	-	1450	1800



ภาพที่ 20 การตรวจสอบขนาดของ RAPD fragment ที่เพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ LR7 ด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis ที่ 75 โวลต์ เป็นเวลา 95 นาที ของนกกระสาปากเหลืองตัวอย่างที่ 1 - 49

ตารางที่ 4 ขนาดของ RAPD fragment ในจีโนมของนกกระสาปากเหลืองจำนวน 49 ตัวอย่าง ที่เพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ LR7

ขนาด ตัวอย่าง	550	650	690	720	780	950	1000	1150	1250	1350	1450	1800
MS01	550	650	690	720	780	950	-	1150	-	-	1450	1800
MS02	550	650	690	720	780	950	-	1150	-	1350	1450	1800
MS03	550	650	690	720	780	950	-	1150	-	-	1450	1800
MS04	550	650	690	720	780	-	-	1150	1250	-	1450	1800
MS05	550	650	690	720	780	950	-	1150	1250	-	1450	1800
MS06	550	650	690	720	780	-	-	1150	1250	-	1450	1800
MS07	550	650	690	720	780	-	-	1150	-	-	1450	1800
MS08	550	650	690	720	780	950	-	1150	-	1350	1450	1800
MS09	550	650	690	720	780	-	-	1150	1250	-	1450	1800
MS10	550	650	690	720	780	950	1000	1150	-	1350	1450	1800
MS11	550	650	690	720	780	-	-	1150	-	-	1450	1800
MS12	550	650	690	720	780	950	-	1150	-	-	1450	1800
MS13	550	650	690	720	780	-	-	1150	-	-	1450	1800
MS14	550	650	690	720	780	950	-	1150	1250	-	1450	1800
MS15	550	650	690	720	780	950	1000	1150	-	-	1450	1800
MS16	550	650	690	720	780	950	1000	1150	-	1350	1450	1800
MS17	550	650	690	720	780	-	-	1150	-	1350	1450	1800
MS18	550	650	690	720	780	-	-	1150	-	1350	1450	1800
MS19	550	650	690	720	780	950	-	1150	-	-	1450	1800
MS20	550	650	690	720	780	950	1000	1150	1250	-	1450	1800
MS21	550	650	690	720	780	950	-	1150	1250	-	1450	1800
MS22	550	650	690	720	780	950	-	1150	1250	-	1450	1800
MS23	550	650	690	720	780	950	1000	1150	-	-	1450	1800
MS24	550	650	690	720	780	950	1000	1150	-	-	1450	1800
MS25	550	650	690	720	780	950	-	1150	-	1350	1450	1800
MS26	550	650	690	720	780	950	-	1150	-	1350	1450	1800
MS27	550	650	690	720	780	950	1000	1150	1250	-	1450	1800
MS28	550	650	690	720	780	950	-	1150	-	-	1450	1800
MS29	550	650	690	720	780	950	-	1150	-	-	1450	1800
MS30	550	650	690	720	780	950	-	1150	-	-	1450	1800
MS31	550	650	690	720	780	950	1000	1150	-	1350	1450	1800
MS32	550	650	690	720	780	950	-	1150	-	-	1450	1800
MS33	550	650	690	720	780	950	1000	1150	-	1350	1450	1800
MS34	550	650	690	720	780	-	-	1150	1250	-	1450	1800
MS35	550	650	690	720	780	-	-	1150	-	-	1450	1800
MS36	550	650	690	720	780	950	-	1150	1250	-	1450	1800
MS37	550	650	690	720	780	950	-	1150	1250	-	1450	1800

ตารางที่ 4 (ต่อ)

ขนาด ตัวอย่าง	550	650	690	720	780	950	1000	1150	1250	1350	1450	1800
MS38	550	650	690	720	780	950	-	1150	1250	-	1450	1800
MS39	550	650	690	720	780	950	-	1150	-	-	1450	1800
MS40	550	650	690	720	780	-	-	1150	1250	-	1450	1800
MS41	550	650	690	720	780	-	-	1150	-	-	1450	1800
MS42	550	650	690	720	780	-	-	1150	-	-	1450	1800
MS43	550	650	690	720	780	950	-	1150	1250	-	1450	1800
MS44	550	650	690	720	780	950	-	1150	1250	1350	1450	1800
MS45	550	650	690	720	780	950	-	1150	-	-	1450	1800
MS46	550	650	690	720	780	950	-	1150	-	-	1450	1800
MS47	550	650	690	720	780	950	-	1150	-	1350	1450	1800
MS48	550	650	690	720	780	950	1000	1150	-	1350	1450	1800
MS38	550	650	690	720	780	950	-	1150	1250	-	1450	1800
MS39	550	650	690	720	780	950	-	1150	-	-	1450	1800
MS40	550	650	690	720	780	-	-	1150	1250	-	1450	1800
MS41	550	650	690	720	780	-	-	1150	-	-	1450	1800
MS42	550	650	690	720	780	-	-	1150	-	-	1450	1800
MS43	550	650	690	720	780	950	-	1150	1250	-	1450	1800
MS44	550	650	690	720	780	950	-	1150	1250	1350	1450	1800
MS45	550	650	690	720	780	950	-	1150	-	-	1450	1800
MS46	550	650	690	720	780	950	-	1150	-	-	1450	1800
MS47	550	650	690	720	780	950	-	1150	-	1350	1450	1800
MS48	550	650	690	720	780	950	1000	1150	-	1350	1450	1800
MS49	550	650	690	720	780	950	-	1150	1250	-	1450	1800

### 4.3 ผลการทำ genotyping ด้วยวิธี Genescan

เนื่องจากการตรวจสอบขนาด RAPD fragment ในจีโนมของนกกาบบัวและนกกระสาปากเหลือง ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis นั้นไม่สามารถทราบถึงขนาดของดีเอ็นเอที่แน่นอนที่จะนำมาใช้หาความแตกต่างระหว่างนกทั้งสองชนิดนี้ได้ ดังนั้นในการศึกษาคั้งนี้จึงได้ทำ genotyping ด้วยวิธี Genescan เพิ่มเติม โดยในเบื้องต้นได้ส่งตัวอย่างจำนวน 47 ตัวอย่าง (รายละเอียดดังตารางที่ 5) ไปวิเคราะห์หาขนาดอัลลีลทั้งหมดที่โลคัส LR7 โดยผลที่ได้พบว่ากลุ่มนกที่มีลักษณะสีฐานภายนอกคล้ายนกกาบบัวพันธุ์แท้ (Pure PS) มีจำนวนอัลลีลทั้งหมด 122 อัลลีล (ตารางที่ 6) นกที่มีลักษณะ intermediate ระหว่างนกทั้งสองชนิดแต่มีสีฐานภายนอกคล้ายคลึงกับนกกาบบัวมากกว่า นกกระสาปากเหลือง (IPS) มีจำนวนอัลลีลทั้งหมด 144 อัลลีล (ตารางที่ 7) กลุ่มนกที่มีลักษณะสีฐานภายนอกคล้ายนกกระสาปากเหลืองพันธุ์แท้ (Pure MS) มีจำนวนอัลลีลทั้งหมด 115 อัลลีล (ตารางที่ 8) และนกที่มีลักษณะ intermediate ระหว่างนกทั้งสองชนิดแต่มีสีฐานภายนอกคล้ายคลึงกับนกกระสาปากเหลืองมากกว่านกกาบบัว (IMS) มีจำนวนอัลลีลทั้งหมด 104 อัลลีล (ตารางที่ 8) ซึ่งเมื่อนำผลขนาดของอัลลีลในกลุ่มประชากรนกที่มีลักษณะสีฐานภายนอกคล้ายนกกาบบัวพันธุ์แท้ (Pure PS) มาเปรียบเทียบกับกลุ่มประชากรนกที่มีลักษณะสีฐานภายนอกคล้ายนกกระสาปากเหลืองพันธุ์แท้ (Pure MS) พบว่ามี

อัลลีลจำนวน 2 อัลลีลที่พบได้เฉพาะในประชากรของนกกระสาปากเหลืองพันธุ์แท้เท่านั้น คืออัลลีลที่มีขนาด 1055 และ 1070 คู่เบส ซึ่งในกลุ่มนกที่มีลักษณะสีฐานภายนอกคล้ายนกกาบบัวพันธุ์แท้ (Pure PS) นั้นไม่พบอัลลีลขนาดดังกล่าว และเมื่อนำอัลลีลทั้งสองไปตรวจสอบในกลุ่มนกที่มีลักษณะสีฐานภายนอกคล้ายคลึงกับนกกาบบัวมากกว่านกกระสาปากเหลือง (IPS) ก็พบอัลลีลดังกล่าวในตัวอย่างที่ IPS 11, IPS 24, IPS 40, IPS 85, IPS 96, IPS 109, IPS 133, IPS 156, IPS 163 และ IPS 169 แต่ในส่วนตัวอย่าง IPS 98 พบอัลลีลขนาด 1055 เท่านั้น ซึ่งเมื่อนำผลที่ได้มาวิเคราะห์ร่วมกับข้อมูล mitochondrial DNA ที่ได้จากการศึกษาของกขพร และคณะ พบว่าตัวอย่างที่ IPS 78, IPS 85, IPS 96, IPS 133 และ IPS 177 มี mitochondrial DNA ของนกกระสาปากเหลืองทำให้สามารถระบุได้ว่ากลุ่มดังกล่าวเป็นลูกผสมของนกกาบบัวและนกกระสาปากเหลืองได้ทันที ในขณะที่ตัวอย่าง IPS 11, IPS 40, IPS 98, IPS 119 และ IPS 156 มี mitochondrial DNA ของนกกาบบัวจึงยังไม่สามารถสรุปได้ว่าเป็นลูกผสมหรือไม่ แต่เมื่อพิจารณาผลที่ได้จาก nuclear DNA พบว่า IPS 11, IPS 40, IPS 98 และ IPS 156 มีอัลลีลที่จำเพาะต่อนกกระสาปากเหลือง จึงทำให้สามารถสรุปได้ว่ากลุ่มดังกล่าวเป็นลูกผสมเช่นกัน ดังนั้นในการศึกษาคั้งนี้จึงสามารถนำอัลลีลขนาด 1055 และ 1070 มาใช้เป็นเครื่องหมายพันธุกรรมในการระบุชนิดของนกสำหรับการประเมินการข้ามสายพันธุ์ได้

จากการวิเคราะห์ผลข้อมูลร่วมกันระหว่างลักษณะสีฐานภายนอก ประกอบกับ mitochondrial DNA และ nuclear DNA ทำให้สามารถสรุปได้ว่า พบการผสมข้ามสายพันธุ์ระหว่างนกกาบบัวและนกกระสาปากเหลืองที่เพาะเลี้ยงในสวนสัตว์ดุสิต โดยคาดว่า มี putative hybrid อย่างน้อย 11 ตัวในประชากรของนกกาบบัว ซึ่งการผสมข้ามสายพันธุ์ที่พบอาจเกิดได้สองทิศทาง (bidirectional hybridization)



ตารางที่ 5 รายชื่อตัวอย่างที่ส่งไปหาขนาดของอัลลีลที่โลคัส LR7 ที่ด้วยวิธี Genescan

กลุ่มตัวอย่าง	รายชื่อตัวอย่าง	N
นกที่มีลักษณะพื้นฐาน ภายนอกคล้ายนกกาบบัวพันธุ์ แท้ (Pure PS)	PS19, PS27, PS52, PS59, PS67, PS75, PS126, PS131, PS147, PS164	10
นกที่มีลักษณะ intermediate ระหว่างนกทั้งสองชนิดแต่มี ลักษณะภายนอกคล้ายคลึงกับ นกกาบบัวมากกว่านกกระสา ปากเหลือง (IPS)	IPS03, IPS11, IPS23, IPS24, IPS40, IPS78, IPS85, IPS96, IPS98, IPS101, IPS109, IPS119, IPS123, IPS124, IPS133, IPS134, IPS135, IPS156, IPS163, IPS168, IPS169, IPS172, IPS177	23
นกที่มีลักษณะพื้นฐาน ภายนอกคล้ายนกกระสาปาก เหลืองพันธุ์แท้ (Pure MS)	MS02, MS09, MS15, MS16, MS29, MS31, MS37, MS41, MS47	9
นกที่มีลักษณะ intermediate ระหว่างนกทั้งสองชนิดแต่มี ลักษณะภายนอกคล้ายคลึงกับ นกกระสาปากเหลืองมากกว่า นกกาบบัว (IMS)	IMS22, IMS24, IMS30, IMS36, IMS38	5

ตารางที่ 6 ขนาดของอัลลีลทั้งหมดที่โลคัส LR7 ของนกที่มีลักษณะสัณฐานภายนอกคล้ายนก  
กาบบัวพันธุ์แท้

ขนาดอัลลีล (คู่เบส)	PS19	PS27	PS52	PS59	PS67	PS75	PS126	PS131	PS147	PS164
92	92	92	92	92	92	92	92	92	92	92
142	142	142	-	142	142	142	142	142	-	-
213	-	213	-	213	213	213	213	213	-	-
215	-	-	-	-	215	215	215	215	-	-
228	-	228	-	228	-	228	228	-	228	-
230	-	230	-	230	-	230	230	-	230	-
236	-	-	-	236	236	236	236	236	236	236
240	-	-	240	-	-	-	-	-	-	-
248	-	-	-	-	-	248	248	248	-	248
269	-	-	-	269	-	-	-	-	-	-
271	-	-	271	-	-	-	-	-	-	-
289	-	-	-	289	-	289	-	-	-	-
291	-	-	291	-	-	-	-	-	-	-
302	-	-	-	-	302	302	302	302	-	-
305	305	-	-	305	305	305	305	305	305	305
307	307	-	-	307	307	307	307	307	307	307
314	-	-	314	-	-	-	-	-	-	-
318	-	-	-	318	318	318	318	318	-	-
320	-	-	-	320	320	320	320	320	320	320
325	-	-	-	-	325	325	325	325	-	-
327	-	-	-	327	-	-	-	-	-	-
329	-	-	329	-	-	-	-	-	-	-
352	-	-	-	352	352	352	-	352	352	352
355	-	-	-	355	355	355	-	355	355	355
376	-	-	-	376	376	376	376	376	376	376
426	426	-	-	426	426	426	426	426	426	426
428	428	-	-	428	428	428	428	428	428	428
433	-	-	-	-	433	433	433	433	433	-
446	-	-	-	446	-	-	-	-	-	-
449	-	-	449	-	-	-	-	-	-	-
457	457	457	-	457	457	457	457	457	457	457
459	459	459	-	459	459	459	459	459	459	459
490	-	490	-	-	490	-	490	-	-	-
517	517	517	517	517	517	517	517	517	517	517
525	525	525	-	525	525	525	525	525	525	525
527	527	527	-	527	527	527	527	527	527	527
532	-	-	-	-	-	532	-	-	-	-
537	-	-	-	537	537	537	537	537	-	-
540	540	540	540	540	540	540	540	540	540	540
546	546	546	546	546	546	546	546	546	546	546
558	558	558	-	558	558	558	558	558	558	558
560	560	560	560	560	560	560	560	560	560	560
566	-	-	-	566	566	566	-	566	-	566
593	-	-	-	593	-	-	-	-	-	-

## ตารางที่ 6 (ต่อ)

ขนาดอัลลิท (คู่เบส)	PS19	PS27	PS52	PS59	PS67	PS75	PS126	PS131	PS147	PS164
596	-	-	596	-	-	-	-	-	-	-
599	-	-	599	-	-	599	599	-	-	-
604	604	604	604	604	604	604	604	604	-	604
620	620	620	620	620	620	620	620	620	620	620
622	622	622	622	622	622	622	622	622	622	622
626	626	-	626	-	626	626	626	626	626	626
628	628	628	-	628	-	-	-	-	-	-
633	-	-	633	-	-	-	-	-	-	633
642	-	-	642	-	-	-	-	-	-	642
650	650	650	650	650	-	650	650	650	650	650
652	-	-	-	652	652	652	652	652	652	652
654	-	-	-	654	654	654	654	654	654	654
659	659	659	659	659	-	659	659	659	659	659
682	682	682	682	682	682	682	682	682	682	682
685	685	685	685	685	685	685	685	685	685	685
688	-	-	-	688	688	688	688	688	688	688
693	-	-	-	693	693	693	693	693	-	-
718	718	-	-	-	-	-	718	718	-	718
720	720	720	720	720	720	720	720	720	720	720
729	729	-	-	-	-	-	729	729	-	729
731	731	731	731	731	731	731	731	731	731	731
747	-	-	-	-	-	747	-	747	-	-
751	751	751	-	751	751	751	751	751	751	751
757	-	757	-	757	757	757	757	757	-	757
778	778	778	778	778	778	778	778	778	778	778
783	783	783	783	783	783	783	783	783	783	783
788	788	788	788	788	788	788	788	788	788	788
805	805	805	-	-	805	805	-	805	805	805
807	-	-	-	-	-	-	807	-	-	-
815	815	-	-	-	-	815	815	815	-	-
820	820	-	-	-	-	820	820	820	-	-
832	-	-	-	832	-	832	-	832	-	-
835	-	-	-	835	-	835	-	-	-	-
841	-	841	-	841	-	-	-	-	-	-
857	857	857	-	857	-	857	857	857	857	857
864	-	864	-	-	-	864	864	864	864	864
880	-	-	-	-	880	880	-	-	-	-
887	-	-	-	887	-	887	887	887	-	-
891	-	891	-	-	891	891	891	-	-	891
894	-	894	-	-	894	894	894	894	-	-
897	-	-	-	-	897	-	-	-	-	-
903	-	-	-	-	903	903	903	903	903	903
910	-	-	-	-	910	910	910	910	910	-
918	-	-	-	-	918	918	918	-	918	-
952	952	952	952	952	-	-	952	-	952	952
958	958	958	958	958	-	-	958	-	958	-

ตารางที่ 6 (ต่อ)

ขนาดอัลลีล (คู่เบส)	PS19	PS27	PS52	PS59	PS67	PS75	PS126	PS131	PS147	PS164
963	963	963	963	963	-	963	963	-	-	-
965	-	-	-	-	965	-	-	965	965	965
998	-	998	-	998	998	998	998	998	998	998
1010	1010	1010	1010	1010	-	-	1010	-	1010	-
1014	-	-	-	-	1014	-	-	1014	-	1014
1016	1016	1016	1016	1016	-	1016	1016	-	1016	-
1022	-	-	-	-	1022	-	1022	1022	-	1022
1025	-	-	-	-	-	-	1025	-	-	-
1029	-	-	-	-	1029	-	-	1029	-	1029
1032	1032	1032	-	1032*	-	1032	1032	-	1032	-
1041	-	-	-	-	-	-	1041	-	-	-
1048	1048	1048	-	-	-	-	1048	1048	-	-
1050	-	-	-	-	1050	1050	-	-	-	-
1065	-	-	-	-	-	1065	-	-	-	-
1076	-	1076	-	1076	1076	1076	1076	1076	1076	1076
1100	1100	1100	1100	1100	1100	1106	1100	1100	1100	1100
1103	-	-	-	-	-	-	-	-	1103	-
1106	1106	1106	1106	1106	1106	1106	1106	1106	1106	1106
1111	-	-	-	-	-	1111	1111	-	-	-
1120	1120	-	-	1120	-	-	1120	-	-	-
1133	-	-	-	-	-	1133	1133	-	-	-
1156	1156	-	-	1156	-	-	-	-	-	-
1158	-	1158	1158	-	1158	1158	1158	1158	1158	1158
1165	-	-	-	1165	-	1165	-	-	-	-
1167	1167	1167	-	-	1167	-	-	1167	1167	1167
1169	-	-	1169	-	-	-	1169	-	-	-
1175	-	-	1175	1175	-	-	-	-	-	-
1181	-	-	-	-	-	1181	-	-	-	-
1186	-	-	-	-	-	1186	-	-	-	-
1192	-	-	1192	1192	-	-	-	1192	-	1192
1195	1195	1195	1195	1195	1195	1195	1195	1195	1195	-
1200	-	-	1200	1200	-	1200	-	1200	-	1200

ตารางที่ 7 ขนาดของอัลลีลทั้งหมดที่โลคัส LR7 ของนกที่มีลักษณะสัณฐานภายนอกคล้ายนก  
กาบัวพันธุ์ผสม

ขนาดอัลลีล (คู่เบส)	92	142	213	228	230	236	240	243	248	273	276	280	293	296	302	305
IPS03	92	142	213	228	230	236	-	-	248	-	-	-	-	-	302	305
IPS11	92	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IPS23	92	-	-	228	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IPS24	92	-	-	228	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IPS40	92	142	-	228	230	236	-	-	248	-	-	-	-	-	302	305
IPS78	92	142	-	-	-	236	-	243	-	-	276	-	-	-	-	305
IPS85	92	142	-	228	230	236	-	-	248	-	-	280	-	-	-	305
IPS96	92	-	-	228	230	236	-	243	-	-	276	-	-	296	-	305
IPS98	92	-	213	-	-	236	-	-	-	-	-	-	-	-	-	305
IPS101	92	-	-	-	-	-	-	-	248	-	-	-	-	-	302	305
IPS109	92	142	213	228	230	236	-	-	-	-	-	-	-	-	302	305
IPS119	92	142	-	-	-	236	-	-	-	-	-	-	-	-	-	305
IPS123	92	142	-	228	230	236	-	-	-	-	-	-	-	-	302	305
IPS124	92	-	-	228	230	236	-	-	-	-	-	-	-	-	302	305
IPS133	92	142	-	-	-	236	-	-	-	-	-	-	-	-	-	305
IPS134	92	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IPS135	92	142	-	228	230	236	-	-	-	-	-	-	-	-	302	305
IPS156	92	142	-	228	230	236	-	-	248	-	-	-	-	-	-	305
IPS163	92	-	-	-	-	236	-	-	-	-	-	-	-	-	-	305
IPS168	92	-	-	228	230	236	-	243	-	-	276	-	-	296	-	305
IPS169	92	-	-	228	-	236	240	-	-	273	-	-	293	-	-	305
IPS172	92	142	-	-	-	236	-	-	248	-	-	-	-	-	302	305
IPS177	92	-	-	228	230	-	240	-	-	273	-	-	293	-	-	305

ขนาดอัลลีล (คู่เบส)	307	318	320	325	352	355	366	370	376	426	428	433	451	457	459	462
IPS03	307	318	320	325	352	355	-	-	376	426	428	433	-	457	459	-
IPS11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	426	428	-	-	457	459	-
IPS23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	457	459	-
IPS24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	457	459	-
IPS40	307	318	320	325	-	-	-	-	376	-	-	433	-	457	459	-
IPS78	307	-	320	-	-	-	366	-	376	426	428	433	-	457	459	-
IPS85	307	-	320	325	352	355	-	370	376	426	428	433	-	457	459	462
IPS96	307	-	320	-	352	355	366	-	-	426	428	-	-	457	459	-
IPS98	307	318	320	-	352	355	-	-	376	426	428	-	-	457	459	-
IPS101	307	318	320	-	352	355	-	-	376	426	428	-	-	457	459	-
IPS109	307	318	320	-	352	355	-	-	376	426	428	-	-	457	459	-
IPS119	307	318	320	-	352	355	-	-	376	426	428	-	-	457	459	-
IPS123	307	318	320	-	-	-	-	-	376	426	428	-	-	457	459	-
IPS124	307	318	320	-	352	355	-	-	376	426	428	-	-	457	459	-
IPS133	307	-	-	-	-	-	-	-	376	426	428	433	-	457	459	-
IPS134	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	457	459	-
IPS135	307	318	320	325	352	355	-	-	376	426	428	-	-	457	459	-
IPS156	307	-	-	-	-	-	-	-	-	426	428	433	-	457	459	-
IPS163	307	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	457	459	-
IPS168	307	-	320	-	352	355	366	-	-	426	428	-	-	457	459	-
IPS169	307	318	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	451	457	459	-
IPS172	307	318	320	-	352	355	-	-	376	426	428	-	-	457	459	-
IPS177	307	318	-	-	352	355	-	-	-	426	428	-	451	457	459	-

## ตารางที่ 7 (ต่อ)

ขนาดอัลลิล (คู่เบส)	490	504	506	510	517	525	527	537	540	546	549	551	553	556	558	560
IPS03	-	-	-	-	517	525	527	537	540	546	-	-	-	-	558	560
IPS11	490	-	-	-	-	525	-	-	540	546	-	-	-	-	558	560
IPS23	490	-	-	-	517	525	-	-	540	546	-	-	-	-	558	560
IPS24	-	-	-	-	517	525	-	-	540	546	-	-	-	-	558	560
IPS40	490	-	-	-	517	525	527	537	540	546	-	-	-	-	558	560
IPS78	490	504	-	-	517	525	527	-	540	546	549	-	-	-	558	560
IPS85	490	-	-	510	-	-	527	-	540	546	-	-	553	556	558	560
IPS96	490	-	506	-	-	-	-	-	540	546	-	551	-	-	558	560
IPS98	-	-	-	-	517	525	527	537	540	546	-	-	-	-	558	560
IPS101	-	-	-	-	517	525	-	537	540	546	-	-	-	-	558	560
IPS109	-	-	-	-	517	525	527	537	540	546	-	-	-	-	558	560
IPS119	-	-	-	-	517	525	-	537	540	546	-	-	-	-	558	560
IPS123	-	-	-	-	517	525	-	537	540	546	-	-	-	-	558	560
IPS124	490	-	-	-	517	525	-	537	540	546	-	-	-	-	558	560
IPS133	-	-	-	-	517	525	-	537	540	546	-	-	-	-	558	560
IPS134	-	-	-	-	517	525	-	-	540	546	-	-	-	-	558	560
IPS135	-	-	-	-	517	525	527	537	540	546	-	-	-	-	558	560
IPS156	490	-	-	-	517	525	527	537	540	546	-	-	-	-	558	560
IPS163	-	-	-	-	517	525	-	-	540	546	-	-	-	-	558	560
IPS168	-	504	-	-	517	525	-	-	540	546	549	-	-	-	558	560
IPS169	-	-	-	-	-	525	-	-	540	546	-	-	-	-	558	560
IPS172	490	-	-	-	517	525	527	537	540	546	-	-	-	-	558	560
IPS177	490	-	-	-	-	525	527	-	540	546	-	-	-	-	558	560

ขนาดอัลลิล (คู่เบส)	566	599	601	604	607	620	622	626	628	631	633	640	642	650	652	654
IPS03	566	599	-	604	-	620	622	626	-	-	-	-	-	650	652	654
IPS11	-	599	-	-	-	-	-	626	-	-	-	-	-	650	652	654
IPS23	-	599	-	-	-	620	622	626	-	-	-	-	-	650	-	-
IPS24	-	599	-	-	-	620	622	626	-	-	-	-	-	650	-	-
IPS40	566	599	-	604	-	-	-	626	-	631	633	640	642	-	652	654
IPS78	-	599	-	604	-	-	-	626	-	-	-	-	-	650	652	654
IPS85	-	599	-	604	-	-	-	626	-	631	-	640	-	650	652	654
IPS96	-	-	-	604	-	-	-	626	628	-	-	-	-	650	652	654
IPS98	566	599	-	604	-	-	-	626	628	-	-	-	-	650	652	654
IPS101	566	599	-	604	-	620	622	626	628	-	633	-	642	650	652	654
IPS109	566	599	-	604	-	620	622	626	-	-	-	-	-	650	652	654
IPS119	-	-	-	604	-	620	622	626	-	-	-	-	-	650	652	654
IPS123	566	599	-	604	-	620	622	626	-	-	-	-	-	650	652	654
IPS124	566	599	-	-	-	620	622	626	-	-	633	-	642	-	652	654
IPS133	566	599	-	604	-	620	622	626	-	631	-	640	-	650	652	654
IPS134	-	-	-	-	-	620	622	626	-	-	633	-	642	650	652	654
IPS135	566	599	-	604	-	620	622	626	-	631	-	-	-	650	652	654
IPS156	566	599	-	604	-	620	622	626	-	-	-	-	-	650	652	654
IPS163	566	599	-	-	-	620	622	626	-	-	-	-	-	650	-	-
IPS168	566	-	-	-	607	620	620	626	-	-	633	-	642	650	-	-
IPS169	566	-	-	604	-	620	620	626	-	-	633	-	642	650	-	-
IPS172	566	-	-	604	-	620	622	626	-	-	633	-	642	-	652	654
IPS177	566	-	601	604	-	-	-	626	-	631	-	640	-	650	652	654

## ตารางที่ 7 (ต่อ)

ขนาดอัลลีล (คู่เบส)	659	682	685	688	693	718	720	729	731	747	751	757	778	783	788	792
IPS03	659	682	685	-	-	718	720	729	731	747	751	757	778	783	788	-
IPS11	659	682	685	-	-	-	720	-	731	-	-	-	778	783	788	-
IPS23	659	682	685	-	-	-	720	-	731	-	-	-	778	783	788	792
IPS24	659	682	685	-	-	-	720	-	731	-	-	-	778	783	788	792
IPS40	659	682	685	688	-	-	720	-	731	-	751	-	778	783	788	-
IPS78	659	682	685	688	-	-	720	-	731	-	751	-	778	783	788	-
IPS85	659	682	685	688	693	-	720	-	731	747	751	757	778	783	788	-
IPS96	659	682	685	688	-	-	720	-	731	747	-	757	778	783	788	-
IPS98	659	682	685	688	-	-	720	-	731	-	751	757	778	783	788	-
IPS101	659	682	685	688	-	-	720	-	731	-	751	757	778	783	788	-
IPS109	659	682	685	688	-	-	720	-	731	-	751	757	778	783	788	-
IPS119	659	682	685	688	-	-	720	-	731	-	751	757	778	783	788	-
IPS123	659	682	685	688	693	-	720	-	731	747	751	757	778	783	788	-
IPS124	-	682	685	688	-	-	720	-	731	-	751	757	778	783	788	-
IPS133	659	682	685	688	-	-	720	-	731	-	751	757	778	783	788	-
IPS134	659	682	685	-	-	718	720	729	731	-	-	-	778	783	788	-
IPS135	659	682	685	688	-	718	720	729	731	-	751	-	778	783	788	-
IPS156	659	682	685	688	-	-	720	-	731	747	751	757	778	783	788	-
IPS163	659	682	685	-	-	-	720	-	731	-	-	-	778	783	788	-
IPS168	659	682	685	688	-	-	720	-	731	-	-	-	778	783	788	-
IPS169	659	682	685	688	-	-	720	-	731	-	-	-	778	783	788	-
IPS172	-	682	685	688	693	-	720	-	731	-	751	-	778	783	788	-
IPS177	659	682	685	688	-	-	720	-	731	747	-	757	778	783	788	-

ขนาดอัลลีล (คู่เบส)	795	798	805	807	815	820	832	835	841	845	849	857	860	864	880	887
IPS03	-	-	-	-	-	-	832	835	841	845	849	-	-	-	880	887
IPS11	-	-	-	807	-	-	-	-	841	-	-	-	-	864	-	-
IPS23	-	-	-	-	-	-	-	-	841	-	-	-	-	864	-	-
IPS24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IPS40	-	-	805	-	-	-	832	835	841	845	849	-	-	-	-	-
IPS78	-	-	805	807	815	820	832	835	841	-	-	857	860	864	-	-
IPS85	-	-	-	-	-	-	832	835	-	-	-	857	-	864	880	887
IPS96	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	857	-	864	880	-
IPS98	795	-	805	-	-	-	-	-	841	-	849	857	-	864	-	-
IPS101	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	857	-	864	-	-
IPS109	-	-	805	-	-	-	832	835	-	-	849	857	-	864	-	887
IPS119	-	-	805	-	-	-	-	835	841	845	-	857	-	864	-	-
IPS123	-	-	805	-	-	-	832	835	-	845	-	857	-	864	880	887
IPS124	-	-	805	-	-	-	832	835	-	-	-	857	-	864	-	-
IPS133	-	-	805	-	-	820	-	835	841	-	-	857	-	864	-	-
IPS134	-	-	805	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IPS135	-	-	805	-	-	-	-	-	841	-	849	857	-	864	880	887
IPS156	-	-	805	-	815	820	832	835	841	-	-	857	-	864	880	887
IPS163	-	798	805	-	-	-	-	-	841	-	-	-	-	-	-	-
IPS168	-	-	805	-	-	-	-	-	841	845	-	857	-	864	-	-
IPS169	-	-	805	-	815	-	-	-	841	845	-	-	860	-	-	-
IPS172	-	-	805	-	-	820	-	835	841	-	-	857	-	864	880	887
IPS177	-	-	805	-	815	820	832	835	841	845	-	857	-	864	-	-

## ตารางที่ 7 (ต่อ)

ขนาดอัลลิล (คู่เบส)	891	894	897	903	910	918	952	958	965	998	1010	1014	1016	1022	1029	1032
IPS03	-	-	-	-	-	-	-	-	965	998	-	-	-	-	-	1032
IPS11	-	-	-	-	-	-	-	-	965	998	-	-	1016	-	-	1032
IPS23	-	-	-	-	-	-	-	-	965	-	1010	-	1016	-	-	-
IPS24	-	-	-	-	-	-	-	-	965	-	-	-	-	1022	1029	-
IPS40	-	-	-	-	-	-	-	958	965	-	1010	-	1016	-	1029	-
IPS78	891	894	-	903	-	918	-	958	965	998	1010	-	1016	1022	1029	1032
IPS85	-	894	-	903	910	-	952	958	965	998	1010	-	1016	1022	1029	1032
IPS96	-	-	-	-	-	-	952	958	965	998	1010	-	1016	-	-	1032
IPS98	891	-	897	903	-	-	-	-	965	998	1010	-	1016	-	-	1033
IPS101	891	-	897	903	-	-	-	-	965	998	1010	1014	-	1022	1029	-
IPS109	891	-	-	903	-	918	952	958	965	998	1010	1014	-	1022	1029	-
IPS119	-	-	897	-	-	-	952	958	965	-	1010	-	1016	1022	1029	-
IPS123	-	-	-	-	-	-	952	958	965	998	1010	-	1016	1022	1029	-
IPS124	-	-	-	-	-	-	952	958	965	-	1010	-	1016	1022	1029	-
IPS133	-	-	897	-	-	-	-	-	965	998	-	-	1016	1022	-	-
IPS134	-	-	-	-	-	-	-	-	965	-	-	-	-	-	-	-
IPS135	891	-	-	903	-	-	952	958	-	998	1010	-	1016	-	-	-
IPS156	-	-	897	-	-	-	952	958	965	998	1010	-	1016	1022	1029	-
IPS163	-	-	-	-	-	-	-	-	965	-	1010	-	1016	1022	1029	-
IPS168	-	-	-	-	-	-	-	-	965	998	-	-	-	1022	1029	-
IPS169	-	-	-	-	-	-	-	-	965	998	1010	-	1016	1022	-	1032
IPS172	-	-	-	-	-	-	-	-	965	998	1010	-	-	-	-	-
IPS177	-	-	-	-	-	-	-	-	965	998	-	-	1016	1022	-	-

ขนาดอัลลิล (คู่เบส)	1041	1048	1050	1055	1057	1070	1076	1100	1103	1106	1111	1120	1122	1129	1133	1143
IPS03	-	1048	1050	-	1057	-	1076	1100	-	1106	-	-	-	-	1133	-
IPS11	-	1048	-	1055	-	1070	-	1100	-	1106	-	-	-	-	-	-
IPS23	-	-	-	-	-	-	-	1100	1103	1106	-	-	-	-	-	-
IPS24	-	-	-	1055	-	1070	-	1100	-	1106	-	-	-	-	-	-
IPS40	-	-	-	1055	-	1070	1076	1100	-	-	-	1120	-	1129	1133	-
IPS78	-	1048	-	-	-	-	1076	1100	-	1106	-	-	-	-	1133	-
IPS85	1041	1048	-	1055	-	1070	1076	1100	-	1106	-	-	-	-	-	-
IPS96	-	-	-	1055	-	1070	1076	1100	-	1106	-	-	-	-	-	-
IPS98	1041	1048	-	1055	-	-	1076	-	1103	1106	1111	-	1122	-	-	-
IPS101	-	1048	-	-	-	-	1076	1100	-	-	-	1120	-	-	-	-
IPS109	-	-	-	1055	-	1070	1076	1100	-	-	-	-	-	-	1133	-
IPS119	-	-	1050	-	1057	-	1076	1100	-	1106	-	-	-	-	-	-
IPS123	-	-	1050	-	1057	-	-	1100	-	1106	-	-	-	-	1133	-
IPS124	-	-	-	-	-	-	1076	1100	-	1106	-	-	-	-	-	-
IPS133	-	-	-	1055	-	1070	1076	1100	-	1106	1111	1120	-	-	-	1143
IPS134	-	-	-	-	-	-	-	1100	-	1106	-	-	-	-	-	-
IPS135	-	1048	-	-	-	-	1076	1100	-	1106	-	-	-	-	1133	-
IPS156	-	1048	-	1055	-	1070	1076	1100	-	1106	-	-	-	-	-	-
IPS163	-	-	-	1055	1057	1070	-	1100	-	1106	-	-	-	-	-	-
IPS168	-	-	-	-	-	-	1076	1100	-	1106	-	-	-	-	-	-
IPS169	-	-	-	1055	-	1070	1076	1100	-	1106	-	-	-	-	-	-
IPS172	1041	1048	-	-	-	-	-	1100	-	1106	-	-	-	-	1133	-



## ตารางที่ 7 (ต่อ)

ขนาดอัลลีล (คู่เบส)	1145	1149	1151	1154	1156	1158	1165	1167	1169	1171	1175	1184	1186	1192	1195	1200
IPS03	-	-	-	-	-	1158	-	1167	-	-	-	-	-	-	1195	-
IPS11	-	-	-	-	-	1158	-	1167	-	-	-	-	-	1192	1195	1200
IPS23	-	-	-	-	-	1158	-	1167	-	-	-	-	-	1192	1195	1200
IPS24	-	-	-	-	-	1158	-	-	1169	-	-	-	-	1192	-	1200
IPS40	-	-	-	-	1156	-	1165	-	-	-	-	-	-	1192	1195	1200
IPS78	-	-	-	-	-	1158	-	-	1169	-	1175	-	-	1192	-	1200
IPS85	-	-	-	-	-	1158	-	-	1169	-	1175	-	-	1192	1195	1200
IPS96	1145	-	1151	1154	-	-	1165	-	1169	-	-	1184	1186	-	1195	-
IPS98	-	-	-	-	-	1158	-	1167	-	-	-	-	-	1192	-	1200
IPS101	-	-	-	-	-	1158	-	1167	-	-	-	-	-	1192	1195	1200
IPS109	-	-	-	-	-	1158	-	-	1169	-	-	-	-	1192	-	1200
IPS119	-	-	-	-	-	1158	-	1167	-	-	-	-	-	1192	1195	1200
IPS123	-	-	-	-	-	1158	-	-	1169	-	1176	-	-	1192	1195	1200
IPS124	-	-	-	-	-	1158	-	1167	-	-	-	-	-	1192	1195	1200
IPS133	-	1149	-	-	-	-	1165	-	-	1171	1175	1184	1186	1192	-	-
IPS134	-	-	-	-	1156	-	1165	-	-	-	-	-	-	1192	-	1200
IPS135	-	-	-	-	-	1158	-	-	1169	-	-	-	-	1192	1195	1200
IPS156	-	-	-	-	-	1158	-	1167	-	-	1175	-	-	1192	1195	1200
IPS163	-	-	-	-	-	1158	-	-	1169	-	-	-	-	1192	-	1200
IPS168	-	-	-	-	-	1158	-	-	1169	-	-	-	-	1192	-	1200
IPS169	-	-	-	-	-	1158	-	-	1169	-	1175	-	-	1192	-	1200
IPS172	-	-	-	-	-	1158	-	1167	-	-	-	-	-	1192	-	1200
IPS177	-	-	-	-	1156	-	1165	-	-	-	-	-	-	1192	-	1200







ตารางที่ 9 การเปรียบเทียบขนาดอัลลีลทั้งหมดของโลคัส LR7 ระหว่างนกทั้ง 4 กลุ่ม

MS	IMS	PS	IPS	MS	IMS	PS	IPS
92	92	92	92	459	459	459	459
142	142	142	142	-	-	-	462
-	-	213	213	490	490	490	490
-	-	215	215	504	-	-	504
228	228	228	228	506	506	-	506
230	230	230	230	510	-	-	510
236	236	236	236	517	517	517	517
-	-	240	240	525	525	525	525
243	243	-	243	527	527	527	527
245	-	-	-	-	-	532	-
248	248	248	248	537	537	537	537
-	-	269	269	540	540	540	540
-	-	271	271	546	546	546	546
-	-	-	273	549	-	-	549
-	-	-	276	551	551	-	551
278	278	-	-	-	-	-	553
-	-	-	280	-	-	-	556
-	-	289	289	558	558	558	558
-	-	291	291	560	560	560	560
-	-	-	293	566	566	566	566
-	-	-	296	-	-	593	-
302	302	302	302	-	-	596	-
305	305	305	305	599	599	599	599
307	307	307	307	-	-	-	601
-	-	314	314	604	604	604	604
318	318	318	318	-	-	-	607
320	320	320	320	620	-	620	620
322	322	-	-	622	-	622	622
325	325	325	325	626	626	626	626
-	-	327	-	628	628	628	628
-	-	329	-	631	631	-	631
352	352	352	352	633	633	633	633
355	355	355	355	-	640	-	640
366	366	-	366	642	642	642	642
-	-	-	370	650	650	650	650
376	376	376	376	652	652	652	652
426	426	426	426	654	654	654	654
428	428	428	428	659	659	659	659
433	433	433	433	682	682	682	682
-	-	446	-	685	685	685	685
-	-	449	-	688	688	688	688
-	-	-	451	-	-	693	693
457	457	457	457	-	-	718	718

## ตารางที่ 9 (ต่อ)

MS	IMS	PS	IPS
720	720	720	720
-	-	729	729
731	731	731	731
747	747	747	747
751	751	751	751
757	757	757	757
770	-	-	-
778	778	778	778
783	783	783	783
788	788	788	788
-	-	-	792
-	-	-	795
-	-	-	798
801	801	-	-
805	805	805	805
807	807	807	807
815	815	815	815
820	-	820	820
832	832	832	832
835	835	835	835
841	841	841	841
845	845	-	845
849	849	-	849
857	857	857	857
-	-	-	860
864	864	864	864
866	-	-	-
880	880	880	880
887	887	887	887
891	891	891	891
894	894	894	894
897	897	897	897
903	903	903	903
910	910	910	910
918	-	918	918
952	952	952	952
958	958	958	958
-	-	963	-
965	965	965	965
998	998	998	998
1010	1010	1010	1010
1014	-	1014	1014
1016	1016	1016	1016

MS	IMS	PS	IPS
1022	1022	1022	1022
-	-	1025	-
1027	-	-	-
1029	-	1029	1029
1032	1032	1032	1032
1041	1041	1041	1041
1048	1048	1048	1048
-	-	1050	1050
1055	1055	-	1055
-	-	-	1057
-	-	1065	-
1070	1070	-	1070
1076	1076	1076	1076
1100	1100	1100	1100
1103	-	1103	1103
1106	1106	1106	1106
1111	1111	1111	1111
1120	1120	1120	1120
-	-	-	1122
-	-	-	1129
1133	1133	1133	1133
-	-	-	1143
-	-	-	1145
-	-	-	1149
-	-	-	1151
-	-	-	1154
-	1156	1156	1156
1158	1158	1158	1158
-	1165	1165	1165
1167	1167	1167	1167
1169	1169	1169	1169
-	-	-	1171
1175	1175	1175	1175
-	-	1181	-
-	-	-	1184
-	-	1186	1186
1192	1192	1192	1192
1195	1195	1195	1195
1200	1200	1200	1200

## บทที่ 5 วิจารณ์ผลการทดลอง

ในการศึกษาครั้งนี้ได้เลือกใช้ไพรเมอร์ D-03 และ LR7 ตามงานวิจัยของ Yee และคณะในปี ค.ศ. 2013 (Yee et al., 2013) เพื่อตรวจหา species-specific marker สำหรับตรวจสอบการผสมข้ามสายพันธุ์ระหว่างนกกาบบัวและนกระสาปากเหลืองในสภาพกรงเลี้ยงที่สวนสัตว์ดุสิต ผลการตรวจสอบ RAPD fragment ที่ได้ด้วยวิธี gel electrophoresis พบว่าในกลุ่มประชากรนกทั้งสองชนิดแสดงแถบดีเอ็นเอที่โลคัส D-03 และ LR7 เหมือนกันทั้งหมด จึงไม่สามารถหาแถบดีเอ็นเอสำหรับเป็นเครื่องหมายทางพันธุกรรมเพื่อระบุชนิดของนกได้ ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาของ Yee และคณะที่ไม่พบ diagnostic marker ที่โลคัส D-03 แต่พบ diagnostic marker ที่โลคัส LR7 โดยพบว่านกที่เป็นลูกผสมระหว่างนกทั้งสองชนิดนี้จะมีแบนขนาด 300, 400 และ 500 ที่ไม่พบในตัวอย่างนกที่เป็นพันธุ์แท้ทั้งสองชนิด ทำให้สามารถใช้แบนดังกล่าวเป็นเครื่องหมายทางพันธุกรรมสำหรับตรวจสอบนกที่เป็นลูกผสมได้ เมื่อนำผลการตรวจสอบด้วยการใช้ไพรเมอร์ LR7 จากสองงานวิจัยนี้มาเปรียบเทียบกัน พบว่ามีความแตกต่างกัน ทั้งนี้อาจเป็นเพราะตัวอย่างนกที่นำมาเพาะเลี้ยงในแต่ละสวนสัตว์นั้นมีพันธุกรรมแตกต่างกัน จึงทำให้เมื่อใช้ไพรเมอร์เดียวกันจึงพบขนาดของ RAPD fragment ที่ต่างกัน แต่เมื่อนำ RAPD fragment ที่โลคัส LR7 มาหาขนาดด้วยวิธี Genescan ซึ่งวิธีการดังกล่าวยังไม่เคยมีการรายงานจากงานวิจัยใดก่อนหน้านี้ และจากผลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้พบว่ามีสองอัลลีลที่พบในนกระสาปากเหลืองพันธุ์แท้เท่านั้น ได้แก่อัลลีลขนาด 1055 และ 1070 ทำให้สามารถนำทั้งสองอัลลีลดังกล่าวมาใช้เป็นเครื่องหมายในการระบุชนิดของนกเพื่อประเมินการข้ามสายพันธุ์ระหว่างนกกาบบัวและนกระสาปากเหลืองได้ และสามารถนำมาใช้ระบุนกที่เป็นลูกผสมออกจากกลุ่มประชากรนกที่เป็นพันธุ์แท้ได้ ทำให้สะดวกต่อการคัดแยกนกที่เป็นลูกผสมออกจากกลุ่มประชากรของนกทั้งสองชนิดนี้ สำหรับนำไปเพาะเลี้ยงในกรงเลี้ยงแยก เพื่อต้องการให้กลุ่มประชากรเดิมมีแต่นกพันธุ์แท้เท่านั้น เนื่องจากถ้าหากปล่อยให้นกที่เป็นลูกผสมอยู่ร่วมกับนกพันธุ์แท้ต่อไปในอนาคต จะเป็นการเพิ่มโอกาสการกลับไปผสมพันธุ์กับพ่อแม่พันธุ์ (backcross) ซึ่งจะทำให้เกิด genetic contamination ในยีนพูล (gene pool) ของประชากรพันธุ์แท้ได้และอาจทำให้พันธุกรรมของ pure species เกิดการสูญเสียพันธุ์ได้ในอนาคต หากการเกิด backcrossing ยังเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่อง (Todesco et al., 2016)

จากการศึกษาครั้งนี้จะเห็นได้ว่าการตรวจสอบนกที่มีลักษณะ intermediate ระหว่างนกทั้งสองชนิดโดยการใช้ข้อมูลทางด้านสัณฐานวิทยาภายนอกเพียงอย่างเดียวนั้นไม่สามารถใช้ตรวจสอบได้อย่างแม่นยำและน่าเชื่อถือ เนื่องจากนก intermediate บางตัวอาจมีลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกคล้ายกับพันธุ์แท้ แต่เมื่อตรวจสอบด้วยผลของ mitochondrial DNA กลับพบว่านกตัวดังกล่าวเป็นลูกผสม เนื่องจากมี mitochondrial DNA จากแม่ที่เป็นนกกอีกชนิดหนึ่ง แต่การใช้ข้อมูลในส่วนของ mitochondrial DNA เพียงอย่างเดียวค่อนข้างที่จะมีข้อจำกัด เนื่องจาก mitochondrial DNA จะถ่ายทอดจากแม่ไปยังลูกเท่านั้น (Höglund et al., 2015) ทำให้สามารถตรวจสอบสารพันธุกรรมจากแม่พันธุ์ได้ทางฝ่ายเดียว แต่ฝั่งพ่อพันธุ์จะไม่สามารถทราบได้ จึงจำเป็นต้องใช้ข้อมูลจาก nuclear DNA มาวิเคราะห์ร่วมด้วย ดังนั้นเพื่อความแม่นยำและชัดเจนในการตรวจสอบการผสมข้ามสายพันธุ์

จึงควรใช้ข้อมูลด้านสัณฐานวิทยาพร้อมกับข้อมูลทางด้านชีวโมเลกุลทั้ง mitochondrial DNA และ nuclear DNA

จากการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยสามารถใช้ nuclear marker ตรวจสอบลูกผสมได้แต่เนื่องด้วยเครื่องหมายพันธุกรรมที่ใช้มีเพียงโลคัสเดียว ซึ่งไม่มากพอที่จะใช้ระบุประเภทของลูกผสมได้ว่าเป็นลูกผสม F1 hybrid, F2 hybrid หรือ backcross hybrid ซึ่งแตกต่างจากรายงานของ Baveja และคณะในปี ค.ศ. 2018 (Baveja et al., 2018) ที่ใช้เทคนิค double digest RAD sequencing (ddRADseq) สำหรับศึกษาโครงสร้างพันธุกรรมของประชากรนกกาบบัวและนกกระสาปากเหลืองในประเทศสิงคโปร์ ซึ่งจากการวิเคราะห์ผลด้วยเทคนิค multiloci ดังกล่าวทำให้ผู้วิจัยสามารถระบุประเภทของนกลูกผสมได้ ดังนั้นการศึกษาในอนาคตควรทำการตรวจสอบว่านกลูกผสมที่พบจากการศึกษาครั้งนี้เป็นรุ่นใดโดยการใช้เทคนิคที่เหมาะสมมากขึ้น เช่น เทคนิค Next Generation Sequencing (NGS) เป็นต้น

ปัจจุบันได้มีการรายงานพบการผสมข้ามสายพันธุ์ระหว่างนกกาบบัวและนกกระสาปากเหลืองที่สวนสัตว์ Zoo Negara ประเทศมาเลเซีย, สวนสัตว์ Jurong Bird Park ประเทศสิงคโปร์ และ สวนสัตว์ที่ตรวจพบล่าสุดในงานวิจัยนี้คือ สวนสัตว์ดุสิต ประเทศไทย ที่ค้นพบการตรวจสอบลูกผสมด้วยวิธีการใหม่ คือการใช้อัลลีลขนาด 1055 และ 1070 จาก RAPD fragment ที่โลคัส LR7 ด้วยวิธี Genescan ซึ่งเป็นอีกวิธีหนึ่งที่ย่อยต่อการใช้ตรวจสอบลูกผสมและมีความแม่นยำสูง ดังนั้นจึงควรที่จะเร่งทำการตรวจสอบสวนสัตว์แห่งอื่นที่ได้เพาะเลี้ยงนกกาบบัวร่วมกับนกกระสาปากเหลืองหรือนกอื่นๆ ในสภาพกรงเลี้ยงว่าเป็นพันธุ์แท้หรือลูกผสมด้วยการวิเคราะห์ข้อมูลจากลักษณะสัณฐานภายนอกประกอบกับข้อมูลทางด้านชีวโมเลกุล เพื่อใช้สำหรับการจัดการประชากรของนกในกลุ่มดังกล่าว รวมถึงเป็นข้อมูลพื้นฐานของนกแต่ละตัวที่อาจจะมีประโยชน์สำหรับโครงการเพาะเลี้ยงนกกระสาปากเหลืองเพิ่มในอนาคต เพื่อเป็นการลดอัตราความเสี่ยงที่นกชนิดนี้จะสูญพันธุ์ไปจากธรรมชาติ



### สรุปผลการศึกษา

จากการตรวจสอบการผสมข้ามสายพันธุ์ระหว่างนกกาบบัว ( $n = 170$ ) และนกกระสาปากเหลือง ( $n = 49$ ) ที่เพาะเลี้ยงในพื้นที่สวนสัตว์ดุสิตและสวนสัตว์นครราชสีมา ด้วยการใช้เทคนิคลายพิมพ์ดีเอ็นเอและการทำ fragment analysis ที่โลคัส LR7 พบว่าสามารถใช้อัลลีลขนาด 1055 และ 1070 เป็นเครื่องหมายทางพันธุกรรมสำหรับตรวจสอบการผสมข้ามสายพันธุ์ระหว่างนกทั้งสองชนิดนี้ได้ ซึ่งผลที่ได้มีความสอดคล้องกันกับผลทางด้านสัณฐานวิทยา ซึ่งจะมีประโยชน์ต่อการใช้จัดการกลุ่มประชานนกดังกล่าวให้เหมาะสมต่อไปในอนาคต

### เอกสารอ้างอิง

- จารุจินต์ นภีตะภักดิ์, กานต์ เลชะกุล และ วัชระ สงวนสมบัติ. 2555. **คู่มือศึกษาธรรมชาติหมอบุญส่ง เลชะกุล นครเมืองไทย**. กรุงเทพฯ: คณะบุคคลนายแพทย์บุญส่ง เลชะกุล.
- Arnold, M.L. 1997. **Natural hybridization and evolution**. United States of America: Oxford University press, Inc.
- Arnold, M.L. 2006 **Evolution through genetic exchange**. United States of America: Oxford University press, Inc.
- Audubon. 2013. The amazing world of hybrid birds. [Online]. 203. Available from: <http://www.audubon.org/news/the-amazing-world-hybrid-birds> [2018,February 21]
- Baveja, P., Tang, Q., Lee, J.G.H. and Rheindt, F.E. 2018. Impact of genomic leakage on the conservation of the endangered milky stork. Biological Conservation. 229: 59-66.
- Dooasia. 2550. สวนสัตว์ดุสิตเขาดินวนา/ Dusit Zoo. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: <http://www.dooasia.com/bangkok/006m003.shtml> [11 กรกฎาคม 2562]
- Fitzpatrick, B.M. 2014. Rates of evolution of hybrid inviability in birds and mammals. Evolution. 58: 1865-1870.
- Futuyma, D.J. 1997. **Evolutionary biology**. United States of America: Sinauer Associates, Inc.
- Höglund, J., Sæther, S.A., Fiske, P., Wheatcroft, D. and Kålås, J.A. 2015. A hybrid snipe *Gallinago gallinago* x *G. media* found in the wild. Journal of Ornithology. 156: 819-827.
- Hubbs, C.L. 1955. Hybridization between fish species in nature. Systematic Zoology. 4: 1-20.
- IUCN. 2016 a. *Mycteria leucocephala*. [Online]. Available from: <http://www.iucnredlist.org/details/summary/22697658/0> [2018,February 7]
- IUCN. 2016 b. *Mycteria cinerea*. [Online]. Available from: <http://www.iucnredlist.org/details/summary/22697651/0> [2018,February 7]
- Korat.zoothailand. 2560. ประวัติความเป็นมา. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: [http://www.korat.zoothailand.org/ewt\\_news.php?nid=332](http://www.korat.zoothailand.org/ewt_news.php?nid=332) [11 กรกฎาคม 2562]
- Slikas, B. 1997. Phylogeny of the avian family Ciconiidae (storks) based on cytochrome b sequences and DNA–DNA hybridization distances. Molecular Phylogenetics and Evolution. 8: 275-300.

- Soares, L.S., Bolten, A.B., Wayne, M.L., Vilaca, S.T., Santos, F.R., Marcovaldi, M.A.G. and Bjorndal, K.A. 2016. Comparison of reproductive output of hybrid sea turtles and parental species. *Marine Biology*. 164: 1-20.
- Thainationalparks. 2019 a. painted stork. [Online]. Available from: <https://www.thainationalparks.com/species/painted-stork> [2019, July 18]
- Thainationalparks. 2019 b. milky stork. [Online]. Available from: <https://www.thainationalparks.com/species/milky-stork> [2019, July 18]
- Yee, E.Y.S., Zainuddin, Z.Z., Ismail, A., Yap, C.K. and Tan, S.G. 2013. Identification of hybrids of painted and milky storks using FTA card-collected blood, molecular markers, and morphologies. *Biochemical Genetics*. 51: 798-799.
- Zoothailand. 2560. นกขาบนิ้ว/painted stork (*Mycteria leucocephala*). [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: [http://www.zoothailand.org/animal\\_view.php?detail\\_id=184&c\\_id=](http://www.zoothailand.org/animal_view.php?detail_id=184&c_id=) [14 กรกฎาคม 2562]