

การคัดกรองและการประยุกต์เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์เพื่อการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกกระเรียนพันธุ์ไทย *Grus antigone sharpii* Blanford, 1895 ในสภาพกรงเลี้ยง



บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR) เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR) are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาสัตววิทยา ภาควิชาชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2560

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

SCREENING AND APPLICATION OF MICROSATELLITE MARKERS FOR GENETIC DIVERSITY  
ANALYSIS OF EASTERN SARUS CRANE *Grus antigone sharpii* Blanford, 1895 IN  
CAPTIVITY



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science Program in Zoology

Department of Biology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2017

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การคัดกรองและการประยุกต์เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์เพื่อการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกกระเรียนพันธุ์ไทย *Grus antigone sharpii* Blanford, 1895 ในสภาพกรงเลี้ยง

โดย

นางสาวรังสิณี สันคม

สาขาวิชา

สัตววิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

อาจารย์ ดร. อัมพร วิเวกแว่ว

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ณิชฎพนธ์ วาฤทธิ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ศาสตราจารย์ ดร. พลกฤษณ์ แสงวณิช)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นพดล กิตนยะ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(อาจารย์ ดร. อัมพร วิเวกแว่ว)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ณิชฎพนธ์ วาฤทธิ)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พงษ์ชัย หาญยุทธนากร)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(นายสัตวแพทย์ ดร. บริพัตร ศิริอรุณรัตน์)

รังสีนี้ สันคม : การคัดกรองและการประยุกต์เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์เพื่อการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกกระเรียนพันธุ์ไทย *Grus antigone sharpii* Blanford, 1895 ในสภาพกรงเลี้ยง (SCREENING AND APPLICATION OF MICROSATELLITE MARKERS FOR GENETIC DIVERSITY ANALYSIS OF EASTERN SARUS CRANE *Grus antigone sharpii* Blanford, 1895 IN CAPTIVITY) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: อ. ดร. อัมพร วิเวกแก้ว, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ผศ. ดร. ญัฐพจน์ วาฤทธิ, หน้า.

*Grus antigone sharpii* จัดเป็นนกกระเรียนที่เคยสูญพันธุ์ไปจากธรรมชาติของประเทศไทย การเพาะเลี้ยงและขยายพันธุ์นกกระเรียนในกรงเลี้ยงเป็นขั้นตอนสำคัญที่สามารถเพิ่มจำนวนประชากรเพื่อนำไปปล่อยคืนสู่ธรรมชาติในอนาคตได้ โดยสิ่งสำคัญที่ต้องคำนึงถึงคือความหลากหลายทางพันธุกรรม โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มของพ่อแม่พันธุ์ตั้งต้น ในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดกรองเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์จำนวน 28 ตำแหน่ง ซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่เคยใช้ศึกษาในนกกระเรียน *G. americana* และนกกระเรียน *Anthropoides paradisea* เพื่อใช้วิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกกระเรียนพันธุ์ไทยจากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว (KKOZ, n = 11) และสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ (BB, n = 17) จังหวัดชลบุรี ผลการศึกษาพบว่าไพรเมอร์ทั้ง 28 คู่สามารถเพิ่มปริมาณไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอของนกกระเรียนพันธุ์ไทยได้ แต่มีเพียง 22 คู่ที่แสดงความเป็น polymorphism และมีตำแหน่งไมโครแซทเทลไลท์ที่ปรากฏค่า linkage disequilibrium 8 ตำแหน่ง การเบี่ยงเบนออกจากสมดุล Hardy-Weinberg พบที่โลคัส Gram8 และ Gpa38 ซึ่งเป็นผลมาจาก null allele และการเพิ่มขึ้นของอัลลีลแบบ heterozygous ตามลำดับ จากการวิเคราะห์ค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมพบว่า ค่าเฉลี่ยของ expected observed heterozygosity มีค่าเท่ากับ 0.63 และ 0.69 ค่า inbreeding coefficient มีค่าเท่ากับ -0.100 ซึ่งแสดงว่านกกระเรียนมีความหลากหลายทางพันธุกรรมค่อนข้างสูง และเกิด inbreeding น้อย นอกจากนี้ยังพบว่านกกระเรียนจาก KKOZ และ BB มีความแตกต่างทางพันธุกรรมต่ำ ( $F_{ST} = 0.035$ ) และไม่มีการแยกออกเป็นกลุ่มประชากรย่อย ( $K = 1$ ) จากผลการศึกษาครั้งนี้บ่งบอกได้ว่านกกระเรียนพันธุ์ไทยจาก 2 พื้นที่การศึกษาน่าจะเหมาะสมที่จะใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์เพื่อเพิ่มจำนวนประชากรในกรงเลี้ยงให้มากขึ้น และสามารถนำไปปล่อยคืนสู่พื้นที่ชุ่มน้ำตามธรรมชาติในอนาคตได้

ภาควิชา	ชีววิทยา	ลายมือชื่อนิสิต .....
สาขาวิชา	สัตววิทยา	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....
ปีการศึกษา	2560	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม .....

# # 5872030823 : MAJOR ZOOLOGY

KEYWORDS: CAPTIVE BREEDING / CROSS-SPECIES AMPLIFICATION / CONSERVATION GENETICS / HETEROZYGOSITY / REINTRODUCTION

RANGSINEE SANKHOM: SCREENING AND APPLICATION OF MICROSATELLITE MARKERS FOR GENETIC DIVERSITY ANALYSIS OF EASTERN SARUS CRANE *Grus antigone sharpii* Blanford, 1895 IN CAPTIVITY. ADVISOR: AMPORN WIWEKWEAW, Ph.D., CO-ADVISOR: ASST. PROF. NATAPOT WARRIT, Ph.D., pp.

*Grus antigone sharpii* was reported to be extinct in the wild of Thailand. Captive breeding program is a crucial procedure to recover individual numbers and be an important source for species reintroduction. Genetic diversity in the population, especially in founders, is also important, since the fixation of unfavorable alleles may drive the reemerging population to become extinct again. This study aimed to screen microsatellite markers from 28 microsatellite primer pairs isolated from whooping crane *G. americana* and blue crane *Anthropoides paradisea* to assess genetic diversity of *G. a. sharpii* from two breeding facilities: Khao Kheow Open Zoo (KKOZ, n = 11) and Bangpra Water Bird Breeding Station (BB, n = 17), Chonburi Province. Of 28 loci analyzed; 22 were found to be polymorphism and 8 loci were in linkage disequilibrium. Deviations from Hardy-Weinberg equilibrium were observed at Gram8 and Gpa38 loci, resulting from the presence of null allele and heterozygosity excess, respectively. The averages of expected and observed heterozygosities are 0.63 and 0.69, respectively, indicating high genetic diversity in terms of heterozygosity and low inbreeding ( $F_{IS} = -0.100$ ). The overall fixation index suggested that cranes showed low genetic differentiation between populations ( $F_{ST} = 0.035$ ). Moreover, Bayesian clustering analysis implied that cranes from KKOZ and BB are genetically homogenous ( $K = 1$ ). Therefore, our findings suggested that the breeding stocks may be suitable for crane captive breeding program for future reintroduction of *G. a. sharpii* in Thailand.

Department: Biology

Field of Study: Zoology

Academic Year: 2017

Student's Signature .....

Advisor's Signature .....

Co-Advisor's Signature .....

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องมาจากการได้รับความกรุณาอย่างสูงจาก อาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์ ดร.อัมพร วิเวกแก้ว และอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ณัฐพจน์ วาฤทธิ์ ที่ได้สละเวลาอันมีค่าของท่านทั้งสองในการให้คำแนะนำ คำปรึกษา ข้อคิดในการ ทำงาน เพื่อให้การทำงานวิจัยดำเนินไปในแนวทางที่ถูกต้องตามระเบียบวิธี ตลอดจนให้ความ ช่วยเหลือในการปรับปรุงและแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ด้วยการดูแลเอาใจใส่เป็นอย่างดี ส่งผลให้ วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น ผู้วิจัยได้ตระหนักถึงความทุ่มเทและความตั้งใจจริง ของอาจารย์เป็นอย่างยิ่ง และขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงมา ณ ที่นี้ด้วย

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นพดล กิตนะ ประธานกรรมการสอบ วิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พงษ์ หาญยุทธนากร และ นายสัตวแพทย์ ดร.บริพัตร ศิริ อรุณรัตน์ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำปรึกษาและคำแนะนำสำหรับการแก้ไข วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ คุณสุรียา แสงพงค์ อดีตผู้อำนวยการสวนสัตว์เปิดเขาเขียว คุณ ทรงกลด ภูทอง อดีตหัวหน้าสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ คุณเผด็จ ลายทอง หัวหน้าสถานี วิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ และเจ้าหน้าที่ทุกท่านจากสวนสัตว์เปิดเขาเขียวและสถานีวิจัย เพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระที่ได้ให้ความร่วมมือและช่วยเหลือในการเข้าไปเก็บตัวอย่าง และให้ข้อมูล ที่เป็นประโยชน์กับการศึกษา

ขอกราบขอบพระคุณ Dr. Kenneth Jones สำหรับการให้คำแนะนำในการเลือกใช้ เครื่องหมายทางพันธุกรรมที่เหมาะสมในการทำงานวิจัย

ขอขอบคุณ ทูน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช และ ทูน จากโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี สนองพระราชดำริโดยจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และภาควิชาชีววิทยา คณะ วิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่สนับสนุนเงินทุนและสถานที่ทำการวิจัยในการศึกษาครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณบิดามารดาที่ให้โอกาสด้านการศึกษา สนับสนุน และคอยให้ กำลังใจตลอดระยะเวลาในการเรียนและการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้เสร็จสมบูรณ์

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญภาพ .....	ฉ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
วัตถุประสงค์ .....	4
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง .....	5
2.1 นกกระเรียน.....	5
2.2 Sarus crane .....	10
2.2.1 อนุกรมวิธาน.....	10
2.2.2 ลักษณะทั่วไป .....	10
2.2.3 การกระจายตัวและขนาดประชากร.....	11
2.2.4 ถิ่นที่อยู่อาศัยและแหล่งอาหาร .....	12
2.2.5 พฤติกรรมในฤดูผสมพันธุ์.....	12
2.2.6 สถานภาพทางการอนุรักษ์.....	15
2.3 นกกระเรียนพันธุ์ไทย (Eastern sarus crane) .....	16
2.3.1 ลักษณะทั่วไป .....	16
2.3.2 ถิ่นที่อยู่อาศัย.....	18
2.3.3 นกกระเรียนพันธุ์ไทยในประเทศไทย.....	18
2.3.4 สถานภาพทางการอนุรักษ์และการอนุรักษ์นกกระเรียนพันธุ์ไทยในประเทศไทย .....	20

2.4 การศึกษาและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับนกระเรียนพันธุ์ไทย .....	21
2.4.1 ด้านนิเวศวิทยา.....	21
2.4.2 ด้านพฤติกรรม.....	22
2.4.3 ด้านความหลากหลายทางพันธุกรรม.....	22
2.5 พื้นที่ทำการศึกษา .....	23
2.5.1 สวนสัตว์เปิดเขาเขียว ตำบลบางพระ อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี.....	23
2.5.2 สถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ ตำบลบางพระ อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี.....	23
2.6 เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์.....	24
2.7 การคัดกรองเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์.....	25
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย .....	26
3.1 สถานที่ทำการศึกษาและการเก็บตัวอย่าง.....	26
3.2 การคัดกรองเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์.....	29
3.2.1. การสกัดดีเอ็นเอ และการเพิ่มปริมาณไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอเป้าหมายด้วย ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส (Polymerase Chain Reaction: PCR).....	29
3.2.2 การตรวจสอบขนาดของแถบไมโครแซทเทลไลท์ (microsatellite band) ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis.....	35
3.2.3 การทำ genotyping ด้วยวิธี GeneScan .....	36
3.2.4 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ไมโครแซทเทลไลท์ (microsatellite product).....	36
3.3 การวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรม .....	37
3.3.1 โปรแกรม Genepop เวอร์ชัน 4.3 (Raymond and Rousset, 1995; Raymond and Rousset, 2003).....	37
3.3.2 โปรแกรม ML-NullFreq (Kalinowski and Taper, 2006).....	38
3.3.3 โปรแกรม FSTAT เวอร์ชัน 2.9.3 (Goudet, 2001).....	38



3.3.4 โปรแกรม Micro-Checker เวอร์ชัน 2.2.3 (van Oosterhout et al., 2004) .....	39
3.3.5 โปรแกรม STRUCTURE เวอร์ชัน 2.3.4 (Pritchard et al., 2000).....	39
บทที่ 4 ผลการศึกษาและอภิปรายผลการศึกษา .....	40
4.1 ผลการเก็บตัวอย่าง.....	40
4.2 ผลการสกัดดีเอ็นเอ และการคัดกรองเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์.....	43
4.3 ผลการทำ genotyping ด้วยวิธี GeneScan .....	58
4.4 ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ไมโครแซทเทลไลท์ (microsatellite product) .....	69
4.5 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรม.....	72
4.5.1 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลด้วย polymorphic loci จาก whooping crane จำนวน 10 โลไซ และจาก blue crane จำนวน 4 โลไซ คือ Gpa12, Gpa33, Gpa34 และ Gpa35.....	72
4.5.2 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลด้วย polymorphic loci จาก blue crane จำนวน 12 โลไซ.....	84
4.5.3 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลด้วย polymorphic loci จาก whooping crane จำนวน 10 โลไซ และ blue crane จำนวน 12 โลไซ.....	91
4.5.4 ผลการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมจากทั้ง 3 กลุ่มการวิเคราะห์ .....	97
บทที่ 5 สรุปผลการศึกษา.....	99
ข้อเสนอแนะเกี่ยวกับแนวทางการอนุรักษ์นกกระเรียนพันธุ์ไทย.....	101
รายการอ้างอิง .....	103
ภาคผนวก ก. วัสดุ อุปกรณ์และสารเคมี .....	110
ภาคผนวก ข. การสกัดดีเอ็นเอ .....	112
ภาคผนวก ค. การตรวจสอบขนาดของแถบไมโครแซทเทลไลท์ (microsatellite band) ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis.....	114

ญ

หน้า

ภาคผนวก ง. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเพื่อตรวจสอบเพศของนกกระเรียนด้วยชีววิทยาโมเลกุล (molecular sexing) .....	115
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ .....	117



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

### สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์และอุณหภูมิที่ใช้ในขั้นตอน annealing ( $T_A$ ) ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ .....	30
ตารางที่ 2 ผลการเก็บตัวอย่างขนนกกระเรียนพันธุ์ไทยจากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว (KKOZ) และสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ (BB) และการระบุเพศนกกระเรียนด้วย เทคนิค molecular sexing .....	41
ตารางที่ 3 ขนาดของอัลลีลที่ได้ในแต่ละตัวอย่างจากการวิเคราะห์ผล genotyping บริเวณโลคัส Gram6, Gram8, Gram11, Gram17, Gram20 และ Gram22.....	60
ตารางที่ 4 ขนาดของอัลลีลที่ได้ในแต่ละตัวอย่างจากการวิเคราะห์ผล genotyping บริเวณโลคัส Gram24, Gram25, Gram30, Gram31, Gram32a และ Gram41 .....	62
ตารางที่ 5 ขนาดของอัลลีลที่ได้ในแต่ละตัวอย่างจากการวิเคราะห์ผล genotyping บริเวณโลคัส Gram42, Gram45, Gpa11, Gpa12, Gpa14 และ Gpa32 .....	64
ตารางที่ 6 ขนาดของอัลลีลที่ได้ในแต่ละตัวอย่างจากการวิเคราะห์ผล genotyping บริเวณโลคัส Gpa33, Gpa34, Gpa35, Gpa36, Gpa37 และ Gpa38 .....	66
ตารางที่ 7 ขนาดของอัลลีลที่ได้ในแต่ละตัวอย่างจากการวิเคราะห์ผล genotyping บริเวณโลคัส Gpa39 และ Gpa41 .....	68
ตารางที่ 8 ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ซ้ำกัน (repeat) จำนวนชุดซ้ำของนิวคลีโอไทด์ที่มากที่สุด ขนาดของอัลลีล (allele size) และรูปแบบไพรเมอร์ (type of primer) ของ ทั้ง 28 โลไซ.....	70
ตารางที่ 9 ค่าการวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรมของประชากรนกกระเรียนพันธุ์ไทย ในสภาพกรงเลี้ยงในแต่ละพื้นที่ของสวนสัตว์เปิดเขาเขียว (KKOZ) และ สถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ (BB) ด้วย polymorphic loci จำนวน 10 โลไซ .....	79
ตารางที่ 10 ค่าการวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรมของประชากรนกกระเรียนพันธุ์ไทย ในสภาพกรงเลี้ยงของสวนสัตว์เปิดเขาเขียวและสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำ บางพระ (overall population) ด้วย polymorphic loci จำนวน 10 โลไซ .....	80
ตารางที่ 11 ค่า $H_E$ และ $H_O$ และ Fisher's Exact Test probability ของนกกระเรียน พันธุ์ไทยเพศผู้และเพศเมียเมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ จาก whooping crane และ Gpa33 .....	81

ตารางที่ 12	ความถี่ของ unique allele ที่พบในพื้นที่สวนสัตว์เปิดเขาเขียว (KKOZ) หรือสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ (BB) .....	82
ตารางที่ 13	ค่า log likelihood (Ln P(D)) จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม STRUCTURE ที่ $K = 1$ ถึง $K = 5$ ด้วย polymorphic loci จำนวน 10 โลไซ .....	83
ตารางที่ 14	ค่าการวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรมของประชากรนกกกระเรียนพันธุ์ไทย ในสภาพทรงเลี้ยงในแต่ละพื้นที่ของสวนสัตว์เปิดเขาเขียว (KKOZ) และสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ (BB) ด้วย polymorphic loci จำนวน 8 โลไซ .....	87
ตารางที่ 15	ค่าการวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรมของประชากรนกกกระเรียนพันธุ์ไทย ในสภาพทรงเลี้ยงของสวนสัตว์เปิดเขาเขียวและสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ (overall population) ด้วย polymorphic loci จำนวน 8 โลไซ .....	88
ตารางที่ 16	ค่า $H_E$ และ $H_O$ และ Fisher's Exact Test probability ของนกกกระเรียนพันธุ์ไทยเพศผู้และเพศเมียเมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ จาก blue crane.....	89
ตารางที่ 17	ค่า log likelihood (Ln P(D)) จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม STRUCTURE ที่ $K = 1$ ถึง $K = 5$ ด้วย polymorphic loci จำนวน 8 โลไซ .....	90
ตารางที่ 19	ค่าการวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรมของประชากรนกกกระเรียนพันธุ์ไทย ในสภาพทรงเลี้ยงของสวนสัตว์เปิดเขาเขียวและสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ (overall population) ด้วย polymorphic loci จำนวน 13 โลไซ .....	94
ตารางที่ 18	ค่าการวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรมของประชากรนกกกระเรียนพันธุ์ไทย ในสภาพทรงเลี้ยงในแต่ละพื้นที่ของสวนสัตว์เปิดเขาเขียว (KKOZ) และสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ (BB) ด้วย polymorphic loci จำนวน 13 โลไซ.....	94
ตารางที่ 20	ค่า log likelihood (Ln P(D)) จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม STRUCTURE ที่ $K = 1$ ถึง $K = 5$ ด้วย polymorphic loci จำนวน 13 โลไซ.....	96

## สารบัญภาพ

ภาพที่ 1	ลักษณะสัณฐานภายนอกของนกกระเรียน 15 ชนิดทั่วโลก.....	8
ภาพที่ 2	เปรียบเทียบลักษณะสัณฐานภายนอกของ sarus crane 3 ชนิดย่อย.....	11
ภาพที่ 3	ขอบเขตการกระจายตัวของ sarus crane ทั้ง 3 ชนิดย่อย.....	12
ภาพที่ 4	พฤติกรรมการเปล่งเสียงร้องแบบ unison call ของนกกระเรียนพันธุ์ไทย.....	14
ภาพที่ 5	ลักษณะสัณฐานภายนอกของลูกนกกระเรียนพันธุ์ไทย.....	16
ภาพที่ 6	ลักษณะสัณฐานภายนอกของนกกระเรียนพันธุ์ไทยที่ยังไม่โตเต็มวัย.....	17
ภาพที่ 7	ลักษณะสัณฐานภายนอกของนกกระเรียนพันธุ์ไทยที่โตเต็มวัย.....	17
ภาพที่ 8	หลักฐานภาพถ่ายการพบนกกระเรียนเป็นสัตว์คู่กับชาวบุรีรัมย์.....	19
ภาพที่ 9	ลักษณะรังและการวางไข่ของนกกระเรียนพันธุ์ไทยในธรรมชาติและลูกนก 2 ตัวแรกที่เกิดในธรรมชาติของประเทศไทย.....	21
ภาพที่ 10	นกกระเรียนพันธุ์ไทยในสภาพกรงเลี้ยงที่สวนสัตว์เปิดเขาเขียว.....	27
ภาพที่ 11	นกกระเรียนพันธุ์ไทยในสภาพกรงเลี้ยงที่สถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ.....	27
ภาพที่ 12	ตัวอย่างขนนกกระเรียนพันธุ์ไทยที่เก็บได้จากกรงเลี้ยงของสถานีวิจัย เพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ.....	28
ภาพที่ 13	การเก็บขนนกกระเรียนพันธุ์ไทยโดยดึงจากบริเวณปีกของนกโดยตรง.....	28
ภาพที่ 14	การตรวจสอบขนาด microsatellite band ด้วยวิธี 3% agarose NuSieve gel electrophoresis ของตัวอย่างนกกระเรียนพันธุ์ไทยจากสวนสัตว์ เปิดเขาเขียวและสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ โดยใช้ไพรเมอร์ Gram6.....	44
ภาพที่ 15	การตรวจสอบขนาด microsatellite band ด้วยวิธี 3% agarose NuSieve gel electrophoresis ของตัวอย่างนกกระเรียนพันธุ์ไทยจากสวนสัตว์ เปิดเขาเขียวและสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ โดยใช้ไพรเมอร์ Gram8.....	44
ภาพที่ 16	การตรวจสอบขนาด microsatellite band ด้วยวิธี 3% agarose NuSieve gel electrophoresis ของตัวอย่างนกกระเรียนพันธุ์ไทยจากสวนสัตว์ เปิดเขาเขียวและสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ โดยใช้ไพรเมอร์ Gram11.....	45





ภาพที่ 35	การตรวจสอบขนาด microsatellite band ด้วยวิธี 3% agarose NuSieve gel electrophoresis ของตัวอย่างนกระเรียนพันธุ์ไทยจากสวนสัตว์เปิดเขาเขียวและสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ โดยใช้ไพรเมอร์ Gpa34.....	54
ภาพที่ 36	การตรวจสอบขนาด microsatellite band ด้วยวิธี 3% agarose NuSieve gel electrophoresis ของตัวอย่างนกระเรียนพันธุ์ไทยจากสวนสัตว์เปิดเขาเขียวและสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ โดยใช้ไพรเมอร์ Gpa35.....	55
ภาพที่ 37	การตรวจสอบขนาด microsatellite band ด้วยวิธี 3% agarose NuSieve gel electrophoresis ของตัวอย่างนกระเรียนพันธุ์ไทยจากสวนสัตว์เปิดเขาเขียวและสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ โดยใช้ไพรเมอร์ Gpa36.....	55
ภาพที่ 38	การตรวจสอบขนาด microsatellite band ด้วยวิธี 3% agarose NuSieve gel electrophoresis ของตัวอย่างนกระเรียนพันธุ์ไทยจากสวนสัตว์เปิดเขาเขียวและสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ โดยใช้ไพรเมอร์ Gpa37.....	56
ภาพที่ 39	การตรวจสอบขนาด microsatellite band ด้วยวิธี 3% agarose NuSieve gel electrophoresis ของตัวอย่างนกระเรียนพันธุ์ไทยจากสวนสัตว์เปิดเขาเขียวและสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ โดยใช้ไพรเมอร์ Gpa38.....	56
ภาพที่ 40	การตรวจสอบขนาด microsatellite band ด้วยวิธี 3% agarose NuSieve gel electrophoresis ของตัวอย่างนกระเรียนพันธุ์ไทยจากสวนสัตว์เปิดเขาเขียวและสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ โดยใช้ไพรเมอร์ Gpa39.....	57
ภาพที่ 41	การตรวจสอบขนาด microsatellite band ด้วยวิธี 3% agarose NuSieve gel electrophoresis ของตัวอย่างนกระเรียนพันธุ์ไทยจากสวนสัตว์เปิดเขาเขียวและสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ โดยใช้ไพรเมอร์ Gpa41.....	57
ภาพที่ 42	ผล electropherogram ที่มีรูปแบบอัลลีลแบบ homozygous.....	59
ภาพที่ 43	ผล electropherogram ที่มีรูปแบบอัลลีลแบบ heterozygous.....	59
ภาพที่ 44	ผลการวิเคราะห์ genetic clustering ที่แสดง $K = 1$ ซึ่งได้จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม STRUCTURE ด้วย polymorphic loci จำนวน 10 โลไซ.....	83
ภาพที่ 45	ผลการวิเคราะห์ genetic clustering ที่แสดง $K = 1$ ซึ่งได้จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม STRUCTURE ด้วย polymorphic loci จำนวน 8 โลไซ.....	90



- ภาพที่ 46 ผลการวิเคราะห์ genetic clustering ที่แสดง  $K = 1$  ซึ่งได้จากการวิเคราะห์  
ด้วยโปรแกรม STRUCTURE ด้วย polymorphic loci จำนวน 13 โลไซ..... 96
- ภาพที่ 47 การตรวจสอบขนาดของ PCR product เพื่อระบุเพศของนกกระเรียนด้วย  
ไพรเมอร์ 2550F/2718R เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในยีน CHD ..... 116
- ภาพที่ 48 การตรวจสอบขนาดของ PCR product เพื่อระบุเพศของนกกระเรียนโดยใช้  
ชุดไพรเมอร์ AWS05/NRD4 และ SINT-F/SINT-R เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอใน  
ตำแหน่ง EE0.6 ..... 116



## บทที่ 1

### บทนำ

นกกระเรียน (crane) จัดอยู่ในวงศ์ Gruidae ซึ่งเป็นวงศ์ของนกน้ำขนาดใหญ่ พบได้ 15 ชนิดทั่วโลก มีรูปร่างสูงโปร่ง คอและขายาว ซึ่งนกกระเรียนแต่ละชนิดจะมีขนาดตัวที่แตกต่างกันไป โดยนกกระเรียนที่มีขนาดใหญ่ที่สุดคือ sarus crane จัดอยู่ในสกุล *Grus* ชนิด *G. antigone* ซึ่งแบ่งออกเป็น 4 ชนิดย่อย ได้แก่ นกกระเรียนพันธุ์อินเดีย (Indian sarus crane: *G. a. antigone*) (นุชจรีพีชคุณ, 2556) มีขนาดใหญ่ที่สุด มีปลอกคอสีขาวคั่นอยู่ระหว่างคอตอนบนและคอตอนล่าง ขนตามลำตัวมีสีเทา ปัจจุบันกระจายตัวอยู่ในประเทศอินเดีย เนปาลและปากีสถาน (Sundar et al., 2000) นกกระเรียนพันธุ์ออสเตรเลีย (Australian sarus crane: *G. a. gillae*) มีขนาดตัวเล็กที่สุด มีหนังเปลือกสีแดงอยู่บริเวณคอแต่จะไม่แผ่ขยายลงมามากเท่ากับชนิดย่อยอื่น ๆ ปัจจุบันพบอยู่ทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศออสเตรเลีย (Archibald et al., 2003; Jones, Barzen, et al., 2005) Philippine sarus crane (*G. a. luzonica*) พบได้ที่ประเทศฟิลิปปินส์เท่านั้น ซึ่งขณะนี้ได้สูญพันธุ์ไปแล้ว และชนิดย่อยสุดท้าย คือ นกกระเรียนพันธุ์ไทย (eastern sarus crane: *G. a. sharpii*) พบการกระจายตัวในประเทศกัมพูชา พม่า ลาว และเวียดนาม ปัจจุบันพบว่าประชากรของนกชนิดย่อยนี้มีแนวโน้มลดลงเป็นอย่างมากจนถูกจัดให้อยู่ในสถานะที่เสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ (vulnerable: VU) (BirdLife International, 2016) นอกจากนี้ประเทศไทยยังเป็นประเทศหนึ่งที่เคยพบการกระจายตัวของนกกระเรียนพันธุ์ไทยมาก่อน แต่เนื่องจากแหล่งพื้นที่ชุ่มน้ำซึ่งเป็นบริเวณที่อยู่อาศัยของนกถูกทำลาย จึงทำให้นกสูญพันธุ์ไปจากธรรมชาติของประเทศไทย (extinct in the wild: EW) มานานกว่า 40 ปี และยังคงจัดอยู่ในบัญชีรายชื่อ 1 ใน 15 ชนิดสัตว์ป่าสงวนของประเทศไทย ตามพระราชบัญญัติสงวนและคุ้มครองสัตว์ป่า พ.ศ. 2535 (Purchkoon et al., 2015; Sangransombat, 2005) จากเหตุการณ์ดังกล่าวทำให้ทั้งองค์การสวนสัตว์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ และสำนักอนุรักษ์สัตว์ป่า กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช ได้ตระหนักถึงความสำคัญของการคืนชีวิตให้นกกระเรียนพันธุ์ไทยได้กลับมาอาศัยอยู่ในธรรมชาติของประเทศไทยอีกครั้ง การเพาะเลี้ยงและขยายพันธุ์นกกระเรียนในสภาพกรงเลี้ยงจึงเป็นหนึ่งในแนวทางสำคัญที่จะช่วยเพิ่มจำนวนและอัตราการรอดของประชากรให้ดำรงอยู่ต่อไป อีกทั้งยังเป็นแหล่งสำคัญในการเพาะขยายพันธุ์เพื่อปล่อยนกกระเรียนพันธุ์ไทยกลับคืนสู่พื้นที่ชุ่มน้ำในธรรมชาติในอนาคต ทั้งนี้หากนกกระเรียนพันธุ์ไทยที่นำมาเพาะเลี้ยงสามารถดำรงชีวิตและขยายพันธุ์ต่อในธรรมชาติของประเทศไทยได้แล้วนั้น จะสามารถบ่งบอกถึงความอุดมสมบูรณ์ของแหล่งพื้นที่ชุ่มน้ำและความเหมาะสมที่จะใช้พื้นที่เหล่านั้นเป็นแหล่งที่อยู่อาศัยของนกกระเรียนได้ (ภูวตล โภภณเกียรติ, 2555)

ปัจจุบันแหล่งเพาะเลี้ยงและขยายพันธุ์นกกกระเรียนพันธุ์ไทยในประเทศไทยมี 3 พื้นที่ด้วยกัน คือ สวนสัตว์นครราชสีมา จังหวัดนครราชสีมา สวนสัตว์เปิดเขาเขียว และสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ จังหวัดชลบุรี ซึ่งในแต่ละพื้นที่ได้รับบริจาคประชากรตั้งต้น (founder) จากธรรมชาติของประเทศไทยโดยประชาชนบริเวณชายแดนไทย-กัมพูชาในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน กล่าวคือในช่วงปี พ.ศ. 2533-2540 สวนสัตว์นครราชสีมาได้รับนกกกระเรียนพันธุ์ไทยจำนวน 27 ตัว (Purchkoon et al., 2015) และในช่วงปี พ.ศ. 2538-2542 สวนสัตว์เปิดเขาเขียวได้รับลูกนกจำนวน 15 ตัว และสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ ได้รับลูกนกจำนวน 17 ตัว โดยนกกทั้ง 59 ตัวที่ได้กล่าวไปข้างต้นได้นำมาใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ตั้งต้นในการเพาะเลี้ยงและขยายพันธุ์นกกกระเรียนของแต่ละพื้นที่ ซึ่งการเพาะเลี้ยงและขยายพันธุ์นกกในพื้นที่ของสวนสัตว์นครราชสีมาประสบความสำเร็จอย่างมาก เนื่องจากสามารถเพิ่มจำนวนประชากรรุ่นลูกได้มากกว่า 100 ตัว โดยในปี พ.ศ. 2554 ได้มีการเริ่มต้นปล่อยนกกกระเรียนที่เพาะพันธุ์ได้สู่พื้นที่ชุ่มน้ำในธรรมชาติ 2 แห่ง ได้แก่ เขตห้ามล่าสัตว์ป่าอ่างเก็บน้ำห้วยจรเข้มาก และ เขตห้ามล่าสัตว์ป่าอ่างเก็บน้ำสนามบิน จังหวัดบุรีรัมย์ จากการสำรวจและเก็บข้อมูลพบว่าประชากรนกกสามารถอยู่รอดในธรรมชาติได้กว่า 60 เปอร์เซ็นต์ และยังสามารถให้กำเนิดลูกนกในธรรมชาติได้ (Purchkoon et al., 2015) ปัจจุบันสำนักงานนโยบายและแผนทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม (2556) ได้ยกระดับสถานะทางการอนุรักษ์ของนกกกระเรียนพันธุ์ไทยจากสูญพันธุ์ในธรรมชาติ (extinct in the wild: EW) ให้เป็นเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ในขั้นวิกฤต (critically endangered: CR)

แม้ว่าการเพาะเลี้ยงและขยายพันธุ์นกกกระเรียนพันธุ์ไทยจะประสบความสำเร็จในการเพิ่มจำนวนและอัตราการอยู่รอดของนกได้ แต่การมีพ่อแม่พันธุ์ตั้งต้นจำนวนน้อยจะส่งผลให้กลุ่มถัดไปมีโอกาสเกิดการผสมพันธุ์ในเครือญาติ (inbreeding) เพิ่มขึ้น โดยจะส่งผลให้ความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำลง และมีผลต่อการอยู่รอดและการสืบพันธุ์ (fitness) ของประชากรในธรรมชาติในอนาคตได้ (Keller and Waller, 2002) เช่น นกจะอ่อนแอ ติดเชื้อโรคได้ง่ายและไม่สามารถทนทานต่อการคัดเลือกโดยธรรมชาติได้ จนสุดท้ายแล้วประชากรนกกกระเรียนอาจสูญพันธุ์ไปจากธรรมชาติของประเทศไทยอีกครั้ง ดังนั้นการพิจารณาค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากรนกกกระเรียนพันธุ์ไทยในสภาพกรงเลี้ยง โดยเฉพาะอย่างยิ่งกลุ่มพ่อแม่พันธุ์ตั้งต้น จึงมีความจำเป็นอย่างมากต่อการวางรากฐานการจัดการวางแผนเพาะเลี้ยงและขยายพันธุ์ต่อไป

ปัจจุบันความก้าวหน้าของเทคโนโลยีทางชีววิทยาโมเลกุลสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในงานวิจัยเกี่ยวกับพันธุศาสตร์ประชากร (population genetics) ได้โดยใช้เครื่องหมายทางพันธุกรรม ยกตัวอย่างเช่น Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP), Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR), Simple Sequence Repeat (SSR) หรือ เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ (microsatellite DNA marker) ซึ่งเป็นเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่นิยมนำมาใช้ศึกษาความ

หลากหลายทางพันธุกรรมของประชากร เพราะสามารถแยกความแตกต่างของอัลลีลแบบ homozygous และ heterozygous ได้ (Wan et al., 2004) โดย heterozygous allele ที่แสดงในประชากรสามารถนำมาใช้วิเคราะห์ค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมผ่านค่า heterozygosity ได้ อีกทั้งยังง่ายต่อการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอซึ่งใช้เพียงเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) เท่านั้น แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกกระเรียนพันธุ์ไทยยังมีอยู่น้อย (Das, 2010; Insee, 2013; Jones, Krapu, et al., 2005; Tanee et al., 2009) อีกทั้งยังไม่เคยมีการนำเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์มาเป็นเครื่องหมายทางพันธุกรรมในการตรวจสอบโครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรนกกระเรียนพันธุ์ไทยในสภาพกรงเลี้ยงของประเทศไทยมาก่อน โดยที่ผ่านมามีเพียงการศึกษาของ Tanee et al. (2009) ที่ได้ใช้เครื่องหมาย ISSR มาตรวจสอบค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกกระเรียนพันธุ์ไทยในพื้นที่ของสวนสัตว์นครราชสีมาจำนวน 27 ตัว โดยค่า Shannon's diversity index ( $H'$ ) ที่บ่งบอกความหลากหลายทางพันธุกรรมแสดงผลเท่ากับ 0.501 แสดงว่ากลุ่มประชากรนกที่ศึกษามีค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ค่อนข้างสูง แต่มีค่าความสม่ำเสมอทางพันธุกรรม (genetic evenness: E) ต่ำ โดยค่า E มีค่าเท่ากับ 0.152 (Tanee et al., 2009) และการศึกษาของ Insee (2013) ได้หาความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกกระเรียนพันธุ์ไทยจากตัวอย่างพ่อแม่พันธุ์ตั้งต้นจำนวน 51 ตัว ด้วยเครื่องหมายไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ ผลการศึกษาพบว่านกกระเรียนจากสวนสัตว์นครราชสีมา สวนสัตว์เปิดเขาเขียว และสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง โดยพบแฮพโลไทป์จำนวน 46 แฮพโลไทป์ (Insee, 2013) ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงสนใจคัดกรองเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ที่สามารถนำมาใช้ในการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม โดยการประยุกต์ใช้เครื่องหมายทางพันธุกรรมจากนกกระเรียนที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดทางวิวัฒนาการ (cross-species amplification) มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย และหาค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกกระเรียนในพื้นที่ของสวนสัตว์เปิดเขาเขียว และสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ จาก polymorphic primer ที่เหมาะสม ทั้งนี้ผลการศึกษาที่ได้จะทำให้ทราบโครงสร้างทางพันธุกรรมของนกกระเรียนพันธุ์ไทยในสภาพกรงเลี้ยง เพราะการทราบโครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรเป็นขั้นตอนสำคัญที่จะใช้ในการวางแผนการเพาะเลี้ยงเพื่อให้ประชากรรุ่นถัดไปมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง และเหมาะสมสำหรับใช้เป็นตัวแทนในการปล่อยนกกระเรียนคืนสู่ธรรมชาติในอนาคตได้อย่างมีประสิทธิภาพ

### วัตถุประสงค์

1. เพื่อคัดกรองเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ที่สามารถนำมาใช้กับนกระเรียนพันธุ์ไทยในสภาพ  
กรงเลี้ยงด้วยวิธี cross-species amplification
2. เพื่อตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกระเรียนพันธุ์ไทยในสภาพกรงเลี้ยงของสวน  
สัตว์เปิดเขาเขียวและสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ ด้วยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์



## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 นกกระเรียน

นกกระเรียนเป็นนกน้ำขนาดใหญ่ โดยเฉลี่ยมีความสูงประมาณ 90–150 เซนติเมตร จัดอยู่ในอันดับ Gruiformes วงศ์ Gruidae มี 2 วงศ์ย่อย คือ Balearicinae เรียกนกกลุ่มนี้ว่า crowned crane และ Gruinae เรียกว่า typical crane นกกระเรียนแบ่งออกเป็น 4 สกุล 15 ชนิด ได้แก่ สกุลของ crowned crane คือ *Balearica* ประกอบด้วยนกกระเรียน 2 ชนิด คือ black crowned crane (*B. pavonina*) และ grey crowned crane (*B. regulorum*) สกุลของ typical crane มี 3 สกุล คือ *Anthropoides* ประกอบด้วยนกกระเรียน 2 ชนิด คือ demoiselle crane (*A. virgo*) และ blue crane (*A. paradisea*) สกุล *Bugeranus* ประกอบด้วยนกกระเรียนเพียงชนิดเดียว คือ wattled crane (*B. carunculatus*) และสกุล *Grus* มีจำนวนชนิดของนกกระเรียนมากที่สุดถึง 10 ชนิด คือ Eurasian crane (*G. grus*) sandhill crane (*G. canadensis*) whooping crane (*G. americana*) brolga (*G. rubicunda*) Siberian crane (*G. leucogeranus*) white-naped crane (*G. vipio*) hooded crane (*G. monacha*) black-necked crane (*G. nigricollis*) red-crowned crane (*G. japonensis*) และ sarus crane (*G. antigone*) (Krajewski, 1989; Krajewski and Fetzner, 1994; Krajewski et al., 2010; Meine and Archibald, 1996) ลักษณะโดยทั่วไปของนกกระเรียนคือมีคอและขายาว ลำตัวมีรูปร่างปราดเปรียวเพื่อเหมาะกับการบิน ความแตกต่างของนกกระเรียนกับนกน้ำชนิดอื่น ๆ เช่น นกกระสา และ นกยาง สามารถสังเกตได้จากลักษณะการบิน โดยนกกระเรียนจะเหยียดคอตรงขณะบิน มีคอและขายาวกว่า นกกระเรียนที่มีขนาดเล็กและใหญ่ที่สุดคือ demoiselle crane และ sarus crane ตามลำดับ

นกกระเรียนทั้ง 15 ชนิดมีการกระจายตัวตั้งแต่ทวีปอเมริกาเหนือ เอเชีย ออสเตรเลีย และแอฟริกา แต่ยกเว้นในทวีปอเมริกาใต้ นกกระเรียนแต่ละชนิดจะมีรูปร่างและลักษณะที่แตกต่างกันออกไป ดังนี้ (Meine and Archibald, 1996)

1. Black crowned crane (*B. pavonina*) มีขนสีทองอยู่เป็นกระจุกบริเวณกระหม่อมหัว ทำให้มีลักษณะคล้ายมงกุฏ บริเวณแก้มมีแผ่นผิวหนังสีขาวและสีแดงแต้มอยู่ ขนบริเวณลำตัวมีสีเข้มจนเกือบดำซึ่งจะตัดกับสีขนบริเวณ upper และ under coverts ของบริเวณปีกซึ่งมีสีขาว (ภาพที่ 1 ก)
2. Grey crowned crane (*B. regulorum*) มีขนสีทองอยู่เป็นกระจุกคล้ายมงกุฏเช่นเดียวกับ Black crowned crane บริเวณแก้มมีแผ่นผิวหนังเปลี่ยนสีขาวแต้มอยู่ ใต้คางมีผิวหนัง

เปลือกสีแดงลักษณะคล้ายถุง (gular sac) ขนบริเวณลำตัวมีสีเทา ขนบริเวณปีกจะไล่สีตั้งแต่สีขาวสีน้ำตาล และสีทอง (ภาพที่ 1 ข)

3. Demoiselle crane (*A. virgo*) เป็นนกกกระเรียนที่มีขนาดเล็กที่สุด มีความสูงประมาณ 3 ฟุต หรือประมาณ 91 เซนติเมตร Demoiselle crane เป็น 1 ใน 2 ชนิดของนกกกระเรียนที่ไม่มีผิวหนังเปลือกสีแดงอยู่บริเวณหน้าหรือกระหม่อม ขนบริเวณลำตัวมีสีเทาน้ำเงินจาง ขนบริเวณหัวจนถึงคอมีสีดำ โดยขนบริเวณคอส่วนล่างจนถึงบริเวณอกมีขนสีดำยาวคล้ายกับสร้อยคอ ขนบริเวณด้านหลังดวงตาและบนกระหม่อมมีสีขาว ดวงตามีสีแดงส้ม และจงอยปากค่อนข้างสั้น (ภาพที่ 1 ค)
4. Blue crane (*A. paradisea*) เป็นนกกกระเรียนอีกชนิดที่มีขนาดเล็ก มีความสูงประมาณ 4 ฟุต หรือประมาณ 122 เซนติเมตร และไม่มีผิวหนังเปลือกสีแดงอยู่บริเวณหน้าหรือกระหม่อม ขนบริเวณลำตัวมีสีเทาฟ้าประกายเงิน โดยจะมีสีเข้มขึ้นในบริเวณของคอตอนบน และส่วนครึ่งล่างของหัวและต้นคอ ขนบริเวณปลายปีกมีสีเข้ม และมีความยาวจนเกือบจะแตะกับพื้น (ภาพที่ 1 ง)
5. Wattled crane (*B. carunculatus*) ลักษณะเด่นของนกกกระเรียนชนิดนี้คือมีเหนียงห้อยลงมาจากแก้มทั้ง 2 ข้าง ขนบริเวณลำตัวมีสีเทา บริเวณใบหน้า คอ และอกส่วนบนมีขนสีขาว ส่วนกระหม่อม อกตอนล่าง และขนปีกมีสีดำ ผิวหนังเปลือกที่หุ้มตั้งแต่ส่วนหน้าของตาจะแผ่ขยายยาวลงไปปกคลุมส่วนฐานของจงอยปากเล็กน้อย รวมถึงส่วนของเหนียงด้วย (ภาพที่ 1 จ)
6. Eurasian crane (*G. grus*) ขนบริเวณลำตัวเป็นสีเทาเกือบทั้งหมด โดยจะมีส่วนของหลังและสะโพกที่มีสีเข้มกว่า บริเวณกระหม่อมด้านหน้ามีขนสีดำซึ่งสีจะตัดกับผิวหนังเปลือกสีแดงที่อยู่ในส่วนถัดมา ทำให้ดูคล้ายเป็นมงกุฎ ส่วนของคางยาวลงมาจนถึงคอตอนหน้ามีขนสีดำไปจนถึงสีเทา ส่วนขนบริเวณหลังดวงตาลงมาจนถึงคอด้านหลังจะมีขนสีขาวยาวลงมาเป็นแถบ (ภาพที่ 1 ฉ)
7. Sandhill crane (*G. canadensis*) ขนบริเวณลำตัวมีสีเทา บริเวณกระหม่อมด้านหน้ามีผิวหนังเปลือกสีแดงหุ้มอยู่ ขนในส่วนของใบหน้า คาง คอตอนบน และหลังมีสีขาวไปจนถึงสีเทาจาง (ภาพที่ 1 ช)

8. Whooping crane (*G. americana*) ขนบริเวณลำตัวมีสีขาว บริเวณกระหม่อมมีผิวหนังเปลือยสีแดงหุ้มอยู่ ขนบริเวณท้ายทอยและใต้ตาเป็นสีดำ ขนบริเวณปลายปีกมีสีดำซึ่งจะสังเกตเห็นได้เมื่อนกกางปีก (ภาพที่ 1 ซ)
9. Brolga (*G. rubicunda*) ขนบริเวณลำตัวมีสีเทา บริเวณกระหม่อมมีผิวหนังเปลือยสีเทาอมเขียว บริเวณแก้ม คาง และท้ายทอยมีผิวหนังเปลือยสีแดง ขนปลายปีก (primary feather) มีสีดำ ส่วนขนกลางปีก (secondary feather) มีสีเทา (ภาพที่ 1 ฉ)
10. Siberian crane (*G. leucogeranus*) ขนบริเวณลำตัวเป็นสีขาวทั้งหมด ยกเว้นขนปลายปีกที่มีสีดำ บริเวณใบหน้า หน้าผาก และกลางกระหม่อม มีผิวหนังเปลือยสีแดง (ภาพที่ 1 จ)
11. White-naped crane (*G. vipio*) เป็นนกกระเรียนเพียงชนิดเดียวที่มีแถบสีที่คอเป็นแถบสีเทาเข้มและสีขาว โดยบริเวณใต้คางและท้ายทอยมีขนสีขาว แต่บริเวณคอด้านหน้ายาวลงมาจนถึงอกมีขนสีเทาเข้ม บริเวณขอบตาและแก้มมีผิวหนังเปลือยสีแดงอยู่โดยรอบ ขนบริเวณลำตัวมีสีเทาเข้ม และขนปีกมีสีเทาเงิน (ภาพที่ 1 ฉ)
12. Hooded crane (*G. monacha*) ขนบริเวณลำตัวมีสีเทา บริเวณหัวและคอมีขนสีขาว แต่บริเวณกระหม่อมมีผิวหนังเปลือยสีแดงซึ่งปกคลุมไปด้วยขนสีดำเล็กน้อย ขนปลายปีก และขนกลางปีกมีสีดำ (ภาพที่ 1 ฉ)
13. Black-necked crane (*G. nigricollis*) ขนบริเวณลำตัวมีสีเทา บริเวณหัวจนถึงคอตอนบนมีขนสีดำ ยกเว้นบริเวณหลังดวงตาจะมีขนสีขาวหรือเทาเป็นจุดอยู่เล็กน้อย และบริเวณกระหม่อมมีผิวหนังเปลือยสีแดงหุ้มอยู่ (ภาพที่ 1 ฐ)
14. Red-crowned crane (*G. japonensis*) ขนบริเวณลำตัวมีสีขาวบริสุทธิ์ ซึ่งสีตัดกับสีขนบริเวณกลางปีกที่เป็นสีดำ ขนตั้งแต่บริเวณหลังดวงตาวาวลงไปจนถึงท้ายทอยคาดด้วยแถบขนสีขาว บริเวณหน้าผากจนถึงกระหม่อมหัวปกคลุมด้วยผิวหนังเปลือยสีแดงทำให้มีลักษณะคล้ายมงกุฎสีแดงอยู่บนหัว (ภาพที่ 1 ซ)
15. Sarus crane (*G. antigone*) เป็นนกที่มีความสูงมากที่สุดในบรรดานกกลุ่มนกที่บินได้ (carinate) ขนบริเวณลำตัวมีสีเทา บริเวณกระหม่อมหัวมีผิวหนังเปลือยสีเทาเขียว บริเวณหัว คาง และคอตอนบนปกคลุมด้วยผิวหนังเปลือยสีแดง และมีขนสีดำปกคลุมอยู่บริเวณคอด้วย (ภาพที่ 1 ฉ)





ภาพที่ 1 ลักษณะสัณฐานภายนอกของนกรกระเรียน 15 ชนิดทั่วโลก ได้แก่ black crowned crane (ก.) grey crowned crane (ข.) demoiselle crane (ค.) blue crane (ง.) wattled crane (จ.) Eurasian crane (ฉ.) Sandhill crane (ช.) Whooping crane (ซ.) brolga (ฅ.) Siberian crane

(ญ.) white-naped crane (ฎ.) hooded crane (ฏ.) black-necked crane (ฐ.) red-crowned crane (ฑ.) และ sarus crane (ฒ.)

ภาพ ก. จาก <http://www.chesterzoo.org/~media/images/animals/birds/cranes/black-crowned-crane/black-crowned-crane800.jpg?la=en>

ภาพ ข. จาก [https://sites.google.com/site/hayawanatulyameen2558/\\_/rsrc/144772722929/nk-krareiyng-mngkud-thea-1/15.jpg?height=192&width=320](https://sites.google.com/site/hayawanatulyameen2558/_/rsrc/144772722929/nk-krareiyng-mngkud-thea-1/15.jpg?height=192&width=320)

ภาพ ค. จาก <http://s-media-cache-ak0.pinimg.com/736xb1/90/da/b190daff771151a08886ea30c57Edb95.jpg>

ภาพ ง. จาก <http://www.sa-venues.com/attractions/gallery/westerncape/816/1.jpg>

ภาพ จ. จาก [http://1.bp.blogspot.com/wh0ij7Ax2Ck/SsEQqRjA3I/AAAAAAAAeHM7g6UEsoysaM/s1600/DSC\\_2132.JPG](http://1.bp.blogspot.com/wh0ij7Ax2Ck/SsEQqRjA3I/AAAAAAAAeHM7g6UEsoysaM/s1600/DSC_2132.JPG)

ภาพ ฉ. จาก <http://3.bp.blogspot.com/mXu7gqL6dg/ULjlosW9Uli/AAAAAAAAEwA/2PLJ6jNkTOY/s1600/Common+crane+Grus+grus.jpg>

ภาพ ช. จาก [http://animalia-life.club/data\\_images/sandhill-crane/sandhill-crane1.jpg](http://animalia-life.club/data_images/sandhill-crane/sandhill-crane1.jpg)

ภาพ ซ. จาก <http://focusingonwildlife.com/news/wp-content/uploads/2012/01/Whooping-Crane-in-flight-Aransas-National-Wildlife-Refuge-Kevin-Sims1.jpg>

ภาพ ฌ. จาก <https://svtakeiteasy.files.wordpress.com/2016/03/brolga-4.jpg?w=700>

ภาพ ญ. จาก <http://cdn2.arkive.org/media/FA/FACB5D87-1FF8-4E35-BE13-5FA4422AB485/Presentation.Large/Siberian-crane-courtship-display.jpg>

ภาพ ฎ. จาก [http://www.birdskorea.org/Images/images2009/03/White-naped-Crane\\_RN-02.jpg](http://www.birdskorea.org/Images/images2009/03/White-naped-Crane_RN-02.jpg)

ภาพ ฏ. จาก [http://2bp.blogspot.com/-V2mxjaUrWXU/UrWXU/USaXmSuMOVI/AAAAAAAFsA/YE9z1SXXcoM/s1600/Hooded-Crane\\_MG\\_5088.jpg](http://2bp.blogspot.com/-V2mxjaUrWXU/UrWXU/USaXmSuMOVI/AAAAAAAFsA/YE9z1SXXcoM/s1600/Hooded-Crane_MG_5088.jpg)

ภาพ ฐ. จาก [http://2.bp.blogspot.com/-NOdpmomlkvY/VZ7SjazgSBI/AAAAAAACz40/\\_Lp6Rwqj3WQ/s1600/Black-necked%2BCrane-Tsokar-28%2B2015-749326.jpg](http://2.bp.blogspot.com/-NOdpmomlkvY/VZ7SjazgSBI/AAAAAAACz40/_Lp6Rwqj3WQ/s1600/Black-necked%2BCrane-Tsokar-28%2B2015-749326.jpg)

ภาพ ท. จาก [http://upload.wikimrdia.org/wikipedia/commons/1/1e/Japanese\\_kraanvogel\\_s\\_in\\_Akan\\_International\\_Crane\\_Centre,\\_-24\\_februari\\_2012\\_a.jpg](http://upload.wikimrdia.org/wikipedia/commons/1/1e/Japanese_kraanvogel_s_in_Akan_International_Crane_Centre,_-24_februari_2012_a.jpg)

ภาพ ฒ. จาก คุณสมิทธิ์ สุตติบุตร

## 2.2 Sarus crane

### 2.2.1 อนุกรมวิธาน

Sarus crane มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Grus antigone* Linnaeus, 1758 โดยสามารถจัดอันดับทางอนุกรมวิธานได้ดังนี้

Class	Aves
Order	Gruiformes
Family	Gruidae
Genus	<i>Grus</i>
Species	<i>G. antigone</i> Linnaeus, 1758

Sarus crane ที่ยังพบเห็นในปัจจุบันแบ่งออกเป็น 3 ชนิดย่อย (subspecies) ดังนี้

1. นกกระเรียนพันธุ์อินเดีย (Indian sarus crane: *G. a. antigone*)
2. นกกระเรียนพันธุ์ไทย (Eastern sarus crane: *G. a. sharpii*)
3. นกกระเรียนพันธุ์ออสเตรเลีย (Australian sarus crane: *G. a. gillae*)

### 2.2.2 ลักษณะทั่วไป

Sarus crane เป็นนกกระเรียนที่มีขนาดตัวสูงที่สุดเมื่อเทียบกับนกบินได้ชนิดอื่น ๆ และเมื่อเทียบขนาดตัวระหว่างชนิดย่อยแล้วพบว่า นกกระเรียนพันธุ์อินเดียมีขนาดตัวสูงที่สุด โดยมีความสูงมากถึง 175 เซนติเมตร (Meine and Archibald, 1996) รองลงมาคือนกกระเรียนพันธุ์ไทย และนกกระเรียนพันธุ์ออสเตรเลีย ตามลำดับ sarus crane จัดเป็นนกที่มีรูปร่างสูงโปร่ง คอและขายาว ขนบริเวณลำตัวและปีกเป็นสีเทา ขนปลายปีกจะมีสีเข้มกว่าขนกลางปีก โดยนกกระเรียนพันธุ์ไทยจะมีขนสีเทาเข้มกว่าชนิดย่อยอื่น ๆ นอกจากนี้บริเวณหัวและคอตอนบนจะมีผิวหนังเปลือยสีแดงหุ้มอยู่ โดยผิวหนังในส่วนนี้จะสีสดขึ้นเมื่อเข้าสู่ฤดูผสมพันธุ์ ในนกกระเรียนพันธุ์อินเดียจะมีการสังเกตเห็นปลอกคอสีขาวคั่นอยู่ระหว่างคอตอนบนและคอตอนล่างอย่างชัดเจน ส่วนในชนิดย่อยอื่น ๆ จะปรากฏให้เห็นไม่ชัดเจน (Archibald et al., 2003; Insee, 2013; Meine and Archibald, 1996) (ภาพที่ 2) แต่อย่างไรก็ตามเมื่อดูสัณฐานภายนอกคร่าว ๆ แล้วนั้นอาจจะไม่สามารถแยกชนิดย่อยระหว่างนกกระเรียนพันธุ์ไทยและนกกระเรียนพันธุ์ออสเตรเลียได้อย่างชัดเจนมากนักเพราะนกทั้งสองชนิดย่อยนี้มีลักษณะที่คล้ายคลึงกัน (Schodde et al., 1988) แต่อย่างไรก็ตามพบว่านกกระเรียนพันธุ์ออสเตรเลียมีขนาดตัวเล็กกว่า และมีขนบริเวณแผ่นปิดหู (ear patches) ใหญ่กว่านกกระเรียนพันธุ์ไทย นอกจากนี้ขนบริเวณคอด้านบนจะมีพื้นที่มากกว่าเพราะขนาดของผิวหนังเปลือยสีแดงมีน้อยกว่า (Schodde et al., 1988; ธวัชชัย ธานี, 2552)



ภาพที่ 2 เปรียบเทียบลักษณะสัณฐานภายนอกของ sarus crane 3 ชนิดย่อย ได้แก่ นกกระเรียนพันธุ์อินเดีย (ก.) นกกระเรียนพันธุ์ไทย (ข.) และ นกกระเรียนพันธุ์ออสเตรเลีย (ค.)

ภาพ ก. จาก <http://s-media.cache.ak0.pinimg.com/236x/c9/83/6e/c9836e637e323b0f867661181393dfb3.jpg>

ภาพ ข. จาก [http://birdsthatfart.com/uploads/3/4/3/9/34394500/8187079\\_orig.jpg](http://birdsthatfart.com/uploads/3/4/3/9/34394500/8187079_orig.jpg)

ภาพ ค. จาก <http://wildlifephotography-australia.com/wildlife/cranes/>

### 2.2.3 การกระจายตัวและขนาดประชากร

Sarus crane มีการกระจายตัวอยู่ในบริเวณของอนุทวีปอินเดีย เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และทางตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศออสเตรเลีย (ภาพที่ 3) โดยประชากรที่เหลืออยู่มีประมาณ 15,000–20,000 ตัว (Archibald et al., 2003) พื้นที่การกระจายตัวของนกกระเรียนพันธุ์อินเดีย ได้แก่ ประเทศอินเดีย เนปาล และปากีสถาน (Sundar et al., 2000) มีจำนวนประชากรประมาณ 8,000–10,000 ตัว นกกระเรียนพันธุ์ไทยมีการกระจายตัวอยู่ในประเทศพม่า ลาว กัมพูชา และเวียดนาม โดยกลุ่มประชากรที่อยู่ในประเทศพม่ามีประมาณ 500–800 ตัว ส่วนประชากรที่อยู่ในประเทศลาว กัมพูชา และเวียดนามนั้น มีประมาณ 800–1,000 ตัว และนกกระเรียนพันธุ์ออสเตรเลียมีการกระจายตัวอยู่ทางตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศออสเตรเลียและรัฐควีนส์แลนด์ คงเหลือประชากรที่ประมาณ 5,000 ตัว (Archibald et al., 2003; Insee, 2013)





ภาพที่ 3 ขอบเขตการกระจายตัวของ sarus crane ทั้ง 3 ชนิดย่อย

ภาพจาก [www.savingcranes.org/wp-content/uploads/2008/05/sarus\\_crane\\_1000.jpg](http://www.savingcranes.org/wp-content/uploads/2008/05/sarus_crane_1000.jpg)

#### 2.2.4 ถิ่นที่อยู่อาศัยและแหล่งอาหาร

Sarus crane ทั้ง 3 ชนิดย่อยมีพื้นที่ที่ใช้อาศัยได้อย่างหลากหลาย เช่น นกกระเรียนพันธุ์อินเดียเป็นนกที่สามารถต้านทานต่อการรบกวนของมนุษย์ได้มากกว่าชนิดย่อยอื่น ๆ จะชอบอาศัยอยู่ในพื้นที่ชุ่มน้ำ ไม่ว่าจะเป็นทุ่งหญ้า พื้นที่ชุ่มน้ำจากธรรมชาติ หรือ พื้นที่ชุ่มน้ำที่ถูกสร้างขึ้นจากมนุษย์ เช่น พื้นที่เกษตรกรรมต่าง ๆ ส่วนนกกระเรียนพันธุ์ไทยจะมีความสามารถในการต้านทานการรบกวนจากมนุษย์ได้น้อยกว่า ดังนั้นจึงชอบอาศัยอยู่เพียงบริเวณที่เป็นพื้นที่ชุ่มน้ำจากธรรมชาติมากกว่า ส่วนนกกระเรียนพันธุ์ออสเตรเลียจะมีพื้นที่การอยู่อาศัยและการหาอาหารทับซ้อนกับนกกระเรียน Brolga จึงมักชอบอยู่ในพื้นที่ที่มีความแห้งแล้งมากกว่า แต่จะต้องมีพื้นที่ชุ่มน้ำที่เพียงพอกับความต้องการด้วย โดยแหล่งอาหารพื้นฐานของนกเหล่านี้จะมีทั้งพืช ซึ่งเป็นหญ้าชนิด *Eleocharis* sp. รวมถึงสัตว์ขนาดเล็กทั้งสัตว์มีกระดูกสันหลังและไม่มีกระดูกสันหลัง (Archibald et al., 2003; Meine and Archibald, 1996; Yav et al., 2015)

#### 2.2.5 พฤติกรรมในฤดูผสมพันธุ์

นกกระเรียนมีพฤติกรรมการสืบพันธุ์เป็นแบบผสมพันธุ์คู่เดียวตลอดชีวิต (monogamous) ช่วงอายุที่นกกระเรียนจะเริ่มจับคู่ผสมพันธุ์จะเริ่มตั้งแต่วัยอายุ 2-3 ปี (Barzen and Seal, 2000;

Meine and Archibald, 1996) โดยช่วงฤดูผสมพันธุ์ (breeding season) ของนกกระเรียนพันธุ์ไทย และนกกระเรียนพันธุ์ออสเตรเลียจะอยู่ในช่วงฤดูมรสุม (เดือนพฤษภาคมถึงเดือนตุลาคม) แตกต่างจากนกกระเรียนพันธุ์อินเดียที่สามารถสืบพันธุ์ได้ตลอดทุกช่วงฤดู (ยกเว้นช่วงเดือนพฤษภาคมและเดือนมิถุนายน) แต่จะมากที่สุดในช่วงเดือนกรกฎาคมถึงเดือนกันยายน (Meine and Archibald, 1996) ในการจับคู่ผสมพันธุ์นกกระเรียนจะมีพฤติกรรมการเกี่ยวพาราสิ โดยคู่หนึ่งตัวผู้และตัวเมียจะมีการกระพือปีกไปรอบ ๆ พื้นที่ พร้อมทั้งมีการกระโดดหรือวิ่ง และมีการตบเท้า กระดกศีรษะขึ้นลง นอกจากนี้นกเพศผู้และเพศเมียจะมีการส่งเสียงร้องประสานกัน (unison call) ซึ่งจะเป็นการส่งเสียงเพียงไม่กี่วินาทีหรือมากถึง 1 นาทีได้ ในนกกระเรียนพันธุ์ไทยนกเพศผู้จะร้องเสียงยาวและมีระดับเสียงต่ำ พร้อมกับการยืดคอเงยปากทำมุมประมาณ 135 องศากับพื้นดิน และมีการกางปีกยกสูงเหนือระดับของหลัง หลังจากนั้นเพศเมียจะร้องประสานเสียงตามเพศผู้ แต่จะเปล่งเสียงร้องเพียงสั้น ๆ 2-3 ครั้ง เงยปากทำมุมประมาณ 60 องศากับพื้นดินและยื่นปีกหุบข้างลำตัว โดยนกทั้งสองเพศจะยื่นเคียงข้างกันตลอดการร้อง (ภาพที่ 4) บางครั้งนกเพศผู้จะยกปีกไปแตะที่หลังของนกเพศเมีย (Johnsgard, 1983; กรมป่าไม้ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2527; บุปผา อ่ำเกตุ และ ศิริพร ทองอารีย์, 2527; หทัยทิพย์ ศีกะชาติ ทรงกลด ภูทอง และ พันัส ธรรมกิตติวงศ์, 2555) และเนื่องจากลักษณะสัณฐานภายนอกของนกทั้งสองเพศค่อนข้างใกล้เคียงกัน การร้อง unison call ของนกกระเรียนวงศ์ย่อย *Gruinæ* จึงสามารถใช้แยกเพศของนกกระเรียนได้ (Meine and Archibald, 1996)

เมื่อนกกระเรียนเพศเมียได้เลือกเพศผู้ระหว่างขั้นตอนของการเกี่ยวพาราสิแล้วนั้นต่อไปจะเป็นช่วงของการผสมพันธุ์ โดยนกเพศผู้จะเดินเตาะขาตรงไปข้างหน้าเข้าหานกเพศเมีย คอตั้งตรงโน้มไปข้างหน้าเล็กน้อย เชิดหัวขึ้นไปในอากาศเกือบตั้งฉากกับพื้นดิน ในขณะที่นกเพศเมียจะหันหน้าไปในทิศทางเดียวกับเพศผู้ ยื่นย่อขาและกางปีกออกข้างลำตัว ส่วนหัวและคอจะอยู่ในรูปแบบคล้ายกับเพศผู้ หลังจากนั้นนกเพศผู้จะเดินเข้าไปหานกเพศเมียจากทางด้านหลัง แล้วบินขึ้นไปยืนอยู่บนหลังของนกเพศเมีย เมื่อทำการผสมพันธุ์เสร็จนกเพศผู้จะก้าวถอยหลังลงจากหลังหรือกระโดดข้ามหัวนกเพศเมียลงไป หลังจากนั้นนกทั้งสองเพศจะมายืนข้างกันพร้อมกับยืดคอขึ้นและพับหัวลงขิดคอและซอยเท้าถี่ ๆ แล้วจึงยกหัวขึ้นดังเดิม กิจกรรมหลังจากการผสมพันธุ์อาจเป็นการเดินรำ ไซ้ขน หรือคุ้ยเหยี่ยวหาอาหาร (กรมป่าไม้ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2527; บุปผา อ่ำเกตุ และ ศิริพร ทองอารีย์, 2527; หทัยทิพย์ ศีกะชาติ ทรงกลด ภูทอง และ พันัส ธรรมกิตติวงศ์, 2555)

ขอบเขตของการสร้างรังจะอยู่บริเวณพื้นที่ชุ่มน้ำ หรือ ตามแหล่งน้ำ โดยพื้นที่การสร้างรังของนกกระเรียนพันธุ์อินเดียไม่ได้ต้องการพื้นที่มากเท่ากับนกกระเรียนพันธุ์ไทย เพียงแค่มีพื้นที่ประมาณ 1 เฮกตาร์ ที่มีคุณภาพของน้ำและอาหารที่ดี รวมถึงเป็นพื้นที่ที่ถูกรบกวนจากมนุษย์ไม่มากนักเพียงพอแล้ว โดยปกติแล้วนกกระเรียนจะวางไข่ประมาณ 1-2 ฟอง และจะใช้เวลาในการฟักไข่ประมาณ 30-34 วัน ลูกนกที่ฟักออกมาแล้วจะอยู่กับพ่อแม่ประมาณ 9-10 เดือน หลังจากนั้นจะเริ่มหาอาหารได้

เอง และจะเริ่มเข้าสู่ช่วง breeding season ของพ่อแม่ใหม่อีกครั้ง (Meine and Archibald, 1996; กรมป่าไม้ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2527; บุปผา อ่ำเกตุ และ ศิริพร ทองอารีย์, 2527; หทัยทิพย์ ศึกษะชาติ ทรงกลด ภู่ทอง และ พันัส ธรรมกิริตวิงศ์, 2555)



**ภาพที่ 4** พฤติกรรมการเปล่งเสียงร้องแบบ unison call ของนกกระเรียนพันธุ์ไทย (ซ้าย: เพศผู้ ขวา: เพศเมีย) ภาพถ่ายโดยคุณจิตรทิวส์ พรประเสริฐ

## 2.2.6 สถานภาพทางการอนุรักษ์

ปัจจุบัน sarus crane มีแนวโน้มการลดลงของจำนวนประชากรเป็นอย่างมาก ทางองค์กรเพื่อการอนุรักษ์ระหว่างประเทศ IUCN (International Union for Conservation of Nature and Natural Resources) ได้จัด sarus crane เป็นกลุ่มสิ่งมีชีวิตที่มีแนวโน้มใกล้สูญพันธุ์ (VU: vulnerable) และอนุสัญญาว่าด้วยการค้าระหว่างประเทศซึ่งชนิดสัตว์ป่าและพืชป่าที่ใกล้สูญพันธุ์ CITES (The Conservation on International Trade in Endanger Species of Wild Fauna and Flora) (2016) ได้จัด sarus crane ไว้ในกลุ่ม Appendix II ซึ่งหมายถึง สัตว์กลุ่มที่อนุญาตให้ค้าขายได้ภายใต้การควบคุมการส่งออกของประเทศต้นกำเนิด และมีการรับรองโดยประเทศนั้น ๆ ว่าการค้าขายดังกล่าวไม่มีผลต่อการอยู่รอดของสิ่งมีชีวิตนั้น ๆ (BirdLife International, 2016)

จากการลดลงของประชากร sarus crane ทำให้เกิดความร่วมมือของประเทศต่าง ๆ กับมูลนิธินกรกระเรียนสากล หรือ International Crane Foundation (ICF) ร่วมกันแลกเปลี่ยนความรู้และวางแผนการอนุรักษ์ sarus crane ทั้งในพื้นที่ที่มีนกรกระเรียนอาศัยอยู่ รวมถึงพื้นที่ที่เคยมีรายงานพบนก เช่น ในการประชุม eastern sarus crane PHVA (population habitat viability assessment) workshop ที่จัดขึ้น ณ สวนสัตว์เปิดเขาเขียว จังหวัดชลบุรี ระหว่างวันที่ 15-17 มกราคม พ.ศ. 2540 ซึ่งผู้เข้าร่วมประชุมเป็นผู้ที่มีความเกี่ยวข้องกับการเลี้ยงและอนุรักษ์นกรกระเรียนพันธุ์ไทย ทั้งจากประเทศไทย ลาว กัมพูชา เวียดนาม พม่า จีน และเจ้าหน้าที่จาก ICF สหรัฐอเมริกา จุดประสงค์ของการประชุมนี้เพื่อให้พนักงานอนุรักษ์และเจ้าหน้าที่ที่เกี่ยวข้องได้เข้าใจถึงการดูแลเอาใจใส่ประชากรนกรกระเรียนพันธุ์ไทยทั้งในธรรมชาติและในกรงเลี้ยงให้มีประสิทธิภาพอย่างมากที่สุด รวมถึงผู้เข้าร่วมประชุมในแต่ละประเทศยังได้แลกเปลี่ยนข้อมูล คำแนะนำ และปัญหาที่เกิดขึ้นกับประชากรนกรกระเรียนในกลุ่มประเทศของตน เพื่อข้อมูลที่ได้แลกเปลี่ยนระหว่างกันนั้นจะเป็นประโยชน์กับประเทศอื่น ๆ ซึ่งสามารถนำข้อคิดเห็นต่าง ๆ ไปปรับใช้ในการเลี้ยงดู และแก้ไขปัญหาการอนุรักษ์ประชากรนกรกระเรียนพันธุ์ไทยได้ (Barzen and Seal, 2000)



## 2.3 นกกระเรียนพันธุ์ไทย (Eastern sarus crane)

### 2.3.1 ลักษณะทั่วไป

ลักษณะทั่วไปของลูกนกกระเรียนพันธุ์ไทยคือจะมีขนอูย (down feather) ปกคลุมทั่วตัว โดยบริเวณหัวและคอมีขนสีน้ำตาลลอมเหลือง บริเวณข้างอกและหลังด้านบนมีขนสีน้ำตาลเข้ม ส่วนบริเวณอกและท้องมีขนสีขาว (ภาพที่ 5) แต่ในนกที่ยังโตไม่เต็มวัยสีของขนที่ปกคลุมลำตัวจะมีสีน้ำตาลลอมเทา และขนบริเวณหัวจะมีสีน้ำตาลอ่อน (ภาพที่ 6) เมื่อนกโตเต็มวัยจากขนบริเวณลำตัวและปีกที่เคยเป็นสีน้ำตาลลอมเทา ได้ผลัดขนกลายเป็นสีเทาเข้มเกือบดำ ซึ่งเข้มกว่าในนกกระเรียนพันธุ์อินเดียและนกกระเรียนพันธุ์ออสเตรเลีย บริเวณคอจะไม่มีแถบขนสีขาวคั่นอยู่ระหว่างคอตอนบนและคอตอนล่างแบบนกกระเรียนพันธุ์อินเดีย คอส่วนบนมีผิวหนังเปลือยสีแดงหุ้มอยู่ บริเวณกลางกระหม่อมมีแผ่นหนังเปลือยสีเทาหรือสีเขียวยาวอ่อน มีแผ่นขนหูลีเทา ม่านตาสีส้มแดง ขายาวสีแดงอมชมพู (ภาพที่ 7) ความสูงเฉลี่ยประมาณ 150-180 เซนติเมตร โดยมีน้ำหนักตัวประมาณ 5-9 กิโลกรัม (Johnsgard, 1983; กรมป่าไม้ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2527) ลักษณะภายนอกของนกกระเรียนเพศผู้และเพศเมียไม่แตกต่างกัน แต่สามารถแยกเพศนกได้อย่างชัดเจนเมื่อเกิดพฤติกรรมส่งเสียงร้อง unison call (ภาพที่ 4) (Meine and Archibald, 1996)



ภาพที่ 5 ลักษณะสีฐานภายนอกของลูกนกกระเรียนพันธุ์ไทย

ภาพจาก <https://www.facebook.com/cranethailand/>



ภาพที่ 6 ลักษณะสีนฐานภายนอกของนกระเรียนพันธุ์ไทยที่ยังไม่โตเต็มวัย  
 ภาพถ่ายโดยคุณสมิทธิ สุติบุตร



ภาพที่ 7 ลักษณะสีนฐานภายนอกของนกระเรียนพันธุ์ไทยที่โตเต็มวัย  
 ภาพถ่ายโดยคุณสมิทธิ สุติบุตร

### 2.3.2 ถิ่นที่อยู่อาศัย

นกกกระเรียนพันธุ์ไทยเคยมีการกระจายตัวในหลายพื้นที่ในแถบอินโดจีน ไม่ว่าจะเป็นประเทศจีนที่สามารถพบนกกกระเรียนชนิดนี้ได้ ในบริเวณจังหวัดยูนนาน ประเทศฟิลิปปินส์ในบริเวณของเกาะลูซอน รวมถึงประเทศไทยก็เคยเป็นแหล่งที่อยู่อาศัยของนกกชนิดนี้เช่นกัน (Insee, 2013; Meine and Archibald, 1996) แต่เนื่องจากปัญหาของการถูกทำลายแหล่งที่อยู่อาศัยบริเวณพื้นที่ชุ่มน้ำ หรือแม้กระทั่งการล่า ทำให้นกกชนิดนี้ได้สูญพันธุ์ไปจากสามประเทศที่ได้กล่าวไปแล้วข้างต้น ในปัจจุบันนกกกระเรียนพันธุ์ไทยมีการกระจายตัวอยู่บริเวณประเทศกัมพูชา พม่า ลาว และเวียดนามเท่านั้น

การศึกษาและสำรวจแหล่งที่อยู่อาศัยของนกกกระเรียนพันธุ์ไทยมีรายงานน้อยมาก ซึ่งผลการสำรวจส่วนใหญ่พบว่านกกกระเรียนชนิดนี้นิยมเข้ามาหากินในพื้นที่อนุรักษ์ ได้แก่ บริเวณอุทยานแห่งชาติตรังชิม ซึ่งอยู่ทางตอนใต้ของประเทศเวียดนาม (Barzen and Seal, 2000; Tran and Barzen, 2016) อุทยานแห่งชาติ Yok Don ทางตะวันตกเฉียงใต้ของประเทศเวียดนาม โตนเลสาบทางตอนกลางของประเทศกัมพูชา (Barzen and Seal, 2000; Purchkoon et al., 2015) เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่า Lomphat เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่า Preah Vihear และเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่า Kulen Prontep ทางตอนเหนือของประเทศกัมพูชา (Mekong wetlands biodiversity programme, 2006) และพื้นที่การเกษตร ได้แก่ Ang Tropreang Thmal ทางตะวันตกเฉียงเหนือของประเทศกัมพูชา (ภูวดล โภภณเทียร, 2555)

### 2.3.3 นกกกระเรียนพันธุ์ไทยในประเทศไทย

นกกกระเรียนพันธุ์ไทยเคยมีการกระจายตัวอยู่ทั่วทุกภูมิภาคในประเทศไทย เช่น จังหวัดเชียงราย นครราชสีมา สระบุรี และบุรีรัมย์ เป็นต้น (จารุจินต์ นภิตะภักดิ์ กานต์ เลขกุล และ วัชรสงวนสมบัติ, 2555) โดยประวัติการพบนกกกระเรียนในประเทศไทยนั้นได้เคยมีการกล่าวถึงไว้ตั้งแต่ช่วงกรุงศรีอยุธยา โดยเจ้าฟ้าธรรมาธิเบศรไชยเชษฐาสุริยวงศ์ หรือเจ้าฟ้ากุ้ง ทรงพระนิพนธ์กาพย์ห่อโคลงประพาสธารทองแดง ซึ่งมีบทหนึ่งกล่าวถึงนกกกระเรียนครั้งเมื่อตามเสด็จสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวบรมโกศโดยชลมารคไปนมัสการพระพุทธบาท ที่จังหวัดสระบุรี โดยมีใจความดังนี้

นกกกระเรียนเวียนลงหนอง	ตรอมเที่ยวย่องร้องแกร์แกร์
ริมทุ่งกระทุงลอมแพ	เดียรดาชแลแหล่งเหลือหลายฯ
นกกกระเรียนเวียนว่อนน้ำ	เลงแล
ลงย่องร้องแกร์แกร์	แจ่มจ้า
ริมทุ่งกระทุงลอมแพ	ล่งล่อง
บินกราดกลุ้มท้องฟ้า	ร่อนร้องเหลือหลายฯ



นอกจากนี้สมเด็จพระเจ้าบรมวงศ์เธอกรมพระยาดำรงราชานุภาพ ในสมัยพระบาทสมเด็จพระจุลจอมเกล้าเจ้าอยู่หัว รัชกาลที่ 5 ได้บันทึกการพบนกกระเรียนในบันทึกเรื่อง “ลานนกกระเรียน” โดยมีใจความว่าพบนกกระเรียนจำนวนมากนับหมื่นตัวไปทำรังวางไข่ในบริเวณทุ่งมะค่า จังหวัดนครราชสีมา อีกทั้งยังมีหลักฐานของภาพถ่ายที่ถูกถ่ายไว้เมื่อปี พ.ศ. 2475 จากบริเวณหน้าบ้านกงพูน เอี่ยมศิริ ณ ตำบลประโคนชัย อำเภอประโคนชัย จังหวัดบุรีรัมย์ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเมื่อครั้งก่อนนกกระเรียนพันธุ์ไทยเคยเป็นสัตว์เลี้ยงที่อยู่คู่คนไทยมาก่อน (ภาพที่ 8) ในปี พ.ศ. 2488 มีการบันทึกว่าพบการบินผ่านของฝูงนกกระเรียนระหว่างเดือนมีนาคมถึงธันวาคมบริเวณจังหวัดเชียงใหม่และเชียงราย ประมาณ 8-40 ตัว ในปี พ.ศ. 2501 พบนกกระเรียน 1 คู่ ที่จังหวัดสระบุรี และพบนก 4-6 ตัว ที่จังหวัดพิษณุโลก ต่อมาในปี พ.ศ. 2507 พบนกกระเรียน 4 ตัวที่วัดไผ่ล้อม จังหวัดนครปฐม โดยนกจำนวน 1 ใน 4 ตัวนี้ถูกยิงตาย และในปี พ.ศ. 2511 เป็นครั้งสุดท้ายที่มีคนพบเห็นลูกนกกระเรียน 2 ตัว ในธรรมชาติบริเวณเขตชายแดนไทยกัมพูชาของจังหวัดสุรินทร์ ซึ่งลูกนกกระเรียน 1 ตัวได้ถูกนำไปเลี้ยง โดยคุณถวัลย์ บุญสิทธิ์ เจ้าหน้าที่ป่าไม้ของสวนรุกขชาติช่อแฮ จังหวัดแพร่ และนกตัวนั้นได้ตายลงในวันที่ 27 ตุลาคม พ.ศ. 2527 และหลังจากนั้นก็ไม่เคยมีรายงานพบนกกระเรียนพันธุ์ไทยในธรรมชาติของประเทศไทย (Purchkoon et al., 2015; กรมป่าไม้ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2527; บุปผา อ่างเกิด และ ศิริพร ทองอารีย์, 2527; ททัยทิพย์ ศีกษะชาติ ทรงกลด ภู่ทอง และ พันสธรรมกীরติวงศ์, 2555)



ภาพที่ 8 หลักฐานภาพถ่ายการพบนกกระเรียนเป็นสัตว์คู่กับชาวบุรีรัมย์มาก่อน  
ภาพจากหนังสือเจ้าจะกลับมา นกกระเรียนพันธุ์ไทย

### 2.3.4 สถานภาพทางการอนุรักษ์และการอนุรักษ์นกกกระเรียนพันธุ์ไทยในประเทศไทย

ปัจจุบันนกกกระเรียนพันธุ์ไทยถูกจัดให้เป็น 1 ใน 15 ชนิดสัตว์ป่าสงวนของประเทศไทย ตามพระราชบัญญัติสงวนและคุ้มครองสัตว์ป่า พ.ศ. 2535 ซึ่งครั้งหนึ่งได้เคยถูกจัดให้อยู่ในสถานะสูญพันธุ์แล้วในธรรมชาติของประเทศไทย (extinct in the wild: EW) แต่เนื่องจากการเพาะเลี้ยงและขยายพันธุ์นกกกระเรียนพันธุ์ไทยในประเทศนั้นประสบความสำเร็จอย่างยิ่ง จนสามารถนำนกที่ได้เพาะเลี้ยงไปปล่อยยังพื้นที่ชุ่มน้ำในธรรมชาติ ซึ่งนกสามารถอยู่รอดในพื้นที่เหล่านั้นได้ อีกทั้งยังมีการให้กำเนิดลูกนกในธรรมชาติได้อีกด้วย จึงทำให้สำนักงานนโยบายและแผนทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม (2556) ได้ยกระดับสถานะทางการอนุรักษ์ของนกกกระเรียนเป็นเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ในขั้นวิกฤต (critically endangered: CR)

การเริ่มต้นอนุรักษ์นกกกระเรียนพันธุ์ไทยในประเทศไทยนั้นเริ่มจากการเพาะเลี้ยงและขยายพันธุ์นกกภายในกรงเลี้ยง ซึ่งได้รับพ่อแม่พันธุ์ตั้งต้นจากประเทศกัมพูชามาจำนวนหนึ่งไปยัง 3 แหล่งพื้นที่เพาะเลี้ยงและขยายพันธุ์ในประเทศไทย ได้แก่ สวนสัตว์นครราชสีมาซึ่งเป็นแหล่งเพาะเลี้ยงนกกกระเรียนพันธุ์ไทยที่ใหญ่ที่สุดในโลกและเป็นแหล่งเพาะเลี้ยงนกกกระเรียนแห่งแรกของประเทศไทย โดยในปี พ.ศ. 2533–2540 สวนสัตว์ได้รับบริจาคคนมาจากประชาชนในเขตพื้นที่ชายแดนไทย–กัมพูชา จำนวน 27 ตัว (Purchkoon et al., 2015) ส่วนสวนสัตว์เปิดเขาเขียวได้รับมอบลูกนกกกระเรียนมาจำนวน 15 ตัว (เพศผู้จำนวน 5 ตัว เพศเมียจำนวน 9 ตัว และไม่ทราบเพศจำนวน 1 ตัว) และสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ ได้รับมอบลูกนกกกระเรียนจำนวน 17 ตัว (เพศผู้จำนวน 8 และเพศเมียจำนวน 9) ความพยายามในการเพาะเลี้ยงและขยายพันธุ์นั้นใช้เวลาไปมากกว่า 7 ปี กว่าพ่อแม่พันธุ์จะให้กำเนิดลูกนกกกระเรียนพันธุ์ไทยในกรงเลี้ยงได้ จนในปี พ.ศ. 2540 พ่อแม่พันธุ์นกกกระเรียน 1 คู่จากสวนสัตว์นครราชสีมาได้ให้กำเนิดลูกนก 2 ตัวแรกได้สำเร็จ หลังจากนั้นการเพิ่มประชากรของนกกกระเรียนในกรงเลี้ยงก็เป็นไปอย่างต่อเนื่อง จนมีประชากรมากพอที่จะนำไปปล่อยสู่พื้นที่ชุ่มน้ำในธรรมชาติได้ หลักการเลือกพื้นที่ในการปล่อยนกกกระเรียนได้อ้างอิงจากพื้นที่การกระจายตัวในอดีต ประกอบกับการพิจารณาข้อกำหนดและตัวชี้วัดพื้นที่ชุ่มน้ำที่เหมาะสม (ภูวดล โกมณเทียร, 2555) รวมถึงความพร้อมของสภาพภูมิประเทศ ความพร้อมของเจ้าหน้าที่และหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง และความร่วมมือของชุมชนและองค์กรท้องถิ่นโดยรอบพื้นที่การปล่อย ผลการพิจารณาสรุปว่าพื้นที่ที่เหมาะสมต่อการนำร่องในการปล่อยนกกกระเรียนคือ บริเวณของเขตห้ามล่าสัตว์ป่าอ่างเก็บน้ำห้วยจรเข้มาก เขตห้ามล่าสัตว์ป่าอ่างเก็บน้ำห้วยตลาด และเขตห้ามล่าสัตว์ป่าอ่างเก็บน้ำสนามบิน จังหวัดบุรีรัมย์ (นุชจรี พิษคุณ, 2556) ในช่วงตั้งแต่ปี พ.ศ. 2554 เป็นต้นมา ได้เริ่มโครงการปล่อยนกกกระเรียนพันธุ์ไทยจากการเพาะเลี้ยงคืนสู่พื้นที่ชุ่มน้ำในธรรมชาติของประเทศไทย โดยได้ปล่อยนกกกระเรียนจำนวน 60 ตัว ที่ได้เพาะเลี้ยงจากสวนสัตว์นครราชสีมาสู่พื้นที่ของเขตห้ามล่าสัตว์ป่าอ่างเก็บน้ำห้วยจรเข้มากและเขตห้ามล่าสัตว์ป่าอ่างเก็บน้ำสนามบิน หลังจากการปล่อย

ประชากรได้มีการติดตามผลอย่างต่อเนื่อง และพบว่านกกระเรียนกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ สามารถอยู่รอดในธรรมชาติของทั้ง 2 พื้นที่ดังกล่าวได้ (Purchkoon et al., 2015) และนอกจากนี้ในช่วงปลายปี พ.ศ. 2559 พบนกกระเรียนคู่หนึ่งได้ให้กำเนิดลูกนกกระเรียน 2 ตัวได้สำเร็จจากการวางไข่และฟักในธรรมชาติบริเวณแปลงนาข้าวของเกษตรกร ทางองค์การสวนสัตว์ฯ ได้ตั้งชื่อให้ลูกนกทั้งสองตัวว่า “นาข้าว” และ “มะพร้าว” (ข่าวไทยพีบีเอส, 2560) (ภาพที่ 9)



ภาพที่ 9 ลักษณะรังและการวางไข่ของนกกระเรียนพันธุ์ไทยในธรรมชาติและลูกนก 2 ตัวแรกที่เกิดในธรรมชาติของประเทศไทย ภาพจาก <https://www.facebook.com/cranethailand/>

## 2.4 การศึกษาและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับนกกระเรียนพันธุ์ไทย

### 2.4.1 ด้านนิเวศวิทยา

ปัจจุบันการลดจำนวนประชากรของนกกระเรียนพันธุ์ไทยเป็นเหตุการณ์ที่เกิดขึ้นในหลายพื้นที่ที่มีการกระจายตัวของนกชนิดนี้ ดังนั้นประเทศต่าง ๆ ที่มีประชากรนกกระเรียนพันธุ์ไทยอาศัยอยู่ จึงได้มีการกำหนดขอบเขตพื้นที่การอนุรักษ์ขึ้น โดยพื้นที่เหล่านั้นจะต้องได้รับการรบกวนจากมนุษย์น้อยที่สุด เพื่อให้นกได้มีพื้นที่อาศัยและมีแหล่งอาหารอย่างเพียงพอ ยกตัวอย่างเช่น ในประเทศกัมพูชาได้มีการกำหนดพื้นที่อนุรักษ์นกกระเรียนซึ่งเรียกว่า Sarus Crane Conservation Areas หรือ SCCAs ขึ้น ซึ่งเป็นพื้นที่ที่นกสามารถใช้ในการหาอาหารระหว่างเดือนพฤศจิกายนถึงเดือนมิถุนายน (non-breeding season) ได้ พื้นที่ดังกล่าวได้แก่ Ang Trapeang Thmor, Boeung Prek Lapouv และ Anlung Pring ในการศึกษาของ Yav et al. (2015) ได้เลือกใช้พื้นที่ของ Anlung Pring ในจังหวัด Kumpot ทางภาคใต้ของประเทศกัมพูชาซึ่งเป็นเขตติดต่อกับประเทศเวียดนามในบริเวณของที่ราบลุ่มแม่น้ำโขง โดยจุดประสงค์ของการศึกษาคือเพื่อสำรวจจำนวนนกที่เข้าใช้พื้นที่เพื่อหาอาหาร รวมถึงประเภทของอาหารที่นกเลือกกิน ผู้วิจัยได้แบ่งพื้นที่การวิเคราะห์ออกเป็น 6 พื้นที่

จากขนาดพื้นที่ 217 เฮกตาร์ โดยใช้ขอบเขตของธรรมชาติเป็นตัวกั้น เช่น การมีหนองน้ำ หรือ การมีพุ่มไม้ ซึ่งแต่ละพื้นที่มีขนาดที่แตกต่างกันออกไป คือ มีขนาด 32.83, 38.51, 22.67, 31.71, 44.32 และ 46.73 เฮกตาร์ ตามลำดับ จากการสำรวจพบว่าโดยเฉลี่ยแล้วมีนกเข้ามาใช้พื้นที่จำนวน 255 ตัวต่อพื้นที่ และนกชอบที่จะกินพืชที่มีหัวเป็นส่วนใหญ่ เช่น *Eleocharis* spp. ซึ่งจากผลการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าจำนวนของนกที่เข้ามาใช้พื้นที่มีความสัมพันธ์กับปริมาณของ *E. dulcis* และ *E. spiralis* (Yav et al., 2015)

#### 2.4.2 ด้านพฤติกรรม

การศึกษาพฤติกรรมของนกกระเรียนพันธุ์ไทยในประเทศไทยที่ผ่านมา ได้มีการศึกษาจากประชากรเพียงแค่บริเวณกรงเลี้ยงเท่านั้น โดยเป็นการสังเกตพฤติกรรมนกทั้งเพศผู้และเพศเมียในช่วงฤดูผสมพันธุ์ และ นอกฤดูผสมพันธุ์ ว่ามีความสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน และฮอร์โมนเอสตราไดโอดอย่างไร จากผลการศึกษาพบว่า ในนกกระเรียนเพศผู้การเพิ่มขึ้นของฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนและ/หรือฮอร์โมนเอสตราไดโอดในช่วงฤดูผสมพันธุ์มีความสัมพันธ์ต่อการแสดงพฤติกรรมเกี่ยวพาราซี แต่ไม่มีความสัมพันธ์กับการแสดงออกของพฤติกรรมร้องเตือนภัยและระวังภัย ส่วนในนกกระเรียนเพศเมียนั้นฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนและ/หรือฮอร์โมนเอสตราไดโอดที่เพิ่มมากขึ้นในฤดูผสมพันธุ์มีความสัมพันธ์กับการแสดงพฤติกรรมเกี่ยวพาราซีเช่นเดียวกับเพศผู้ และยังมีความสัมพันธ์กับการแสดงพฤติกรรมร้องเตือนภัยอีกด้วย แต่ฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนไม่มีความสัมพันธ์กับการแสดงพฤติกรรมระวังภัย (หทัยทิพย์ ศึกษะชาติ ทรงกลด ภูทอง และ พันัส ธรรมกীরติวงศ์, 2555)

#### 2.4.3 ด้านความหลากหลายทางพันธุกรรม

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกกระเรียนพันธุ์ไทยในปัจจุบันยังถือว่าการศึกษายูน้อย ที่ผ่านมามีเพียงการศึกษาของ Insee (2013) ที่ใช้เครื่องหมายไมโทคอนเดรียล ดีเอ็นเอ 3 ตำแหน่ง (2,670 bps) ได้แก่ cytochrome *b* gene, NADH dehydrogenase 6 (*ND6*) และ control region เป็น DNA marker ในการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกกระเรียนพันธุ์ไทยรุ่นพ่อแม่พันธุ์ตั้งต้นจำนวน 51 ตัว ซึ่งเป็นตัวอย่างจากสวนสัตว์นครราชสีมา สวนสัตว์เปิดเขาเขียว และสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ จากผลการวิจัยพบว่าตำแหน่งไมโทคอนเดรียลที่มีการแปรผันทางพันธุกรรมมากที่สุดคือบริเวณของ control region โดยพบจำนวนแฮพโลไทป์มากที่สุดเท่ากับ 46 แฮพโลไทป์ ซึ่งมี 16 แฮพโลไทป์ที่สามารถใช้ถ่ายทอดไปสู่รุ่นลูกต่อไปได้เนื่องจากเป็นแฮพโลไทป์ของนกเพศเมีย แต่ในปัจจุบันมีเพียง 7 maternal lines เท่านั้นที่ถูกใช้ในการเพิ่มปริมาณประชากรรุ่นลูก แบ่งเป็น 5 maternal lines ถูกใช้ในสวนสัตว์นครราชสีมา

และอีก 2 maternal lines ถูกใช้เพิ่มปริมาณประชากรในสวนสัตว์เปิดเขาเขียวและสถานีวิจัย เพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ (Insee, 2013) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาของ Tanee et al. (2009) ที่ใช้เครื่องหมายนิวเคลียร์ดีเอ็นเอคือ เครื่องหมาย ISSR มาวิเคราะห์ค่าความหลากหลายทางพันธุกรรม ของนกกระเรียนพันธุ์ไทยจำนวน 27 ตัวอย่าง จากสวนสัตว์นครราชสีมา โดยผลการศึกษาพบว่าค่า Shannon's diversity index (H') ที่บ่งบอกความหลากหลายทางพันธุกรรมแสดงผลเท่ากับ 0.501 ซึ่งแสดงว่ากลุ่มประชากรนกที่ศึกษามีค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมค่อนข้างสูง แต่มีค่าความ สม่าเสมอทางพันธุกรรม (genetic evenness: E) ต่ำ โดยค่า E มีค่าเท่ากับ 0.152 (Tanee et al., 2009) แต่อย่างไรก็ตามเครื่องหมาย ISSR นั้นเป็นเครื่องหมายทางพันธุกรรมแบบ dominant marker กล่าวคือ ไม่สามารถแยกความแตกต่างของอัลลีลแบบ homozygous และ heterozygous ได้ (Ng and Tan, 2015) ดังนั้นจึงทำให้ไม่สามารถใช้วิเคราะห์ค่า heterozygosity ที่บ่งบอกความ หลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรโดยวิเคราะห์สัดส่วนของอัลลีลแบบ heterozygous ได้ หาก ประชากรที่ใช้ศึกษาแสดงค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง (heterozygosity > 0.5) จะสามารถ คาดการณ์ได้ว่าประชากรเหล่านั้นน่าจะมีโอกาสที่จะสามารถอยู่รอดต่อไปในธรรมชาติที่มีการ เปลี่ยนแปลงได้

## 2.5 พื้นที่ทำการศึกษา

### 2.5.1 สวนสัตว์เปิดเขาเขียว ตำบลบางพระ อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี

นกกระเรียนพันธุ์ไทยที่ได้รับมาเพาะเลี้ยงภายในสวนสัตว์เปิดเขาเขียวได้รับมาจากการส่งมอบลูกนกกระเรียนซึ่งได้มาจากธรรมชาติของประเทศกัมพูชาโดยพ่อค้าชาวกัมพูชา ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2538–2542 โดยได้รับตัวอย่างลูกนกมาทั้งสิ้น 15 ตัว ระหว่างการเลี้ยงดูเพื่อให้นกเจริญเติบโตนั้นมี นกบางตัวไม่สามารถรอดชีวิตได้ จนในที่สุดมีกลุ่มตัวอย่างที่สามารถอยู่รอดเพื่อใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ตั้ง ต้นได้จำนวน 9 ตัว (เพศผู้จำนวน 4 ตัว และเพศเมียจำนวน 5 ตัว) โดยมีพ่อแม่พันธุ์จำนวน 1 คู่ สามารถให้กำเนิดลูกนกกระเรียนได้กว่า 30 ตัว ซึ่งลูกนกเหล่านี้บางส่วนจะถูกส่งไปสวนสัตว์ นครราชสีมาเพื่อเลี้ยงดูต่อไป (Taxon report *Grus antigone sharpii* from KKOZ)

### 2.5.2 สถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ ตำบลบางพระ อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี

ในปี พ.ศ. 2527 สถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระได้รับความร่วมมือจาก ICF ในเรื่อง โครงการการวางแผนเลี้ยงดูลูกนกกระเรียนเพื่อจะปล่อยคืนสู่ธรรมชาติ โดย Dr. George Archibald มีจดหมายติดต่อโครงการนี้มาถึงรองอธิบดี ไพโรจน์ สุวรรณกร ซึ่งขณะนั้นดำรงตำแหน่งเป็น ผู้อำนวยการกองอนุรักษ์สัตว์ป่า ทางกองอนุรักษ์สัตว์ป่าได้ตอบรับโครงการดังกล่าวและส่งเจ้าหน้าที่ ไปศึกษาดูงานวิจัยและฝึกอบรมเกี่ยวกับการเลี้ยงดูนกกระเรียนที่ ICF และ Vogelpark Walsrode



จากนั้น Dr. George Archibald ได้มีหนังสือกราบบังคมทูลสมเด็จพระนางเจ้าฯ พระบรมราชินีนาถ เพื่อทูลเกล้าฯ ถวายนภกระเรียนจำนวน 3 คู่ แต่สมเด็จพระนางเจ้าฯ พระบรมราชินีนาถ ซึ่งในวันพุธที่ 14 พฤศจิกายน พ.ศ. 2527 เวลา 15:00 น. สมเด็จพระนางเจ้าฯ พระบรมราชินีนาถได้โปรดเกล้าฯ ให้พระเจ้าวรวงศ์เธอ พระองค์เจ้าโสมสวลี พระวรราชทินนิตมาตุ เสด็จพระราชดำเนินแทนพระองค์ ในการที่ ICF ถวายนภกระเรียน ณ เขตห้ามล่าสัตว์ป่าอ่างเก็บน้ำบางพระ จังหวัดชลบุรี (กรมป่าไม้ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2527) ต่อมาพบว่านภกระเรียนทั้ง 3 คู่ ที่ทาง ICF ได้มอบให้ นั้นเป็นนภกระเรียนสายพันธุ์ออสเตรเลีย ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับนภกระเรียนพันธุ์ไทย เขตห้ามล่าสัตว์ป่าอ่างเก็บน้ำบางพระจึงได้ส่งนภกระเรียนกลับคืนให้ ICF ดังเดิม ต่อมาสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระได้รับตัวอย่างลูกนภกระเรียนพันธุ์ไทยจำนวน 17 ตัว โดยเป็นตัวอย่างที่ได้จากธรรมชาติของประเทศกัมพูชาจากพ่อค้าชาวกัมพูชา โดยลูกนกทั้ง 17 ตัวถูกเลี้ยงดูจนสามารถเป็นพ่อแม่พันธุ์ตั้งต้นของสถานีเพาะเลี้ยงแห่งนี้ได้ (สถานีเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ จังหวัดชลบุรี, 2559)

## 2.6 เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์

เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์เป็น nuclear DNA marker ที่จะออกแบบมาให้จำเพาะกับตำแหน่งไมโครแซทเทลไลท์ในจีโนมของสิ่งมีชีวิต โดยไมโครแซทเทลไลท์เป็นตำแหน่งของดีเอ็นเอสายสั้น ๆ ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้ำกันตั้งแต่ 2-6 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งกระจายตัวอยู่ทั่วไปในนิวเคลียร์จีโนม บริเวณ non-coding region ของสิ่งมีชีวิตแบบยูคาริโอต (Wan et al., 2004) เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์มักถูกนำมาใช้เป็น DNA marker ในการหาความหลากหลายทางพันธุกรรมในการศึกษาพันธุศาสตร์ประชากร เนื่องจากในแต่ละ individual จะมีความแตกต่างของจำนวนและชุดการซ้ำกันในตำแหน่งไมโครแซทเทลไลท์ ซึ่งทำให้สามารถแสดงความหลากหลายทางพันธุกรรม (polymorphism) ภายในประชากรได้ อีกทั้งยังเป็น marker ที่นำไปใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ง่ายด้วยเทคนิค PCR (Oliveira et al., 2006) ดังนั้นจึงทำให้เครื่องหมายทางพันธุกรรมชนิดนี้เป็นที่นิยมในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากร

นอกจากนี้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ยังมีคุณสมบัติเป็น co-dominant marker กล่าวคือ สามารถแยกความแตกต่างระหว่างอัลลีลแบบ homozygous และอัลลีลแบบ heterozygous ได้ (Selkoe and Toonen, 2006; Wan et al., 2004) ซึ่งการปรากฏของอัลลีลแบบ heterozygous ภายในประชากรนั้นสามารถนำไปใช้วิเคราะห์หาค่า heterozygosity หรือค่าที่บอกการมีส่วนของอัลลีลแบบ heterozygous ในประชากรว่ามีเท่าใด การมีค่า heterozygosity สูง (heterozygosity > 0.5) จะสามารถบ่งบอกระดับของความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากรนั้น ๆ ได้

## 2.7 การคัดกรองเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์

เนื่องจากการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกกระเรียนพันธุ์ไทยในประเทศไทยด้วยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ยังไม่เคยมีการศึกษามาก่อน จึงทำให้ในขั้นแรกจำเป็นต้องมีการคัดกรองเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ที่เหมาะสม และเพื่อความสะดวกรวดเร็วในการศึกษาเราสามารถเลือกใช้ไพรเมอร์จากสิ่งมีชีวิตที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดทางวิวัฒนาการและมีการศึกษามาก่อนหน้า โดยเรียกวิธีนี้ว่า cross-species amplification (Primmer et al., 2005) ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ได้เลือกใช้ ไพรเมอร์จาก whooping crane เนื่องจากเป็นไพรเมอร์ที่นิยมใช้เพิ่มปริมาณไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอด้วยวิธี cross-species amplification กับนกกระเรียนชนิดอื่น ๆ อย่างแพร่หลาย เช่น การศึกษาในการหาความหลากหลายทางพันธุกรรมใน sandhill crane ซึ่งเป็นนกกระเรียนชนิดที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับนกกระเรียนพันธุ์ไทยมากที่สุด (Hayes et al., 2006; Henkel et al., 2012; Jones et al., 2002; Jones et al., 2010a; Jones, Krapu, et al., 2005) รวมถึงมีการศึกษาใน Siberian crane, blue crane, grey crowned crane และ wattled crane อีกด้วย (Mearns et al., 2009; Mudrik et al., 2014) นอกจากการศึกษาครั้งนี้ได้เลือกใช้ไพรเมอร์จาก whooping crane แล้วนั้นยังได้เลือกใช้ไพรเมอร์จาก blue crane ด้วย ถึงแม้ว่านกกระเรียนชนิดนี้จะถูกจัดอยู่ในสกุลที่แตกต่างกับนกกระเรียนพันธุ์ไทย (สกุล *Grus*) แต่อย่างไรก็ตามยังคงมีการศึกษาที่นำไพรเมอร์จาก blue crane ไปคัดกรองเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์กับนกในสกุล *Grus* ได้ นั่นคือการศึกษาใน red-crowned crane โดยผลการศึกษายังให้ผลที่น่าสนใจคือ ไพรเมอร์จาก blue crane สามารถนำไปเพิ่มปริมาณไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอใน red-crowned crane ได้ และยังแสดงความเป็น polymorphism เพื่อนำไปใช้เป็นเครื่องหมายในการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมได้อีกด้วย (Zou et al., 2010)

### บทที่ 3

#### วิธีดำเนินงานวิจัย

##### 3.1 สถานที่ทำการศึกษาและการเก็บตัวอย่าง

ในการศึกษาครั้งนี้ไม่ได้เก็บตัวอย่างชนนกระเรียนพันธุ์ไทยใหม่แต่ใช้ตัวอย่างเดิมที่ได้เก็บโดย นางสาวรังสิณี สันคม และคณะ ในปี พ.ศ. 2557-2558 (รังสิณี สันคม, 2557) โดยเก็บชนนมาจาก 2 พื้นที่การศึกษา จำนวนทั้งหมด 28 ตัวอย่าง ได้แก่

1. สวนสัตว์เปิดเขาเขียว ตำบลบางพระ อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี จำนวน 11 ตัวอย่าง แบ่งเป็น รุ่นพ่อแม่พันธุ์ตั้งต้น 9 ตัว และ รุ่นลูก 2 ตัว (เพศเมียจำนวน 6 ตัว และ เพศผู้จำนวน 5 ตัว) โดยชนนในรุ่น founder เก็บเมื่อวันที่ 27 กันยายน พ.ศ. 2557 และชนนในรุ่นลูกเก็บเมื่อวันที่ 6 เมษายน พ.ศ. 2558

2. สถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ ตำบลบางพระ อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี จำนวน 17 ตัวอย่าง แบ่งเป็นรุ่นพ่อแม่พันธุ์ตั้งต้น 17 ตัว (เพศเมียจำนวน 9 ตัว และ เพศผู้จำนวน 8 ตัว) เก็บเมื่อวันที่ 29 พฤศจิกายน พ.ศ. 2557

โดยการเก็บชนนทั้ง 11 ตัวอย่างจากสวนสัตว์เปิดเขาเขียวได้เก็บชนนจากส่วนใดก็ได้ของร่างกายที่หลุดร่วงบนพื้นดินแล้ว เนื่องจากสถานที่ศึกษาแห่งนี้เลี้ยงนกให้อาศัยอยู่ 1 ตัวต่อ 1 กรง (ภาพที่ 10) จึงไม่มีปัญหาในการระบุตัวอย่าง แต่ที่สถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระเลี้ยงนกระเรียนให้อาศัยอยู่ 2 ตัวต่อ 1 กรง (ภาพที่ 11) จำนวน 4 กรง หากเก็บชนที่ร่วงบนพื้นดินจะเป็นปัญหาอย่างยิ่งต่อการระบุตัวอย่าง จึงจำเป็นต้องเก็บตัวอย่างโดยตรงจากตัวนก โดยการดึงขนปลายปีกหรือขนกลางปีก ดังนั้นสถานที่ศึกษาแห่งนี้ได้เก็บตัวอย่างชนโดยดึงจากปีกนกระเรียนพันธุ์ไทยโดยตรงจำนวน 8 ตัวอย่าง และเก็บชนจากส่วนใดก็ได้ของร่างกายที่หลุดร่วงบนพื้นดินแล้วจำนวน 9 ตัวอย่าง (ภาพที่ 12) การดึงขนนโดยตรงนั้นสามารถทำได้โดยให้เจ้าหน้าที่ประจำสถานีจับตัวนกออกมาจากกรงเลี้ยงแล้วนำผ้าสีดาคคลุมบริเวณใบหน้าทั้งหมดเพื่อลดความเครียดของสัตว์ จากนั้นดึงขนบริเวณปีกทั้งปีกซ้ายและปีกขวาเพื่อความสมดุลของปีกทั้งสองข้าง รวมเป็นจำนวน 2-4 เส้นขนเมื่อดึงขนเสร็จแล้วเจ้าหน้าที่จะนำนกระเรียนกลับเข้ากรงเลี้ยงดังเดิม (ภาพที่ 13) หลังจากนั้นจะคอยสังเกตอาการของนกว่ามีอาการผิดปกติหรือไม่ ทุก ๆ 30 นาที เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำตัวอย่างชนนที่เก็บได้กลับมายังห้องปฏิบัติการ ใช้กรรไกรที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วตัดเฉพาะบริเวณโคนขน และเก็บโคนขนแต่ละอันใส่ถุงซิปล็อคที่ติดฉลากข้อมูล โดยถุงซิปล็อคต้องผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากเชื้อราและแบคทีเรีย จากนั้นเก็บรักษาตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิห้องในห้องปฏิบัติการ การเก็บตัวอย่างในการศึกษาครั้งนี้ได้รับอนุญาตจากคณะกรรมการควบคุมดูแลการเลี้ยงและการ

ใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ ของคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยแล้ว โดยมี Animal Use Protocol No. 1523003



ภาพที่ 10 นกกระเรียนพันธุ์ไทยในสภาพกรงเลี้ยงที่สวนสัตว์เปิดเขาเขียว โดยกรงนี้เลี้ยงนกกระเรียนจำนวน 1 ตัว ต่อ 1 กรง



ภาพที่ 11 นกกระเรียนพันธุ์ไทยในสภาพกรงเลี้ยงที่สถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ โดยกรงนี้เลี้ยงนกกระเรียนจำนวน 2 ตัว ต่อ 1 กรง คือ ตัวผู้ 1 ตัว (ภาพซ้าย) และตัวเมีย 1 ตัว (ภาพขวา)





ภาพที่ 12 ตัวอย่างขนนกระเรียนพันธุ์ไทยที่เก็บได้จากกรงเลี้ยงของสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำ  
บางพระ จ. ชลบุรี โดยเก็บจากคนที่ร่วงลงบนพื้นดินแล้ว (รังสีนี้ สันคม, 2557)  
ภาพถ่ายโดยคุณจิตรทิวัส พรประเสริฐ



ภาพที่ 13 การเก็บขนนกระเรียนพันธุ์ไทยโดยดึงจากบริเวณปีกของนกโดยตรง (รังสีนี้ สันคม,  
2557) ภาพถ่ายโดยคุณจิตรทิวัส พรประเสริฐ

### 3.2 การคัดกรองเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์

เนื่องจากการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกกกระเรียนพันธุ์ไทยในประเทศไทยยังไม่เคยมีการศึกษามาก่อน จึงทำให้ในขั้นแรกจำเป็นต้องมีการคัดกรองเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ที่เหมาะสมก่อน และเพื่อความสะดวกรวดเร็วในการศึกษาสามารถเลือกไพรเมอร์จากสิ่งมีชีวิตที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดทางวิวัฒนาการและมีการศึกษามาก่อนหน้ามาใช้ได้ โดยเรียกวิธีนี้ว่า cross-species amplification ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ได้เลือกใช้ไพรเมอร์จาก whooping crane จำนวน 14 คู่ (Gram6, Gram8, Gram11, Gram17, Gram20, Gram22, Gram24, Gram25, Gram30, Gram31, Gram32a, Gram41, Gram42 และ Gram45) (Jones et al., 2010a, 2010b) และจาก blue crane จำนวน 14 คู่ (Gpa01, Gpa11, Gpa12, Gpa14, Gpa24, Gpa32, Gpa33, Gpa34, Gpa35, Gpa36, Gpa37, Gpa38, Gpa39 และ Gpa41) (Meares et al., 2008; Zou et al., 2010) โดยไพรเมอร์ที่จะนำไปใช้วิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกกกระเรียนพันธุ์ไทยในขั้นต่อไปนั้นต้องแสดงลักษณะ polymorphism กล่าวคือไพรเมอร์นั้น ๆ จะต้องแสดงขนาดอัลลีลของทุกตัวอย่างมากกว่า 1 ขนาดขึ้นไป โดยสามารถสังเกตได้คร่าว ๆ จากภาพเจล ซึ่งการคัดกรองเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์มีวิธีการดังต่อไปนี้

#### 3.2.1. การสกัดดีเอ็นเอ และการเพิ่มปริมาณไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction: PCR)

สารละลายดีเอ็นเอ (total DNA) ได้จากการสกัดดีเอ็นเอจากโคนขนของนกกกระเรียนพันธุ์ไทย โดยใช้ชุดสารเคมีสำเร็จรูปสำหรับสกัดดีเอ็นเอ คือ FavorPrep™ Tissue Genomic DNA Extraction Mini Kit (Favorgen Biotech corp., Taiwan) โดยสกัดตามคู่มือการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเนื้อเยื่อ (ภาคผนวก ข.) จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้ไปเพิ่มปริมาณไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิค PCR ด้วยวิธี cross-species amplification โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 28 คู่ ดังที่ได้กล่าวไปแล้วข้างต้น (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์และอุณหภูมิที่ใช้ในขั้นตอน annealing ( $T_A$ ) ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้

โลตัส	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ (5' → 3')	$T_A$ (°C)
Gram 6	F: CAGTCGGGCGTCATCATGGCAGTTTAAGCACTTCAC R: GGCTGTTATTTCCACAAAGATG	60
Gram 8	F: CAGTCGGGCGTCATCATCTGCTGGTTCCTGGTTCTC R: GGCTCCTACTACCATCCCAC	60
Gram 11	F: CAGTCGGGCGTCATCATTGGTCTACTGAAGTCTCTGGC R: GCAGGGTTGTTAGTCACAGTTC	60
Gram 17	F: CAGTCGGGCGTCATCACAGGCCAAGAACTGTAGC R: ATTTCAACCGCGACAACAC	TD58
Gram 20	F: CAGTCGGGCGTCATCAGGAGACATTTGTCCTAGATTTGC R: CCCTGGGTGCTTTGACTTAC	60
Gram 22	F: CAGTCGGGCGTCATCACCATTGGCACAATCCCTC R: AACCTATTTGCTGTTCTTACTC	60
Gram 24	F: CAGTCGGGCGTCATCACCATTGGCACAATCCCTC R: AACCTATTTGCTGTTCTTACTC	60
Gram 25	F: CAGTCGGGCGTCATCAGCAAAGAGGAGGGAAGAATG R: TGAACATAGCAAGATCGTGGAG	TD58
Gram 30	F: CAGTCGGGCGTCATCATGTAAAGCTCCTTGGGCTG R: ATGAAGGGTGACAACGTAAAC	60
Gram 31	F: CAGTCGGGCGTCATCAACACCAACATACTTGTCTCACC R: CATGAACAGCCATACACATAAAG	TD58
Gram 32a	F: CAGTCGGGCGTCATCACAAATGTGCTGTTCACTTTC R: CCTCATGAGCCTAAGGATTGAG	TD58
Gram 41	F: CAGTCGGGCGTCATCATTGGGCTTGATTCTGAGAGC R: GGATTTGTTTACTTTACCCAGGAAG	60

## ตารางที่ 1 (ต่อ)

โลดัส	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ (5' → 3')	T <sub>A</sub> (°C)
Gram 42	F: CAGTCGGGCGTCATCAGCATAAGGCATTTGAGCAC R: AAGTGTTGGTTCTCATCCCG	TD58
Gram 45	F: CAGTCGGGCGTCATCAGTATCCTTGCCAGAGACATGC R: CCAGTAAAGCACCACACGAG	60
Gpa01	F: TTTGGTTGCCGTCAGAATTG R: CTGACCTGGGTGTGTTCTGC	63
Gpa11	F: CCCTCCTGGAATACATGACAAA R: AAGTCATTCTCAACAAGAAAGGAAAA	60
Gpa12	F: GATCAATGCGAAGGATAGGGAGGT R: TCATCAATCTATTATTTGCCTCAGC	60
Gpa14	F: TTTGTAATCTGGTCATTGGATTT R: AATAGGACAGCAGTGCTAAGAAGAAA	57
Gpa24	F: GAGGGAATCTAGCACGCTCCAA R: TCAAAGCATCGTGTCCATGAAGT	57
Gpa32	F: CCCAGCACACCGTGCATAAG R: GCAGTCGGTCACATCCTTGG	57
Gpa 33	F: GGCTTAGAAATGGGATACAGTTG R: CCGTCCAAGCAAGAAGAAA	56
Gpa 34	F: GCACACAGTGAGGAGACCAGTGA R: CCTTGATGTGGGAAGACAACCTGC	60
Gpa 35	F: TCATCAGCTTCCAACAGGTCTCC R: TCAGGCACAATGTATAAGTGTGTTGTTG	56
Gpa36	F: TTCATAGACATATGCTTACCTGTTCT R: ATCCATCCATCTATCTATCTATCTATCTATC	60
Gpa37	F: TGAACGTGTCTGATTTAAGGAA R: AAAGTAGTCACTAGCCTGGGTTT	60



ตารางที่ 1 (ต่อ)

โลคัส	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ (5' → 3')	T <sub>A</sub> (°C)
Gpa38	F: GGGCAGAAGCAAGTCTTTCA R: GAAGATGTTTGCTGGTGCAC	60
Gpa39	F: TGCACAGGTTTGGCCAAGAAG R: TTCCAAAGTGAAATTAAGGTGTGTGG	57
Gpa41	F: AATTCAGTCTAATGTAAATGTCCAAG R: CCATCATTAAATGGAAAGAAAGAG	54

หมายเหตุ: F คือ forward primer และ R คือ reverse primer

3.2.1.1 วิธีการเตรียม PCR mixture

เตรียมส่วนผสมของสารที่ใช้ทำ PCR ลงในหลอด microcentrifuge tube ขนาด 0.2 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว โดยใช้ปริมาตรสารละลายในแต่ละหลอด ดังนี้

Total DNA template	2.50	µl
10 µM forward primer	1.25	µl
10 µM reverse primer	1.25	µl
MilliQ	7.50	µl
2X EmeraldAmp MAX PCR Master Mix	<u>12.50</u>	µl
Total volume	<u>25.00</u>	µl

3.2.1.2 วิธีการสังเคราะห์ไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอเป้าหมาย

สังเคราะห์ดีเอ็นเอเป้าหมายโดยตั้งโปรแกรมของเครื่อง thermal cycle ให้มีสภาวะพีซีอาร์ที่แตกต่างกัน 7 รูปแบบ ดังนี้

1. สภาวะพีซีอาร์ของไพรเมอร์ Gram6, Gram8, Gram11, Gram20, Gram22, Gram24, Gram30, Gram41 และ Gram45

ขั้นตอนที่ 1 Initial denaturation	ที่อุณหภูมิ	95°C	5 นาที
ขั้นตอนที่ 2 (มี 3 ขั้นตอนย่อย)			
Denaturation	ที่อุณหภูมิ	95°C	30 วินาที
<b>Annealing</b>	<b>ที่อุณหภูมิ</b>	<b>60°C</b>	<b>1 นาที</b>
Extension	ที่อุณหภูมิ	72°C	40 วินาที
ขั้นตอนที่ 3 Final extension	ที่อุณหภูมิ	72°C	10 นาที

ตั้งโปรแกรมเครื่อง thermal cycle ให้ทำซ้ำในขั้นตอนที่ 2 ตามลำดับขั้นตอนย่อยดังกล่าว รวมทั้งสิ้น 40 รอบ

2. สภาวะพีซีอาร์ของไพรเมอร์ Gram17, Gram25, Gram31, Gram32a และ Gram42

ขั้นตอนที่ 1 Initial denaturation	ที่อุณหภูมิ	95°C	5 นาที
ขั้นตอนที่ 2 (มี 3 ขั้นตอนย่อย)			
Denaturation	ที่อุณหภูมิ	95°C	30 วินาที
<b>Annealing</b>	<b>ที่อุณหภูมิ</b>	<b>TD58*</b>	<b>30 วินาที</b>
Extension	ที่อุณหภูมิ	72°C	40 วินาที
ขั้นตอนที่ 3 Final extension	ที่อุณหภูมิ	72°C	10 นาที

ตั้งโปรแกรมเครื่อง thermal cycle ให้ทำซ้ำในขั้นตอนที่ 2 ตามลำดับขั้นตอนย่อยดังกล่าว รวมทั้งสิ้น 35 รอบ

**หมายเหตุ** \* touchdown 58 (TD58) หมายถึง การตั้งโปรแกรมให้เครื่อง thermal cycle มีอุณหภูมิในขั้น annealing ตั้งแต่ 58–50°C โดยจะลดอุณหภูมิจาก 58°C ลงรอบละ 0.5°C จำนวน 18 รอบ อีก 17 รอบคงอุณหภูมิไว้ที่ 50°C

## 3. สภาวะพีซีอาร์ของไพรเมอร์ Gpa41

ขั้นตอนที่ 1 Initial denaturation	ที่อุณหภูมิ	94°C	3 นาที
ขั้นตอนที่ 2 (มี 3 ขั้นตอนย่อย)			
Denaturation	ที่อุณหภูมิ	94°C	30 วินาที
<b>Annealing</b>	<b>ที่อุณหภูมิ</b>	<b>54°C</b>	<b>30 วินาที</b>
Extension	ที่อุณหภูมิ	72°C	30 วินาที
ขั้นตอนที่ 3 Final extension	ที่อุณหภูมิ	72°C	10 นาที

ตั้งโปรแกรมเครื่อง thermal cycle ให้ทำซ้ำในขั้นตอนที่ 2 ตามลำดับขั้นตอนย่อยดังกล่าว รวมทั้งสิ้น 29 รอบ

## 4. สภาวะพีซีอาร์ของไพรเมอร์ Gpa33 และ Gpa35

ขั้นตอนที่ 1 Initial denaturation	ที่อุณหภูมิ	94°C	3 นาที
ขั้นตอนที่ 2 (มี 3 ขั้นตอนย่อย)			
Denaturation	ที่อุณหภูมิ	94°C	30 วินาที
<b>Annealing</b>	<b>ที่อุณหภูมิ</b>	<b>56°C</b>	<b>30 วินาที</b>
Extension	ที่อุณหภูมิ	72°C	30 วินาที
ขั้นตอนที่ 3 Final extension	ที่อุณหภูมิ	72°C	10 นาที

ตั้งโปรแกรมเครื่อง thermal cycle ให้ทำซ้ำในขั้นตอนที่ 2 ตามลำดับขั้นตอนย่อยดังกล่าว รวมทั้งสิ้น 29 รอบ

## 5. สภาวะพีซีอาร์ของไพรเมอร์ Gpa14, Gpa24, Gpa32 และ Gpa39

ขั้นตอนที่ 1 Initial denaturation	ที่อุณหภูมิ	94°C	3 นาที
ขั้นตอนที่ 2 (มี 3 ขั้นตอนย่อย)			
Denaturation	ที่อุณหภูมิ	94°C	30 วินาที
<b>Annealing</b>	<b>ที่อุณหภูมิ</b>	<b>57°C</b>	<b>30 วินาที</b>
Extension	ที่อุณหภูมิ	72°C	30 วินาที
ขั้นตอนที่ 3 Final extension	ที่อุณหภูมิ	72°C	10 นาที

ตั้งโปรแกรมเครื่อง thermal cycle ให้ทำซ้ำในขั้นตอนที่ 2 ตามลำดับขั้นตอนย่อยดังกล่าว รวมทั้งสิ้น 29 รอบ

#### 6. สภาวะพีซีอาร์ของไพรเมอร์ Gpa11, Gpa12, Gpa34, Gpa36, Gpa37 และ Gpa38

ขั้นตอนที่ 1 Initial denaturation	ที่อุณหภูมิ	94°C	3 นาที
ขั้นตอนที่ 2 (มี 3 ขั้นตอนย่อย)			
Denaturation	ที่อุณหภูมิ	94°C	30 วินาที
<b>Annealing</b>	<b>ที่อุณหภูมิ</b>	<b>60°C</b>	<b>30 วินาที</b>
Extension	ที่อุณหภูมิ	72°C	30 วินาที
ขั้นตอนที่ 3 Final extension	ที่อุณหภูมิ	72°C	10 นาที

ตั้งโปรแกรมเครื่อง thermal cycle ให้ทำซ้ำในขั้นตอนที่ 2 ตามลำดับขั้นตอนย่อยดังกล่าว รวมทั้งสิ้น 29 รอบ

#### 7. สภาวะพีซีอาร์ของไพรเมอร์ Gpa01

ขั้นตอนที่ 1 Initial denaturation	ที่อุณหภูมิ	94°C	3 นาที
ขั้นตอนที่ 2 (มี 3 ขั้นตอนย่อย)			
Denaturation	ที่อุณหภูมิ	94°C	30 วินาที
<b>Annealing</b>	<b>ที่อุณหภูมิ</b>	<b>63°C</b>	<b>30 วินาที</b>
Extension	ที่อุณหภูมิ	72°C	30 วินาที
ขั้นตอนที่ 3 Final extension	ที่อุณหภูมิ	72°C	10 นาที

ตั้งโปรแกรมเครื่อง thermal cycle ให้ทำซ้ำในขั้นตอนที่ 2 ตามลำดับขั้นตอนย่อยดังกล่าว รวมทั้งสิ้น 29 รอบ

### 3.2.2 การตรวจสอบขนาดของแถบไมโครแซทเทลไลท์ (microsatellite band) ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis

นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากขั้นตอนก่อนหน้ามาตรวจสอบขนาดของ microsatellite band ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 90–120 นาที โดยใช้ผง agarose NuSieve เพราะมีคุณสมบัติพิเศษกว่าผง agarose ทั่วไป กล่าวคือ สามารถแยกชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดต่ำกว่า 500 bp ได้ ซึ่งหากเตรียม 3% agarose NuSieve จะมีคุณสมบัติเทียบเท่ากับการเตรียม 8% polyacrylamide gel ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่นิยมนำมาใช้ในการตรวจสอบขนาดของไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ เหตุที่การศึกษาคั้งนี้หลีกเลี่ยงการใช้ polyacrylamide gel เป็นตัวกลางเพราะการตรวจสอบด้วยวิธีดังกล่าวมีความซับซ้อนประกอบด้วยผง polyacrylamide มีความเป็นพิษต่อร่างกาย เพราะเป็นสารตั้งต้นของการเกิดมะเร็งในมนุษย์ได้ ส่วนการย้อมเจลใช้ SYBR® Safe DNA gel stain หลังจากนั้นนำ agarose NuSieve gel ไปส่องภายใต้

แสง UV ด้วยเครื่อง UV transilluminator และเก็บบันทึกข้อมูลโดยการถ่ายภาพเจลด้วยกล้องถ่ายรูป Fujifilm X-A1

### 3.2.3 การทำ genotyping ด้วยวิธี GeneScan

แม้ว่าการตรวจสอบขนาดของ microsatellite band ด้วยวิธี agarose NuSieve gel electrophoresis จะทำให้ทราบขนาดของอัลลีลได้ แต่จะทราบเพียงแค่ว่าขนาดคร่าว ๆ เท่านั้น แต่การทำ genotyping ด้วยวิธี GeneScan เป็นวิธีที่สามารถทำให้ทราบขนาดของอัลลีลที่แน่ชัดได้ เพราะจะใช้ไพรเมอร์ที่มีการติดสีเรืองแสงติดไว้ที่ด้านใดด้านหนึ่งของไพรเมอร์เพื่อเพิ่มปริมาณไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ จากนั้นเครื่อง DNA analyzer ABI 3730XLs จะอ่านค่าขนาดอัลลีลของ PCR product ที่ได้จากการเรืองแสง ผลที่ได้จะแสดงออกมาในรูปแบบของ electropherogram ที่จะแสดง peak ของอัลลีลต่าง ๆ ว่าเป็นแบบ homozygote (1 peak) หรือ heterozygote (2 peaks) และบ่งบอกขนาดของอัลลีลที่ขนาดต่าง ๆ ซึ่งจะนำไปเป็นค่าเริ่มต้นในการวิเคราะห์ผลของค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ต่าง ๆ ต่อไปนี้

การเตรียมตัวอย่างสำหรับการทำ genotyping มีขั้นตอนและ temperature profile ในการทำ PCR เหมือนกับการเพิ่มปริมาณไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ แต่จะใช้ไพรเมอร์ที่ติดสีเรืองแสงด้วย 6-FAM แทนไพรเมอร์ธรรมดาในการทำ PCR โดยไพรเมอร์จาก whooping crane จะติดสีเรืองแสงที่ reverse primer และไพรเมอร์ที่ได้จาก blue crane จะติดสีเรืองแสงที่ forward primer จากนั้นส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์ผลที่บริษัท Macrogen ประเทศสาธารณรัฐเกาหลี โดยจะได้ข้อมูลเป็นไฟล์ .fsa กลับมา และนำข้อมูลเหล่านี้มาตรวจดูขนาดของอัลลีลด้วยโปรแกรม GeneMarker เวอร์ชัน 2.6.3. (Softgenetics)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

### 3.2.4 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ไมโครแซทเทลไลท์ (microsatellite product)

ขั้นตอนนี้ทำเพื่อยืนยันว่าบริเวณที่ได้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอขึ้นมาเป็นตำแหน่งของไมโครแซทเทลไลท์จริง และทำให้ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ซ้ำกันรวมถึงจำนวนชุดการซ้ำของลำดับนิวคลีโอไทด์แต่ละโลคัส โดยการเตรียมตัวอย่างที่ใช้สำหรับการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ มีขั้นตอนและ temperature profile ในการทำ PCR เหมือนกับการเพิ่มปริมาณไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ จากนั้นส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์ผลที่บริษัท Bioneer ประเทศสาธารณรัฐเกาหลี โดยจะได้ข้อมูลเป็นไฟล์ .abi กลับมา และนำข้อมูลเหล่านี้มาตรวจดูลำดับการซ้ำและชุดการซ้ำของนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม MEGA เวอร์ชัน 6.0 (Tamura et al., 2013)

### 3.3 การวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรม

นำข้อมูลที่ได้จากการทำ genotyping ของไพรเมอร์ที่แสดง polymorphism มาวิเคราะห์หาค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรมต่าง ๆ 5 โปรแกรม ได้แก่

#### 3.3.1 โปรแกรม Genepop เวอร์ชัน 4.3 (Raymond and Rousset, 1995; Raymond and Rousset, 2003)

ใช้วิเคราะห์ค่าต่าง ๆ ดังนี้

- ค่าจำนวนของอัลลีลต่อโลคัส ( $N_A$ )
- ค่าการเบี่ยงเบนออกจากสมดุล Hardy–Weinberg (HWE  $p$ -value) โดยประชากรจะเข้าสู่สมดุล Hardy–Weinberg ได้เมื่อได้ค่า  $p$  ที่มากกว่า 0.05
- ค่า expected heterozygosity ( $H_E$ ) เป็นค่าสมมติที่แสดงอัลลีลแบบ heterozygous เมื่อประชากรเข้าสู่สมดุล Hardy–Weinberg

สูตรการคำนวณ

$$H_E = 1 - \sum_{i=1}^n (p_i)^2$$

(Hartl and Clark, 2007)

โดย  $p_i$  คือ ความถี่ของอัลลีลแบบ homozygous

- ค่า observed heterozygosity ( $H_O$ ) เป็นค่าแสดงอัลลีลแบบ heterozygous ที่คำนวณได้จริงจากประชากรที่ศึกษา
- ค่า fixation index ( $F_{ST}$ ) เป็นค่าแสดงความแตกต่างของอัลลีลของประชากร 2 กลุ่ม โดยจะมีค่าตั้งแต่ 0 ถึง 1 หากได้ค่าที่เข้าใกล้ 1 แสดงว่าประชากรทั้ง 2 กลุ่มมีความแตกต่างของอัลลีลหรือมีความแตกต่างทางพันธุกรรม แต่หากมีค่าเข้าใกล้ 0 แสดงว่าประชากรทั้ง 2 กลุ่มมีอัลลีลร่วมกันหรือไม่มีความแตกต่างทางพันธุกรรม

สูตรการคำนวณ

$$F_{ST} = \frac{H_T - H_S}{H_T}$$

(Hartl and Clark, 2007)

โดย  $H_T$  คือ ค่า expected heterozygosity ของประชากรทั้งหมด

$H_S$  คือ ค่าเฉลี่ยของ expected heterozygosities ของ subpopulation ทั้งหมด

- ค่า inbreeding coefficient ( $F_{IS}$ ) เป็นค่าที่แสดงการเกิดการผสมพันธุ์ในเครือญาติของประชากร หากค่า  $F_{IS}$  มีค่าน้อยกว่าศูนย์ แสดงว่ามีการเกิดการผสมพันธุ์ในหมู่เครือญาติ น้อย แต่ถ้าหากค่า  $F_{IS}$  มีค่ามากกว่าศูนย์ แสดงว่ามีการเกิดการผสมพันธุ์ในหมู่เครือญาติ มาก

สูตรการคำนวณ

$$F_{IS} = \frac{H_S - H_I}{H_S}$$

(Hartl and Clark, 2007)

โดย  $H_S$  คือ ค่าเฉลี่ยของ expected heterozygosities ของ subpopulation ทั้งหมด

$H_I$  คือ ค่าเฉลี่ยของ observed heterozygosities ของ subpopulation ทั้งหมด

### 3.3.2 โปรแกรม ML-NullFreq (Kalinowski and Taper, 2006)

ใช้หาค่า null allele frequency (NAF) ซึ่งเป็นค่าที่ใช้บ่งบอกว่าโลคัสใดมีโอกาสเกิดความผิดพลาดในการเพิ่มปริมาณไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอในขั้นตอน PCR ได้ ซึ่งอาจเกิดจากการออกแบบสถานะ PCR ที่ไม่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณไมโครแซทเทลไลท์ หรือ เกิดจากการเกิด mutation ในตำแหน่งที่ไพรเมอร์จะเข้าไปจับ (Dakin and Avise, 2004; Selkoe and Toonen, 2006) ยกตัวอย่างเช่น หาก genotype ของสิ่งมีชีวิตศึกษาเป็นแบบ  $A_1A_1$ ,  $A_1A_2$ ,  $A_2A_2$  แล้วอัลลีลที่เกิด null allele คือ  $A_1$  ตัวอย่างที่เป็น homozygote แบบ  $A_1A_1$  จะไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ และ ตัวอย่างที่เป็น heterozygote ( $A_1A_2$ ) จะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้เพียงบริเวณของอัลลีล  $A_2$  เท่านั้น ดังนั้นตัวอย่างที่ควรจะเป็น heterozygous allele อาจถูกแปรผลเป็น homozygous allele ได้ จึงทำให้การวิเคราะห์ผลเกิดความผิดพลาด และทำให้เกิดการลดลงของค่า heterozygosity อีกด้วย (Dakin and Avise, 2004; Kalinowski and Taper, 2006)

### 3.3.3 โปรแกรม FSTAT เวอร์ชัน 2.9.3 (Goudet, 2001)

ใช้ในการวิเคราะห์ค่าต่าง ๆ ดังนี้

- ค่า linkage disequilibrium (LD) ที่เกิดจากการแยกกันอย่างไม่เป็นอิสระของอัลลีลที่อยู่ต่างโลโซกัน (non-random association) ซึ่งอาจเกิดได้จากปัจจัยทางกายภาพที่โลโซทั้งสองอยู่ในตำแหน่งที่ใกล้กันบนโครโมโซมจนไม่สามารถแยกออกจากกันได้เมื่อเกิด recombination หรืออาจ

เกิดได้จาก selection, mutation หรือ genetic drift เป็นต้น (Hartl and Clark, 2007; Selkoe and Toonen, 2006)

- ค่า allelic richness ( $A_R$ ) เป็นค่าที่ใช้บ่งบอกจำนวนของอัลลีลต่อโลคัสระหว่างตัวอย่างที่มีขนาดอัลลีลแตกต่างกัน โดยจะมีการปรับค่าจำนวนของตัวอย่างให้มีขนาดเท่ากันด้วยวิธี rarefaction technique หรือ Bayesian simulation

### 3.3.4 โปรแกรม Micro-Checker เวอร์ชัน 2.2.3 (van Oosterhout et al., 2004)

ใช้หาค่า large allele dropout ซึ่งเป็นโอกาสที่ไพรเมอร์จะจับกับอัลลีลที่มีขนาดเล็กมากกว่าขนาดใหญ่ในขั้นตอน PCR จึงทำให้อัลลีลแบบ heterozygous ถูกแปรผลเป็นอัลลีลแบบ homozygous ได้ (Selkoe and Toonen, 2006)

### 3.3.5 โปรแกรม STRUCTURE เวอร์ชัน 2.3.4 (Pritchard et al., 2000)

ใช้วิเคราะห์ค่า  $K$  value ซึ่งเป็นค่าที่แสดงจำนวนกลุ่มประชากรย่อย (subpopulation) ของประชากรที่ศึกษาตามหลักการของ Bayesian โดยในการศึกษาครั้งนี้ได้กำหนดการคำนวณค่า  $K$  ที่  $K = 1$  ถึง  $K = 5$  ทำซ้ำค่าละ 5 ครั้ง สำหรับค่า  $K$  value ที่บ่งบอกจำนวน subpopulation ของประชากรสามารถพิจารณาได้จากค่าเฉลี่ยของค่า log likelihood หรือค่า  $\ln P(D)$  ที่สูงที่สุด โดยตั้งค่าพารามิเตอร์ในการวิเคราะห์ดังนี้

1. Burn-in ที่ค่า 100,000 รอบ
2. Markov chain Monte Carlo (MCMC) ที่ค่า 1,000,000 รอบ
3. Ancestry models เลือกใช้ admixture model ภายใต้สมมติฐานที่ว่าประชากรนกระเรียนพันธุ์ไทยทั้งสองพื้นที่มีบรรพบุรุษร่วมกันมาก่อน
4. Allele frequency models เลือกใช้ allele frequency correlation ภายใต้สมมติฐานที่ว่าความถี่อัลลีลของประชากรนกระเรียนทั้งสองพื้นที่ไม่มีความแตกต่างกัน



## บทที่ 4

### ผลการศึกษาและอภิปรายผลการศึกษา

#### 4.1 ผลการเก็บตัวอย่าง

ในการศึกษาครั้งนี้มีวิธีการเก็บตัวอย่างขนของนกกระเรียน 2 วิธี คือการเก็บขนที่ร่วงลงบนพื้นดินแล้วหรือเก็บขนจากบริเวณปีกของนกโดยตรง ซึ่งการเก็บตัวอย่างจากขนเป็นวิธีที่ก่อให้เกิดอันตรายต่อตัวนกล้นน้อยกว่าการเก็บตัวอย่างจากเลือดหรือเนื้อเยื่อ ตัวอย่างขนของนกกระเรียนพันธุ์ไทยที่นำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้มีทั้งหมด 28 ตัวอย่าง โดยเป็นตัวอย่างจากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว จำนวน 11 ตัวอย่าง รุ่นพ่อแม่พันธุ์ตั้งต้นจำนวน 9 ตัวและรุ่นลูกจำนวน 2 ตัว และสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ จำนวน 17 ตัวอย่าง รุ่นพ่อแม่พันธุ์ตั้งต้นจำนวน 17 ตัว แบ่งเป็นขนจากนกกระเรียนเพศผู้ จำนวน 13 ตัวอย่าง และเพศเมีย จำนวน 15 ตัวอย่าง (ตารางที่ 2) ในการระบุเพศเบื้องต้นของนกแต่ละตัวได้ใช้ความชำนาญในการจำแนกเพศของผู้ดูแลนกโดยสังเกตจากลักษณะสัณฐานภายนอก แต่เนื่องจากลักษณะสัณฐานภายนอกของนกกระเรียนทั้งสองเพศใกล้เคียงกันมาก ผู้วิจัยจึงได้นำเทคนิคการแยกเพศด้วย molecular sexing มายืนยันความถูกต้องด้วย โดยใช้ไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในตำแหน่ง EE0.6 (0.6 kb *EcoRI* fragment) และ ยีน CHD (Chromo Helicase DNA-binding gene) (Insee, 2013) (ภาคผนวก ง.) จากผลการศึกษาพบว่าไพรเมอร์ที่นำมาใช้สำหรับระบุเพศสามารถแยกเพศของนกได้อย่างชัดเจนเมื่อตรวจสอบผลด้วยวิธี gel electrophoresis (ภาพที่ 47 และ 48) (ภาคผนวก ง.) นอกจากนี้ยังพบว่ามีตัวอย่างนกจำนวน 6 ตัว คือตัวอย่างหมายเลข 10, 12, 16, 18, 34 และ 36 ที่ให้ผลการระบุเพศจากลักษณะสัณฐานภายนอกไม่สอดคล้องกับการระบุเพศด้วยเทคนิค molecular sexing ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จะใช้ข้อมูลเพศของนกที่ได้จากการศึกษาด้วยวิธี molecular sexing

**ตารางที่ 2** ผลการเก็บตัวอย่างขนนกกระเรียนพันธุ์ไทยจากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว (KKOZ) และสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ (BB) และการระบุเพศนกกระเรียนด้วยเทคนิค molecular sexing

สถานที่เก็บตัวอย่าง	หมายเลขตัวอย่าง	เพศ	วิธีการเก็บตัวอย่าง
KKOZ	8	ผู้	เก็บขนส่วนใดก็ได้ที่ร่วงลงบนพื้นดิน
KKOZ	9	เมีย	เก็บขนส่วนใดก็ได้ที่ร่วงลงบนพื้นดิน
KKOZ	10	เมีย*	เก็บขนส่วนใดก็ได้ที่ร่วงลงบนพื้นดิน
KKOZ	11	ผู้	เก็บขนส่วนใดก็ได้ที่ร่วงลงบนพื้นดิน
KKOZ	12	เมีย*	เก็บขนส่วนใดก็ได้ที่ร่วงลงบนพื้นดิน
KKOZ	13	เมีย	เก็บขนส่วนใดก็ได้ที่ร่วงลงบนพื้นดิน
KKOZ	14	เมีย	เก็บขนส่วนใดก็ได้ที่ร่วงลงบนพื้นดิน
KKOZ	15	ผู้	เก็บขนส่วนใดก็ได้ที่ร่วงลงบนพื้นดิน
KKOZ	16	ผู้*	เก็บขนส่วนใดก็ได้ที่ร่วงลงบนพื้นดิน
KKOZ	34	เมีย*	เก็บขนส่วนใดก็ได้ที่ร่วงลงบนพื้นดิน
KKOZ	36	ผู้*	เก็บขนส่วนใดก็ได้ที่ร่วงลงบนพื้นดิน
BB	17	เมีย	เก็บขนส่วนใดก็ได้ที่ร่วงลงบนพื้นดิน
BB	18	ผู้*	เก็บขนส่วนใดก็ได้ที่ร่วงลงบนพื้นดิน
BB	19	เมีย	เก็บขนส่วนใดก็ได้ที่ร่วงลงบนพื้นดิน
BB	20	เมีย	เก็บขนส่วนใดก็ได้ที่ร่วงลงบนพื้นดิน
BB	21	ผู้	เก็บขนส่วนใดก็ได้ที่ร่วงลงบนพื้นดิน
BB	22	ผู้	เก็บขนส่วนใดก็ได้ที่ร่วงลงบนพื้นดิน
BB	23	ผู้	ดึงขนโดยตรงจากบริเวณปีก
BB	24	เมีย	ดึงขนโดยตรงจากบริเวณปีก
BB	25	ผู้	ดึงขนโดยตรงจากบริเวณปีก
BB	26	เมีย	ดึงขนโดยตรงจากบริเวณปีก
BB	27	ผู้	ดึงขนโดยตรงจากบริเวณปีก
BB	28	เมีย	ดึงขนโดยตรงจากบริเวณปีก
BB	29	ผู้	ดึงขนโดยตรงจากบริเวณปีก
BB	30	เมีย	ดึงขนโดยตรงจากบริเวณปีก
BB	31	ผู้	เก็บขนส่วนใดก็ได้ที่ร่วงลงบนพื้นดิน

ตารางที่ 2 (ต่อ)

สถานที่เก็บตัวอย่าง	หมายเลขตัวอย่าง	เพศ	วิธีการเก็บตัวอย่าง
BB	32	เมีย	เก็บขนส่วนใดก็ได้ที่ร่วงลงบนพื้นดิน
BB	33	เมีย	เก็บขนส่วนใดก็ได้ที่ร่วงลงบนพื้นดิน

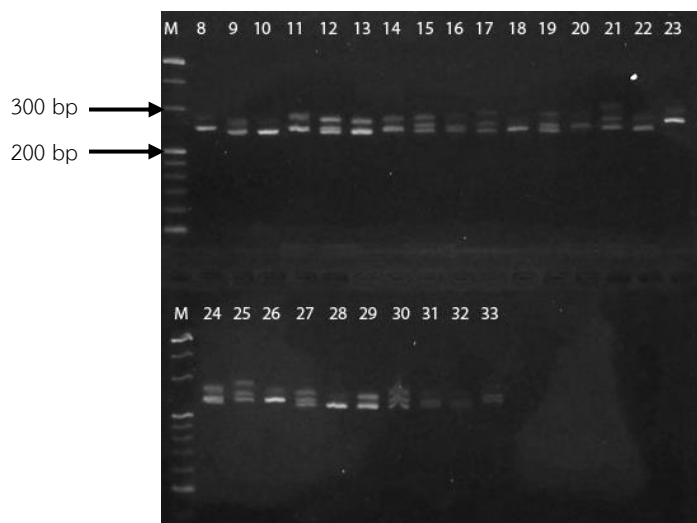
หมายเหตุ

\* คือ ผลการระบุเพศด้วยลักษณะสัณฐานภายนอกไม่สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์โดยใช้ DNA marker

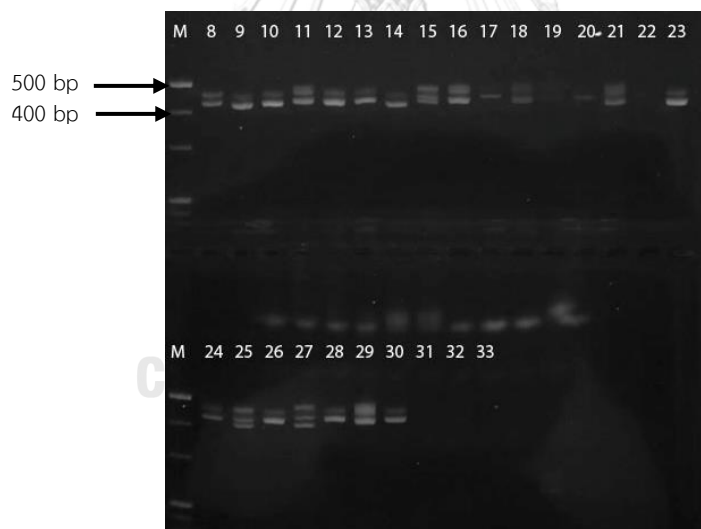


#### 4.2 ผลการสกัดดีเอ็นเอ และการคัดกรองเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์

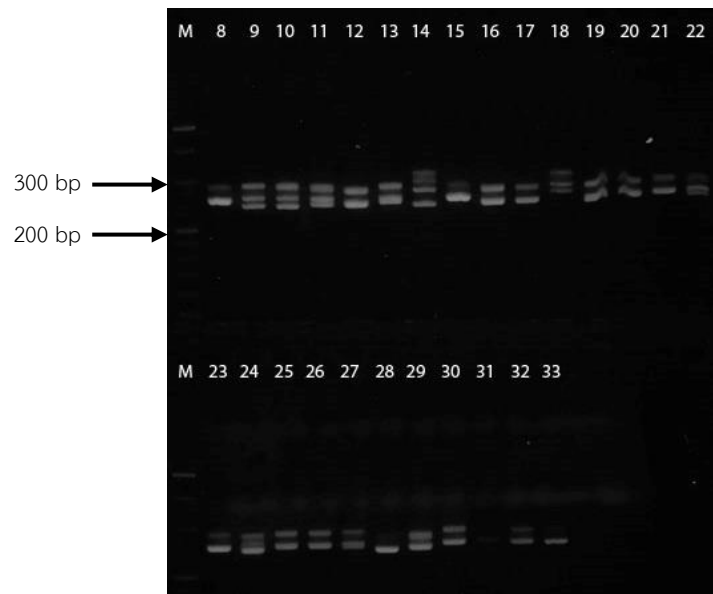
แม้ว่าการศึกษาทางด้านพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตส่วนใหญ่มักนิยมใช้ตัวอย่างที่ได้มาจากเลือดหรือน้ำเยื่อเพื่อนำมาสกัดดีเอ็นเอ (Hansen et al., 2007; Strzaka et al., 2015; Sugimoto et al., 2015) เพราะจะให้ปริมาณของดีเอ็นเอมากพอที่จะใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิค PCR ได้อย่างดี แต่จากผลการศึกษาที่ได้แสดงให้เห็นว่านอกจากเลือดและน้ำเยื่อแล้วคอนชนกก็สามารถนำมาสกัดดีเอ็นเอและเพิ่มปริมาณไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอได้ดีเช่นกัน เพราะเมื่อนำ total DNA ของทุกตัวอย่างมาเพิ่มปริมาณไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ทั้ง 28 คู่ ซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่ได้ออกแบบมาจากจีโนมของ whooping crane จำนวน 14 คู่ และ blue crane จำนวน 14 คู่ พบว่าไพรเมอร์ทุกคู่สามารถเพิ่มปริมาณไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอของนกกระเรียนพันธุ์ไทยได้ทั้งหมด โดยทุกตัวอย่างมีการปรากฏแบนด์ที่ชัดเจนทั้งแบบ homozygous หรือ heterozygous (ภาพที่ 14-41) ถึงแม้ว่าไพรเมอร์ทั้ง 28 คู่จะสามารถเพิ่มปริมาณไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอของนกกระเรียนพันธุ์ไทยได้แต่ไพรเมอร์ที่สามารถนำไปใช้วิเคราะห์ค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมได้ต้องเป็นไพรเมอร์ที่แสดง polymorphism หรือเป็น polymorphic primer เท่านั้น กล่าวคือ แสดงลักษณะแบนบนภาพเจลในแต่ละตัวอย่างตั้งแต่ 1 ขนาดขึ้นไป (ภาพที่ 14-19, 22, 24, 26-27, 29-31 และ 33-41) โดยผลจากการคัดกรองเบื้องต้นจากภาพเจลพบว่ามีไพรเมอร์เพียง 22 คู่ เท่านั้นที่เป็น putative polymorphic primer แบ่งเป็นไพรเมอร์ที่เคยใช้ศึกษาใน whooping crane จำนวน 10 คู่ ได้แก่ Gram6, Gram8, Gram11, Gram17, Gram20, Gram22, Gram30, Gram32a, Gram42 และ Gram45 และไพรเมอร์ที่เคยใช้ศึกษาใน blue crane จำนวน 12 คู่ ได้แก่ Gpa11, Gpa12, Gpa14, Gpa32, Gpa33, Gpa34, Gpa35, Gpa36, Gpa37, Gpa38, Gpa39 และ Gpa41 ทั้งนี้เพื่อยืนยันผลการทดลองที่ได้ ในขั้นตอนต่อไปจึงทำ genotyping เพื่อตรวจสอบขนาดอัลลีลของแต่ละโลคัสว่ามีจำนวนเท่าใด หากไพรเมอร์ที่ศึกษามีขนาดอัลลีลตั้งแต่ 2 ขนาดขึ้นไปก็แสดงว่าเป็น polymorphic primer



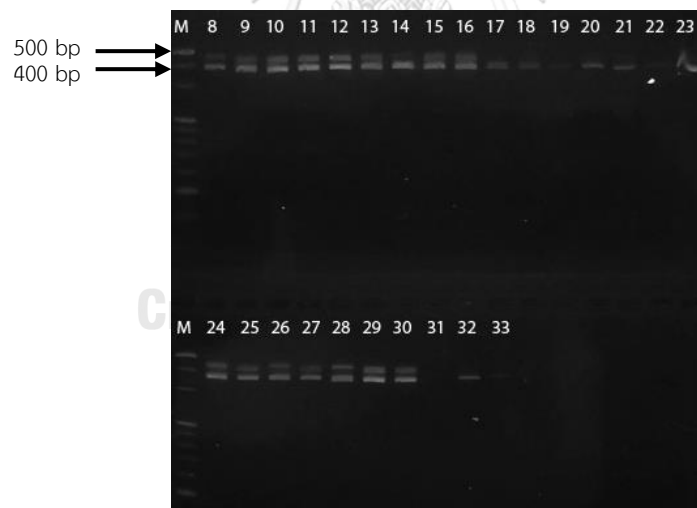
**ภาพที่ 14** การตรวจสอบขนาด microsatellite band ด้วยวิธี 3% agarose NuSieve gel electrophoresis ของตัวอย่างนกกระเรียนพันธุ์ไทยจากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว (ตัวอย่างหมายเลข 8–16) และสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ (ตัวอย่างหมายเลข 17–33) โดยใช้ไพรเมอร์ Gram6 แถบ M คือ 20 bp DNA ladder



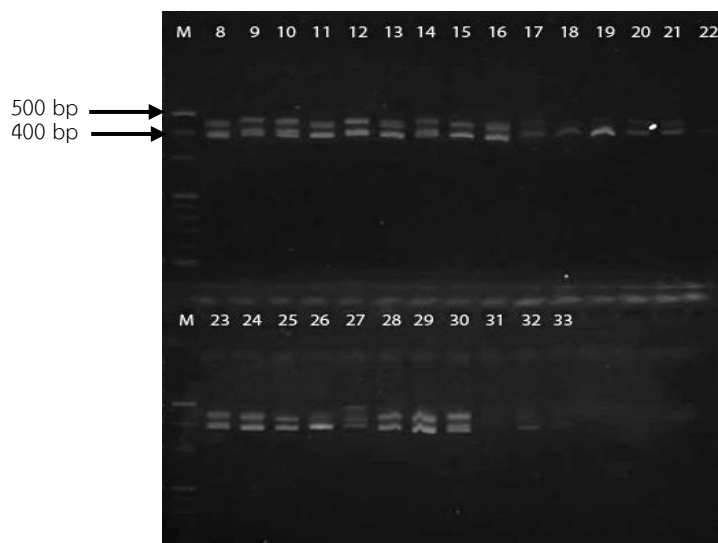
**ภาพที่ 15** การตรวจสอบขนาด microsatellite band ด้วยวิธี 3% agarose NuSieve gel electrophoresis ของตัวอย่างนกกระเรียนพันธุ์ไทยจากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว (ตัวอย่างหมายเลข 8–16) และสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ (ตัวอย่างหมายเลข 17–33) โดยใช้ไพรเมอร์ Gram8 แถบ M คือ 20 bp DNA ladder



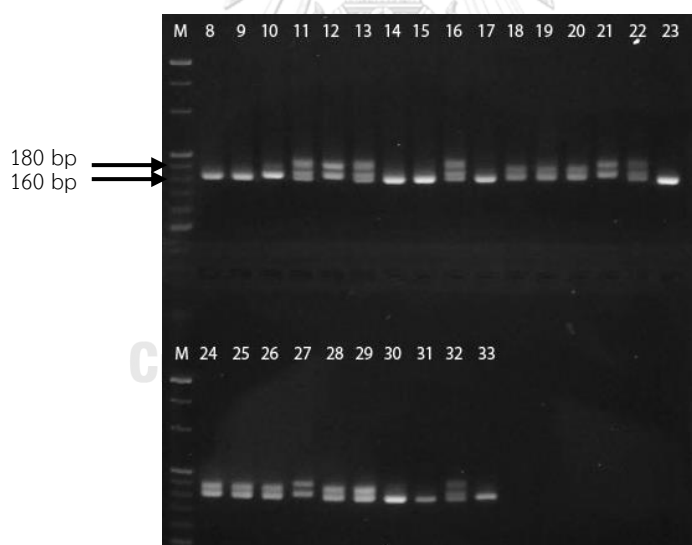
ภาพที่ 16 การตรวจสอบขนาด microsatellite band ด้วยวิธี 3% agarose NuSieve gel electrophoresis ของตัวอย่างนกระเรียนพันธุ์ไทยจากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว (ตัวอย่างหมายเลข 8-16) และสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ (ตัวอย่างหมายเลข 17-33) โดยใช้ไพรเมอร์ Gram11 แถบ M คือ 20 bp DNA ladder



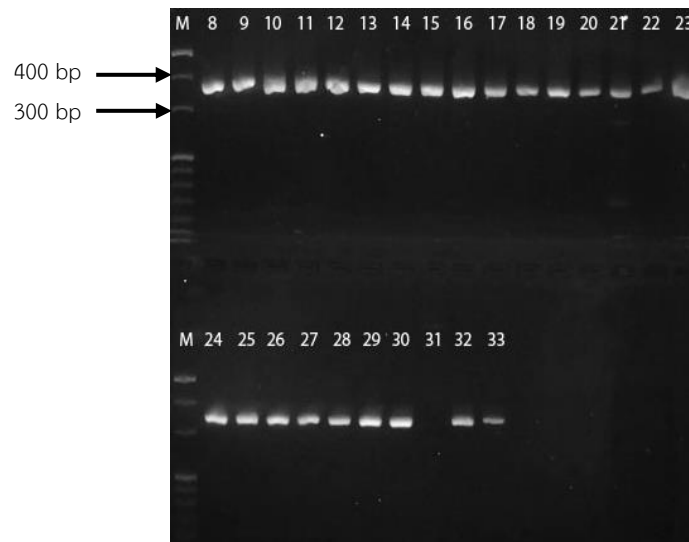
ภาพที่ 17 การตรวจสอบขนาด microsatellite band ด้วยวิธี 3% agarose NuSieve gel electrophoresis ของตัวอย่างนกระเรียนพันธุ์ไทยจากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว (ตัวอย่างหมายเลข 8-16) และสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ (ตัวอย่างหมายเลข 17-33) โดยใช้ไพรเมอร์ Gram17 แถบ M คือ 20 bp DNA ladder



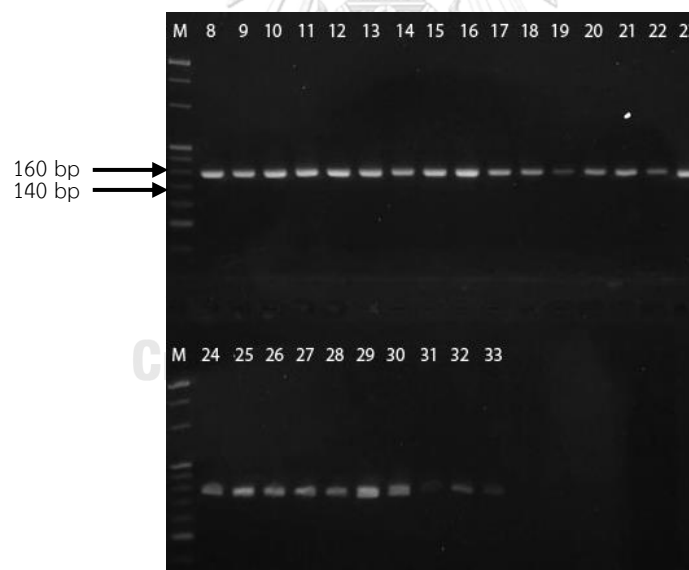
ภาพที่ 18 การตรวจสอบขนาด microsatellite band ด้วยวิธี 3% agarose NuSieve gel electrophoresis ของตัวอย่างนกระเรียนพันธุ์ไทยจากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว (ตัวอย่างหมายเลข 8-16) และสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ (ตัวอย่างหมายเลข 17-33) โดยใช้ไพรเมอร์ Gram20 แถบ M คือ 20 bp DNA ladder



ภาพที่ 19 การตรวจสอบขนาด microsatellite band ด้วยวิธี 3% agarose NuSieve gel electrophoresis ของตัวอย่างนกระเรียนพันธุ์ไทยจากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว (ตัวอย่างหมายเลข 8-16) และสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ (ตัวอย่างหมายเลข 17-33) โดยใช้ไพรเมอร์ Gram22 แถบ M คือ 20 bp DNA ladder

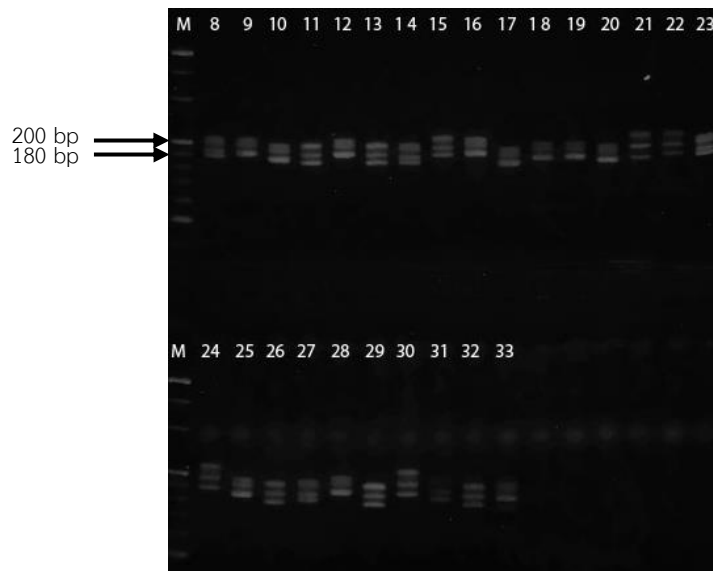


ภาพที่ 20 การตรวจสอบขนาด microsatellite band ด้วยวิธี 3% agarose NuSieve gel electrophoresis ของตัวอย่างนกระเรียนพันธุ์ไทยจากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว (ตัวอย่างหมายเลข 8-16) และสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ (ตัวอย่างหมายเลข 17-33) โดยใช้ไพรเมอร์ Gram24 แถบ M คือ 20 bp DNA ladder

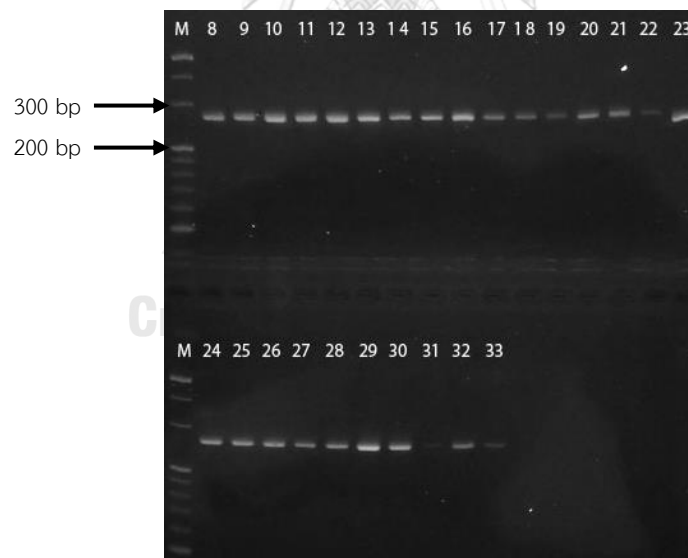


ภาพที่ 21 การตรวจสอบขนาด microsatellite band ด้วยวิธี 3% agarose NuSieve gel electrophoresis ของตัวอย่างนกระเรียนพันธุ์ไทยจากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว (ตัวอย่างหมายเลข 8-16) และสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ (ตัวอย่างหมายเลข 17-33) โดยใช้ไพรเมอร์ Gram25 แถบ M คือ 20 bp DNA ladder

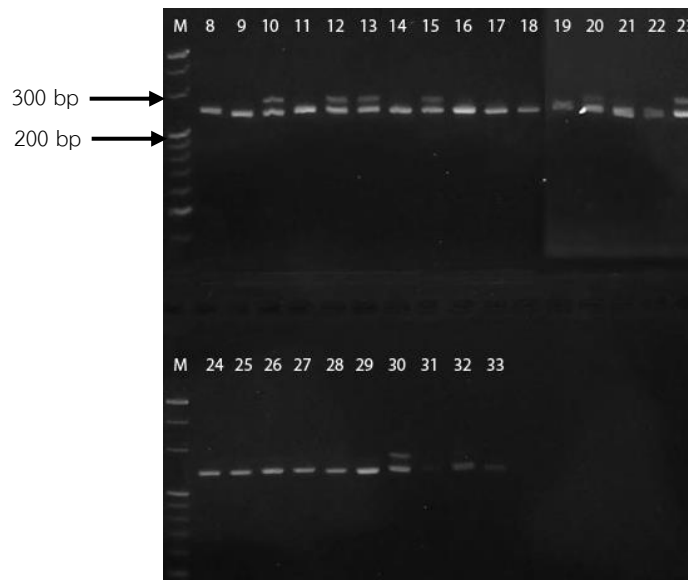




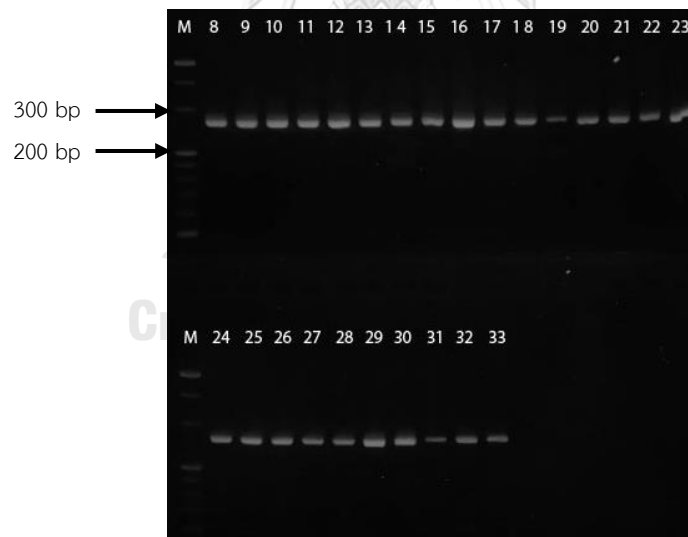
ภาพที่ 22 การตรวจสอบขนาด microsatellite band ด้วยวิธี 3% agarose NuSieve gel electrophoresis ของตัวอย่างนกระเรียนพันธุ์ไทยจากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว (ตัวอย่างหมายเลข 8-16) และสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ (ตัวอย่างหมายเลข 17-33) โดยใช้ไพรเมอร์ Gram30 แถบ M คือ 20 bp DNA ladder



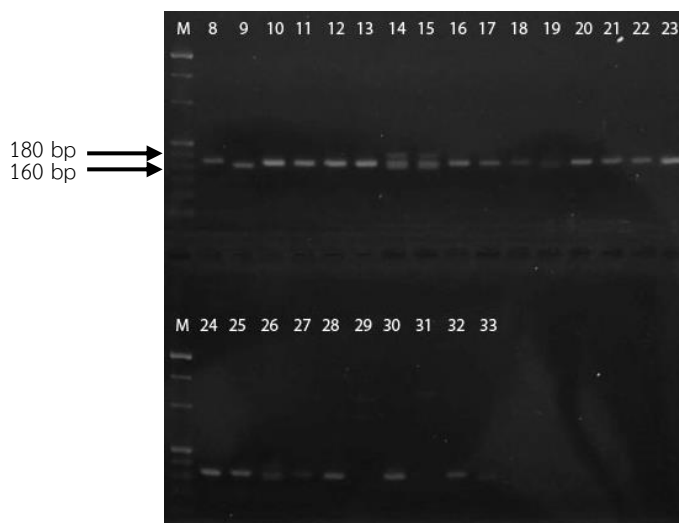
ภาพที่ 23 การตรวจสอบขนาด microsatellite band ด้วยวิธี 3% agarose NuSieve gel electrophoresis ของตัวอย่างนกระเรียนพันธุ์ไทยจากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว (ตัวอย่างหมายเลข 8-16) และสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ (ตัวอย่างหมายเลข 17-33) โดยใช้ไพรเมอร์ Gram31 แถบ M คือ 20 bp DNA ladder



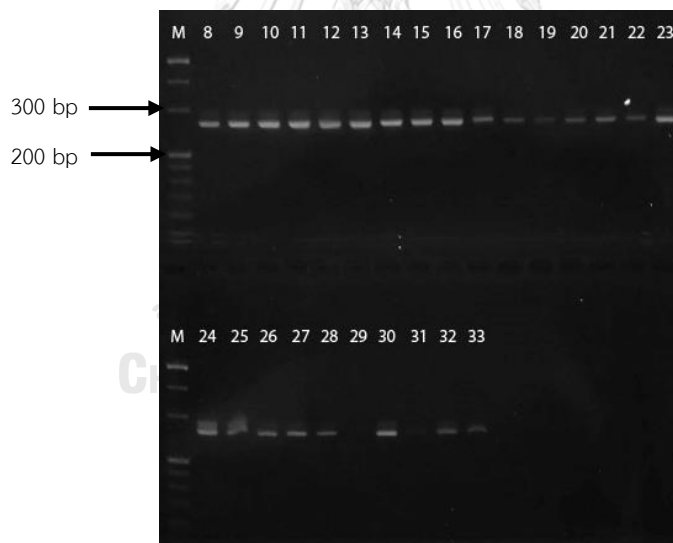
ภาพที่ 24 การตรวจสอบขนาด microsatellite band ด้วยวิธี 3% agarose NuSieve gel electrophoresis ของตัวอย่างนกระเรียนพันธุ์ไทยจากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว (ตัวอย่างหมายเลข 8-16) และสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ (ตัวอย่างหมายเลข 17-33) โดยใช้ไพรเมอร์ Gram32a แถบ M คือ 20 bp DNA ladder



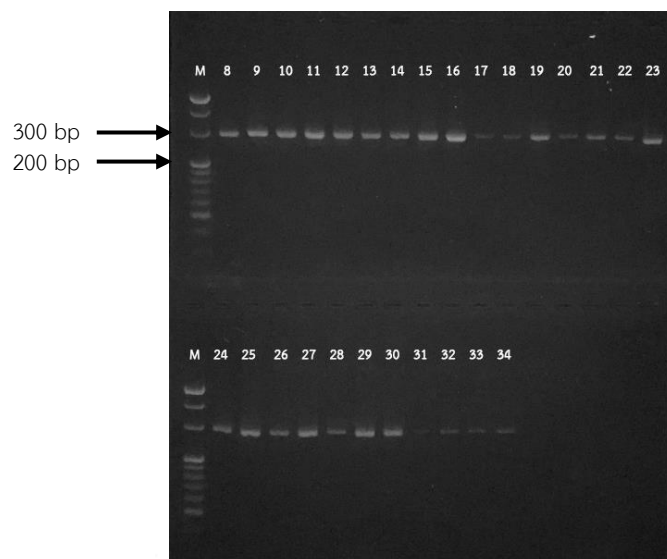
ภาพที่ 25 การตรวจสอบขนาด microsatellite band ด้วยวิธี 3% agarose NuSieve gel electrophoresis ของตัวอย่างนกระเรียนพันธุ์ไทยจากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว (ตัวอย่างหมายเลข 8-16) และสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ (ตัวอย่างหมายเลข 17-33) โดยใช้ไพรเมอร์ Gram41 แถบ M คือ 20 bp DNA ladder



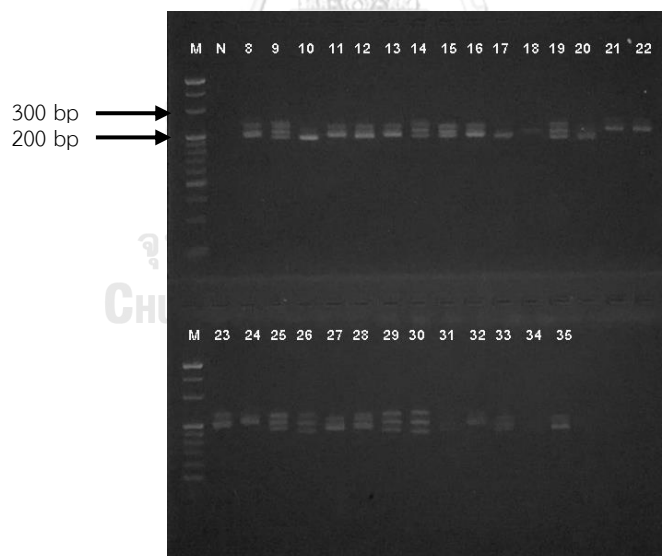
ภาพที่ 26 การตรวจสอบขนาด microsatellite band ด้วยวิธี 3% agarose NuSieve gel electrophoresis ของตัวอย่างนกกระเรียนพันธุ์ไทยจากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว (ตัวอย่างหมายเลข 8-16) และสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ (ตัวอย่างหมายเลข 17-33) โดยใช้ไพรเมอร์ Gram42 แถบ M คือ 20 bp DNA ladder



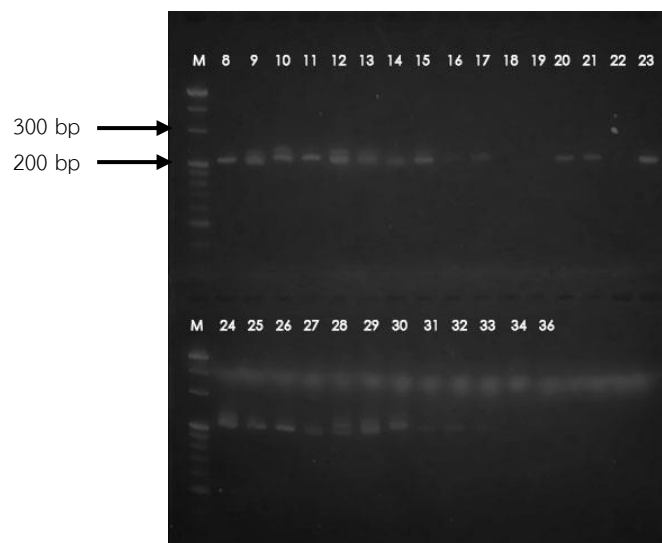
ภาพที่ 27 การตรวจสอบขนาด microsatellite band ด้วยวิธี 3% agarose NuSieve gel electrophoresis ของตัวอย่างนกกระเรียนพันธุ์ไทยจากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว (ตัวอย่างหมายเลข 8-16) และสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ (ตัวอย่างหมายเลข 17-33) โดยใช้ไพรเมอร์ Gram45 แถบ M คือ 20 bp DNA ladder



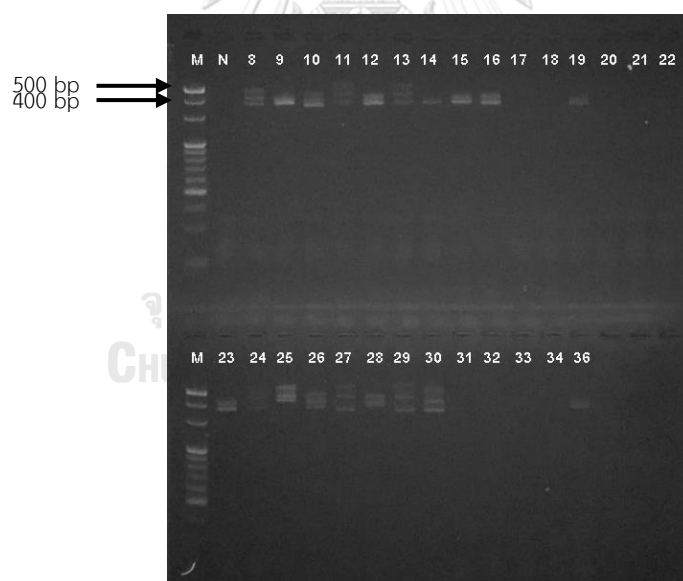
ภาพที่ 28 การตรวจสอบขนาด microsatellite band ด้วยวิธี 3% agarose NuSieve gel electrophoresis ของตัวอย่างนกกระเรียนพันธุ์ไทยจากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว (ตัวอย่างหมายเลข 8-16 และ 34) และสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ (ตัวอย่างหมายเลข 17-33) โดยใช้ไพรเมอร์ Gpa01 แถบ M คือ 20 bp DNA ladder



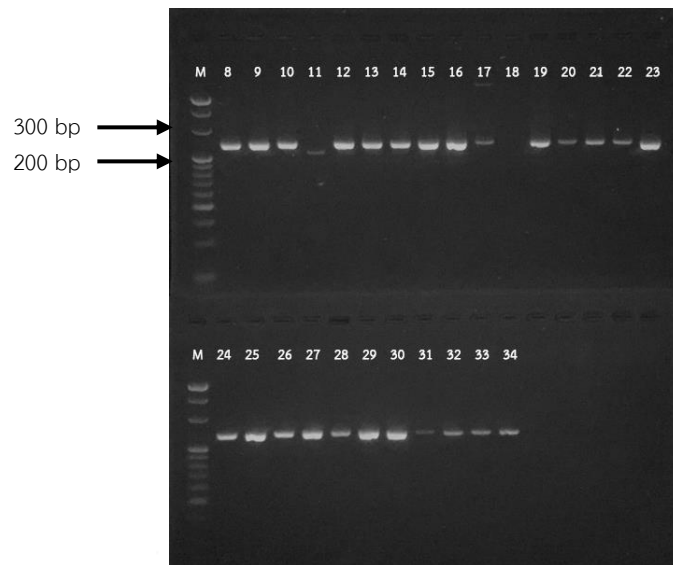
ภาพที่ 29 การตรวจสอบขนาด microsatellite band ด้วยวิธี 3% agarose NuSieve gel electrophoresis ของตัวอย่างนกกระเรียนพันธุ์ไทยจากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว (ตัวอย่างหมายเลข 8-16, 34 และ 36) และสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ (ตัวอย่างหมายเลข 17-33) โดยใช้ไพรเมอร์ Gpa11 แถบ M คือ 20 bp DNA ladder



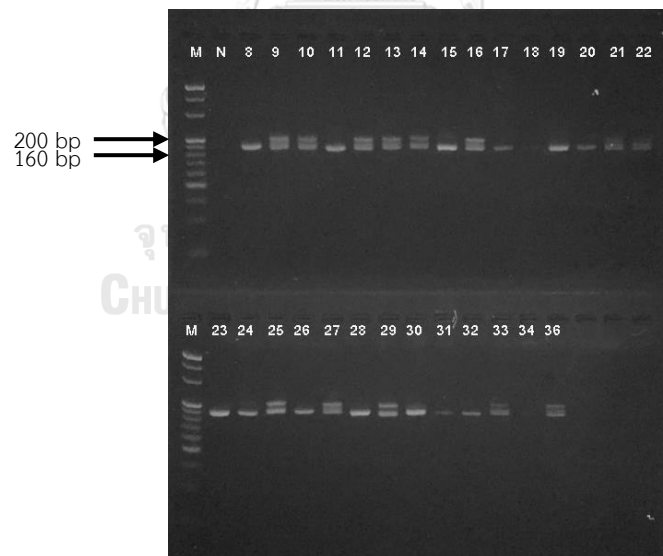
**ภาพที่ 30** การตรวจสอบขนาด microsatellite band ด้วยวิธี 3% agarose NuSieve gel electrophoresis ของตัวอย่างนกระเรียนพันธุ์ไทยจากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว (ตัวอย่างหมายเลข 8–16, 34 และ 36) และสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ (ตัวอย่างหมายเลข 17–33) โดยใช้ไพรเมอร์ Gpa12 แถบ M คือ 20 bp DNA ladder



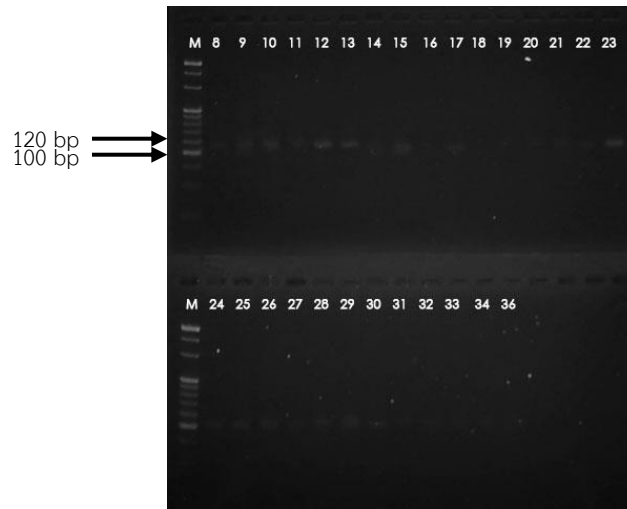
**ภาพที่ 31** การตรวจสอบขนาด microsatellite band ด้วยวิธี 3% agarose NuSieve gel electrophoresis ของตัวอย่างนกระเรียนพันธุ์ไทยจากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว (ตัวอย่างหมายเลข 8–16, 34 และ 36) และสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ (ตัวอย่างหมายเลข 17–33) โดยใช้ไพรเมอร์ Gpa14 แถบ M คือ 20 bp DNA ladder



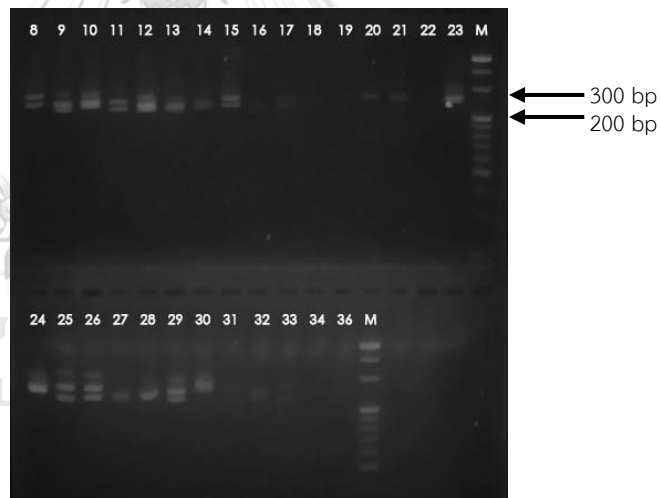
ภาพที่ 32 การตรวจสอบขนาด microsatellite band ด้วยวิธี 3% agarose NuSieve gel electrophoresis ของตัวอย่างนกกระเรียนพันธุ์ไทยจากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว (ตัวอย่างหมายเลข 8-16 และ 34) และสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ (ตัวอย่างหมายเลข 17-33) โดยใช้ไพรเมอร์ Gpa24 แถบ M คือ 20 bp DNA ladder



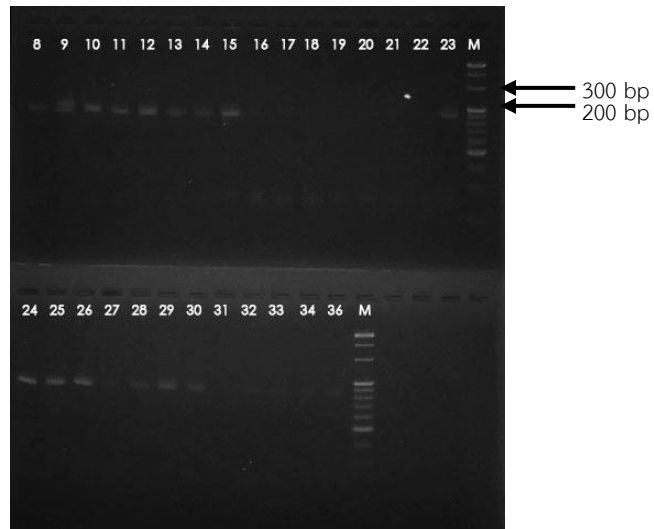
ภาพที่ 33 การตรวจสอบขนาด microsatellite band ด้วยวิธี 3% agarose NuSieve gel electrophoresis ของตัวอย่างนกกระเรียนพันธุ์ไทยจากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว (ตัวอย่างหมายเลข 8-16, 34 และ 36) และสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ (ตัวอย่างหมายเลข 17-33) โดยใช้ไพรเมอร์ Gpa32 แถบ M คือ 20 bp DNA ladder



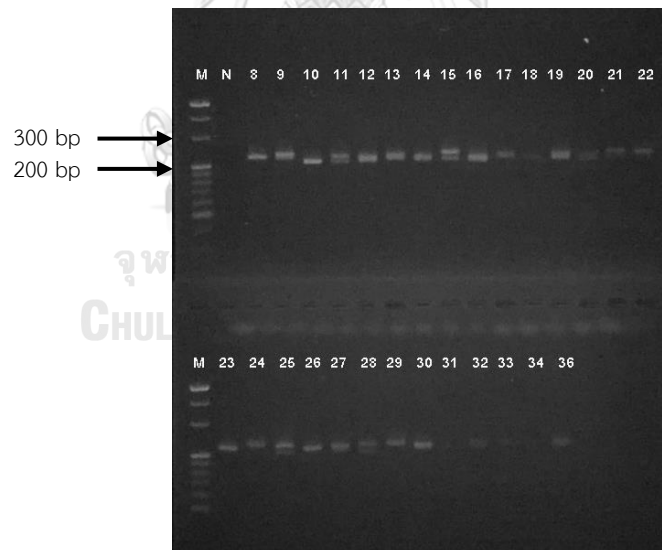
ภาพที่ 34 การตรวจสอบขนาด microsatellite band ด้วยวิธี 3% agarose NuSieve gel electrophoresis ของตัวอย่างนกกระเรียนพันธุ์ไทยจากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว (ตัวอย่างหมายเลข 8-16, 34 และ 36) และสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ (ตัวอย่างหมายเลข 17-33) โดยใช้ไพรเมอร์ Gpa33 แถบ M คือ 20 bp DNA ladder



ภาพที่ 35 การตรวจสอบขนาด microsatellite band ด้วยวิธี 3% agarose NuSieve gel electrophoresis ของตัวอย่างนกกระเรียนพันธุ์ไทยจากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว (ตัวอย่างหมายเลข 8-16, 34 และ 36) และสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ (ตัวอย่างหมายเลข 17-33) โดยใช้ไพรเมอร์ Gpa34 แถบ M คือ 20 bp DNA ladder

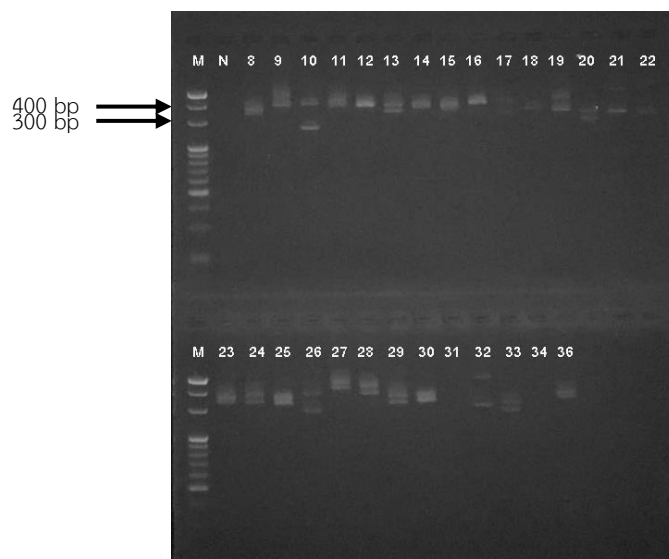


ภาพที่ 36 การตรวจสอบขนาด microsatellite band ด้วยวิธี 3% agarose NuSieve gel electrophoresis ของตัวอย่างนกกระเรียนพันธุ์ไทยจากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว (ตัวอย่างหมายเลข 8-16, 34 และ 36) และสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ (ตัวอย่างหมายเลข 17-33) โดยใช้ไพรเมอร์ Gpa35 แถบ M คือ 20 bp DNA ladder

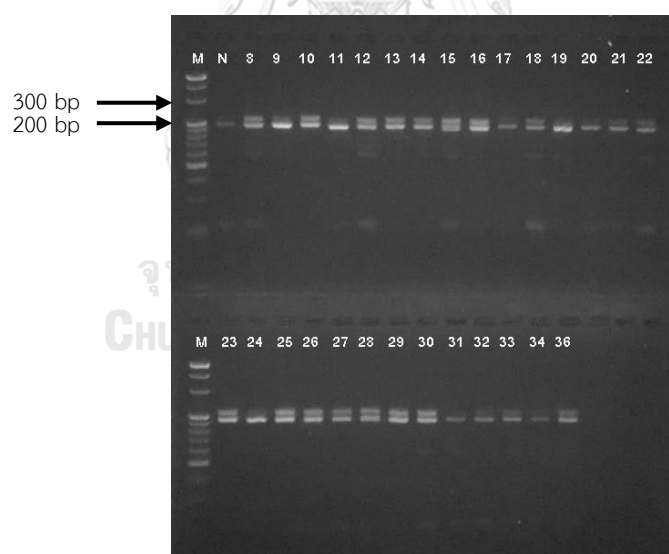


ภาพที่ 37 การตรวจสอบขนาด microsatellite band ด้วยวิธี 3% agarose NuSieve gel electrophoresis ของตัวอย่างนกกระเรียนพันธุ์ไทยจากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว (ตัวอย่างหมายเลข 8-16, 34 และ 36) และสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ (ตัวอย่างหมายเลข 17-33) โดยใช้ไพรเมอร์ Gpa36 แถบ M คือ 20 bp DNA ladder

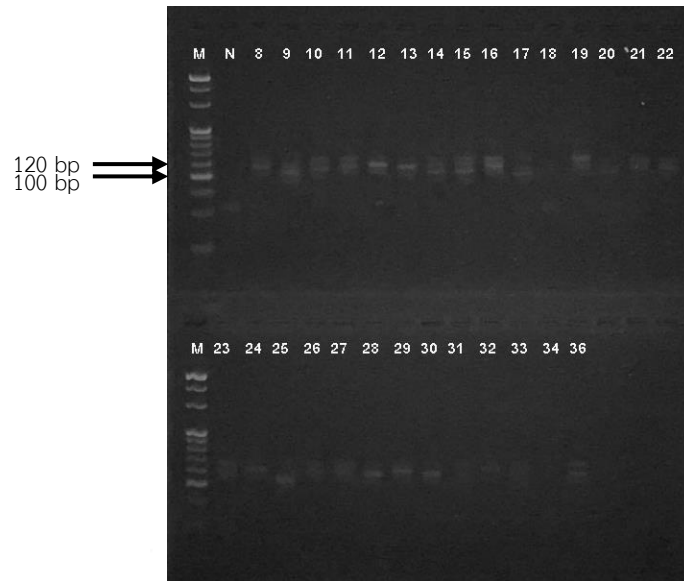




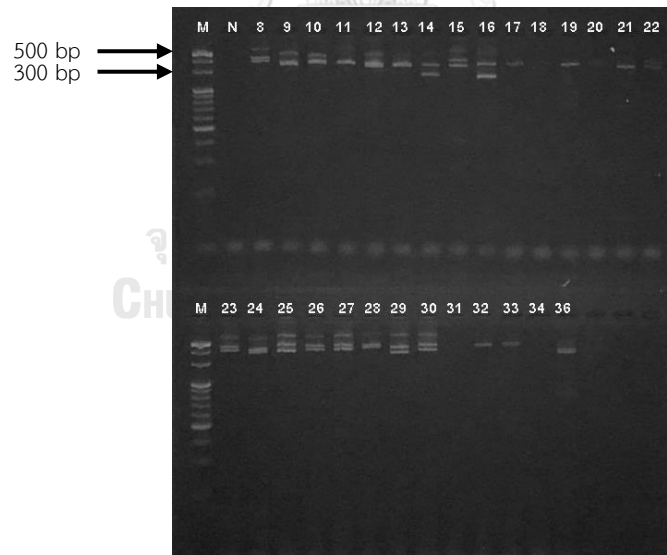
**ภาพที่ 38** การตรวจสอบขนาด microsatellite band ด้วยวิธี 3% agarose NuSieve gel electrophoresis ของตัวอย่างนกระเรียนพันธุ์ไทยจากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว (ตัวอย่างหมายเลข 8–16, 34 และ 36) และสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ (ตัวอย่างหมายเลข 17–33) โดยใช้ไพรเมอร์ Gpa37 แถบ M คือ 20 bp DNA ladder



**ภาพที่ 39** การตรวจสอบขนาด microsatellite band ด้วยวิธี 3% agarose NuSieve gel electrophoresis ของตัวอย่างนกระเรียนพันธุ์ไทยจากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว (ตัวอย่างหมายเลข 8–16, 34 และ 36) และสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ (ตัวอย่างหมายเลข 17–33) โดยใช้ไพรเมอร์ Gpa38 แถบ M คือ 20 bp DNA ladder



ภาพที่ 40 การตรวจสอบขนาด microsatellite band ด้วยวิธี 3% agarose NuSieve gel electrophoresis ของตัวอย่างนกระเรียนพันธุ์ไทยจากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว (ตัวอย่างหมายเลข 8–16, 34 และ 36) และสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ (ตัวอย่างหมายเลข 17–33) โดยใช้ไพรเมอร์ Gpa39 แถบ M คือ 20 bp DNA ladder

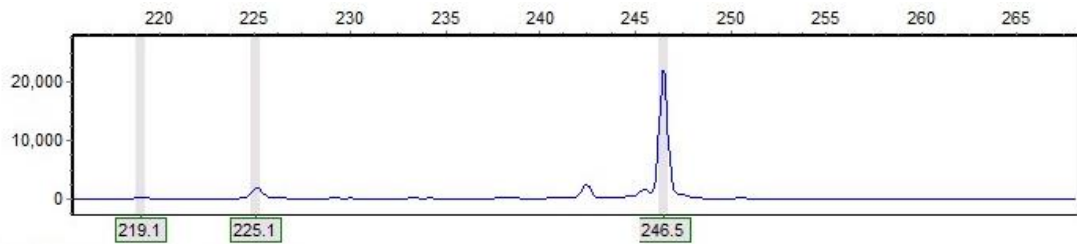


ภาพที่ 41 การตรวจสอบขนาด microsatellite band ด้วยวิธี 3% agarose NuSieve gel electrophoresis ของตัวอย่างนกระเรียนพันธุ์ไทยจากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว (ตัวอย่างหมายเลข 8–16, 34 และ 36) และสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ (ตัวอย่างหมายเลข 17–33) โดยใช้ไพรเมอร์ Gpa41 แถบ M คือ 20 bp DNA ladder

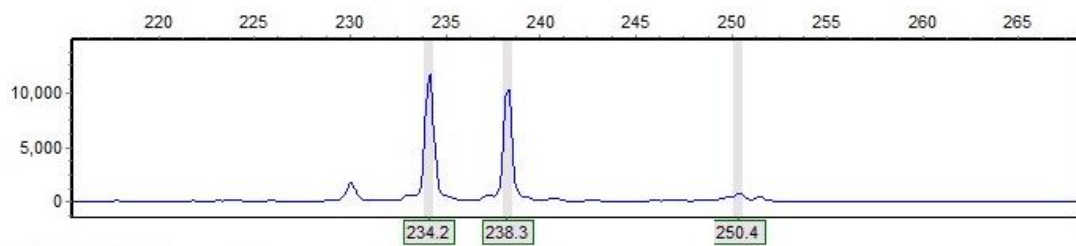
### 4.3 ผลการทำ genotyping ด้วยวิธี GeneScan

ผลที่ได้จากการทำ genotyping ด้วยวิธี GeneScan จะแสดงในรูปแบบของ electropherogram (ภาพที่ 42 และ 43) ซึ่งนอกจากจะบอกขนาดอัลลีลที่แน่ชัดแล้วยังบ่งบอก รูปแบบของอัลลีลได้ว่าเป็นอัลลีลแบบ homozygous หรือ heterozygous อีกทั้งยังสามารถยืนยัน สถานะของไพรเมอร์ที่ได้ว่าเป็น monomorphic primer หรือ polymorphic primer อีกด้วย ซึ่งผล ของ genotyping สามารถนำไปเปรียบเทียบกับผลที่ได้จาก gel electrophoresis ได้ว่ามีรูปแบบ อัลลีลและสถานะของไพรเมอร์ตรงกันหรือไม่ โดยตารางที่ 3-7 แสดงขนาดและรูปแบบของอัลลีลที่ ได้ในแต่ละโลคัส ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับผลจาก gel electrophoresis นั่นคือไพรเมอร์ 22 คู่ ได้แก่ Gram6, Gram8, Gram11, Gram17, Gram20, Gram22, Gram30, Gram32a, Gram42, Gram45, Gpa11, Gpa12, Gpa14, Gpa32, Gpa33, Gpa34, Gpa35, Gpa36, Gpa37, Gpa38, Gpa39 และ Gpa41 เป็น polymorphic primer ซึ่งมีการปรากฏรูปแบบอัลลีลทั้งแบบ homozygous และ heterozygous ที่มีขนาดอัลลีลตั้งแต่ 2 ขนาดขึ้นไป และไพรเมอร์อีก 6 คู่ ได้แก่ Gram24, Gram25, Gram31, Gram41, Gpa01 และ Gpa24 เป็น monomorphic primer ซึ่งทุกตัวอย่างแสดง อัลลีลแบบ homozygous ที่มีขนาดอัลลีลเพียง 1 ขนาดเท่านั้น

จากผลการคัดกรองเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ทั้งวิธี gel electrophoresis และ genotyping จะเห็นได้ว่าแม้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกกระเรียนพันธุ์ไทย ด้วยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์จะไม่มีเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่เป็น species-specific marker แต่การประยุกต์ใช้ไพรเมอร์ด้วยวิธี cross-species amplification จากนกในสกุลเดียวกัน และต่างสกุลนั้นสามารถนำมาใช้ได้ แต่อย่างไรก็ตามจำนวนของ monomorphic primer และ polymorphic primer ที่ได้ นั้นอาจจะเหมือนหรือแตกต่างจากการศึกษาก่อนหน้านี้ที่ได้ออกแบบ ไพรเมอร์มาให้จำเพาะกับนกชนิดนั้น ๆ ที่ผ่านมาการศึกษาโครงสร้างทางพันธุกรรมของนกกระเรียน หลายชนิดนิยมนำไพรเมอร์ที่ได้จากวิธี cross-species amplification มาใช้เพื่อเพิ่มความสะดวก และความรวดเร็วในการศึกษา เช่น การศึกษาใน sandhill crane (Henkel et al., 2012; Jones, Krapu, et al., 2005) grey crowned crane, wattled crane (Mearns et al., 2009) และ red-crowned crane (Zou et al., 2010)



ภาพที่ 42 ผล electropherogram ที่มีรูปแบบอัลลีลแบบ homozygous และมีขนาดอัลลีลเท่ากับ 246.5 bps



ภาพที่ 43 ผล electropherogram ที่มีรูปแบบอัลลีลแบบ heterozygous และมีขนาดอัลลีลเท่ากับ 234.2 และ 238.3 bps

หมายเหตุ

แกน X คือ ขนาดของอัลลีล (bp)

แกน Y คือ ความสูงของ peak (RFU: Relative Fluorescent Units)

**ตารางที่ 3** ขนาดของอัลลีลที่ได้ในแต่ละตัวอย่างจากการวิเคราะห์ผล genotyping บริเวณโลคัส Gram6, Gram8, Gram11, Gram17, Gram20 และ Gram22

หมายเลขตัวอย่าง	ขนาดอัลลีล (bp)							
	Gram6	Gram8	Gram11	Gram17	Gram20	Gram22		
8	246	424, 428	258	373, 381	380, 392	161		
9	234, 238	416	246, 262	369, 373	384, 404	161		
10	234	420	246, 262	369, 373	380, 400	165		
11	238, 242	428, 432	250, 262	373, 377	376, 384	161, 169		
12	234, 242	428	250, 254	373, 377	384, 396	165, 169		
13	234, 238	428	254, 262	373, 377	376, 384	161, 169		
14	238, 242	416	246, 278	377	384, 404	161		
15	234, 246	420, 436	262	373, 377	384, 388	161		
16	234, 242	428, 432	250, 254	373, 377	376, 384	161, 169		
34	238	428	254, 262	373	384	161, 165		
36	234, 238	428	254, 262	373, 377	384	161		
17	234, 250	436	250, 254	369	388, 400	161		
18	238	416, 424	270, 286	373, 377	383, 404	161, 165		
19	234, 246	436	250, 258	369, 373	384	161, 165		
20	242, 246	428	258, 262	377, 380	384, 392	161, 165		

ตารางที่ 3 (ต่อ)

หมายเลขตัวอย่าง	ขนาดอัลลีล (bp)									
	Gram6	Gram8	Gram11	Gram17	Gram20	Gram22	Gram22	Gram22	Gram22	Gram22
21	234, 238	416, 424	262, 266	369, 373	388, 392	165, 169	165, 169	165, 169	165, 169	165, 169
22	234, 238	428, 436	250, 262	373, 377	384	161, 169	161, 169	161, 169	161, 169	161, 169
23	246	424	258	373	380, 392	161	161	161	161	161
24	238, 242	428	250, 254	369, 377	376, 384	161, 165	161, 165	161, 165	161, 165	161, 165
25	242, 258	408, 428	258, 262	373, 377	380, 384	161, 165	161, 165	161, 165	161, 165	161, 165
26	246	428	258, 262	369, 381	392	161, 165	161, 165	161, 165	161, 165	161, 165
27	234, 246	408, 436	254, 262	373, 377	-	165, 169	165, 169	165, 169	165, 169	165, 169
28	234	436	250	365, 377	384, 392	161, 165	161, 165	161, 165	161, 165	161, 165
29	234, 238	428, 436	254, 258	369, 373	376, 384	161	161	161	161	161
30	234, 250	436	262, 266	365, 369	380, 396	161	161	161	161	161
31	234, 246	420, 436	262	373, 377	384	161	161	161	161	161
32	234, 242	420, 424	258, 262	373	376, 384	161, 169	161, 169	161, 169	161, 169	161, 169
33	242, 246	428	258	377, 381	384, 392	165	165	165	165	165

หมายเหตุ: - คือ ไม่แสดงผล เนื่องจากปริมาณดีเอ็นเอไม่เพียงพอที่จะใช้ในการวิเคราะห์ผล

**ตารางที่ 4** ขนาดของอัลลีลที่ได้ในแต่ละตัวอย่างจากการวิเคราะห์ผล genotyping บริเวณโลคัส Gram24, Gram25, Gram30, Gram31, Gram32a และ Gram41

หมายเลขตัวอย่าง	ขนาดอัลลีล (bp)						
	Gram24	Gam25	Gram30	Gram31	Gram32a	Gram41	
8	357	161	177, 185	258	242	264	
9	357	161	181, 185	258	238	264	
10	357	161	173, 177	258	238, 242	264	
11	357	161	169, 181	258	242	264	
12	357	161	181, 185	258	238, 242	264	
13	357	161	169, 181	258	238, 242	264	
14	357	161	169, 177	258	238	264	
15	357	161	181, 193	258	238, 242	264	
16	357	161	181, 185	258	242	264	
34	357	161	169, 185	258	238	264	
36	357	161	169, 185	258	238, 242	264	
17	357	161	165, 169	258	238	264	
18	357	161	173, 177	258	238, 242	264	
19	357	161	173, 177	258	238	264	
20	357	161	169, 193	258	238, 242	264	

ตารางที่ 4 (ต่อ)

หมายเลขตัวอย่าง	ขนาดดีเอ็นเอ (bp)							
	Gram24	Gram25	Gram30	Gram31	Gram32a	Gram41		
21	357	161	173, 193	258	238	264		
22	357	161	177, 193	258	238	264		
23	357	161	177, 185	258	238, 242	264		
24	357	161	177, 193	258	238	264		
25	357	161	169, 173	258	238	264		
26	357	161	161, 173	258	242	264		
27	357	161	165, 173	258	242	264		
28	357	161	177, 181	258	238	264		
29	357	161	161, 173	258	238	264		
30	357	161	177, 193	258	238, 242	264		
31	357	161	169, 181	258	238, 242	264		
32	357	161	161, 173	258	238, 246	264		
33	357	161	169, 173	258	238, 242	264		



**ตารางที่ 5** ขนาดของอัลลีลที่ได้ในแต่ละตัวอย่างจากการวิเคราะห์ผล genotyping บริเวณโลคัส Gram42, Gram45, Gpa11, Gpa12, Gpa14 และ Gpa32

หมายเลขตัวอย่าง	ขนาดอัลลีล (bp)							
	Gram42	Gram45	Gpa11	Gpa12	Gpa14	Gpa32		
8	166	262	196, 204	205	368, 408	176		
9	160	262	192, 208	197, 205	380, 384	176, 186		
10	166	262	192	209, 213	356, 364	176, 184		
11	166	262	196, 200	213	384, 444	176		
12	166	262	192, 196	205, 213	380	176, 186		
13	166	262	196, 200	205	380, 444	176, 186		
14	160, 166	262	192, 208	197, 205	380	176, 184		
15	160, 166	262	192, 204	205	384, 388	176		
16	166	262	192, 196	205, 213	380	176, 186		
34	166	262	192, 200	203, 213	384, 428	176, 178		
36	166	262	192, 196	205, 213	380, 384	176, 186		
17	166	262	188	205, 213	380, 440	176		
18	166	262	200, 204	-	368, 384	176, 178		
19	160, 166	262	184, 200	197, 205	372, 376	176		
20	166	262	180, 188	205	356, 408	176, 178		

ตารางที่ 5 (ต่อ)

หมายเลขตัวอย่าง	ขนาดดีลิต (bp)							
	Gram42	Gram45	Gpa11	Gpa12	Gpa14	Gpa32		
21	166	262	204, 208	205, 209	332, 356	176, 186		
22	166	262, 264	204, 208	205, 209	356, 444	176, 186		
23	166	262	196, 204	205	368, 376	176		
24	166	262, 264	204, 208	205, 209	372, 444	176		
25	166	262, 264	188, 204	205	428, 460	178, 184		
26	160, 166	262	180, 200	205	376, 408	176		
27	166	262	188, 192	197, 205	364, 452	176, 186		
28	166	262	192, 200	197, 213	392, 408	176		
29	166	262, 264	188, 208	201, 209	356, 444	170, 176		
30	166	262	184, 208	209, 217	356, 412	176, 178		
31	166	262, 264	188, 204	205	364, 372	176		
32	166	262, 264	204, 208	205	376, 444	176		
33	160, 166	262	188, 200	205	376, 428	176, 184		

หมายเหตุ: - คือ ไม่แสดงผล เนื่องจากปริมาณดีเอ็นเอไม่เพียงพอที่จะใช้ในการวิเคราะห์ผล

**ตารางที่ 6** ขนาดของอัลลีลที่ได้ในแต่ละตัวอย่างจากการวิเคราะห์ผล genotyping บริเวณโลคัส Gpa33, Gpa34, Gpa35, Gpa36, Gpa37 และ Gpa38

หมายเลขตัวอย่าง	ขนาดอัลลีล (bp)							
	Gpa33	Gpa34	Gpa35	Gpa36	Gpa37	Gpa38		
8	108, 112	238, 268	174, 176	224	340, 344	188, 192		
9	100, 112	226, 244	170, 184	220, 232	396, 400	192		
10	92, 112	238, 250	170, 172	212	268, 404	192, 196		
11	112, 116	225, 250	170	212, 228	388, 392	188		
12	112	226, 238	168, 170	212, 220	392, 404	188, 192		
13	112	226, 238	168, 170	220, 228	352, 392	188, 192		
14	96, 108	232, 244	170	216, 224	372, 376	188, 192		
15	100, 108	238, 262	170	220, 240	376, 380	184, 196		
16	104, 112	226, 238	170, 172	212, 220	392, 404	188, 192		
34	104, 116	226, 238	-	220, 232	324, 328	188, 192		
36	104, 116	226, 244	168, 170	220, 228	352, 376	188, 192		
17	104, 108	232, 262	172, 184	224, 232	320, 324	188, 192		
18	90, 104	256, 262	170, 176	212, 220	348, 352	188, 192		
19	108, 116	244, 268	170, 172	216, 224	340, 344	188		
20	108, 112	268	170, 174	212, 224	292, 328	188, 192		

ตารางที่ 6 (ต่อ)

หมายเลขตัวอย่าง	ขนาดอัลลีล (bp)							
	Gpa33	Gpa34	Gpa35	Gpa36	Gpa37	Gpa38		
21	108, 116	256, 268	170, 174	232, 236	324, 328	188, 192		
22	104, 108	250, 256	170, 174	232, 236	320, 324	188, 192		
23	108, 112	256, 268	172, 176	224	340, 364	188, 192		
24	100, 104	250, 256	172, 174	232, 236	332, 336	188		
25	112, 116	232, 268	174, 176	212, 232	328, 332	188, 192		
26	108, 116	238, 268	170, 174	224	292, 380	188, 192		
27	100, 104	232, 244	170, 172	216, 228	416, 420	188, 192		
28	104, 108	238, 244	170	212, 232	384, 388	188, 196		
29	100, 108	232, 256	170, 174	232, 236	332, 336	188, 192		
30	104	262, 280	168, 170	220, 228	336, 344	188, 192		
31	108, 112	226, 262	170, 184	220, 240	348, 352	188, 192		
32	100, 108	232, 250	168, 170	220, 232	312, 316	188, 192		
33	108, 112	232, 268	170, 176	224, 232	292, 328	188, 192		

หมายเหตุ: - คือ ไม่แสดงผล เนื่องจากปริมาณดีเอ็นเอไม่เพียงพอที่จะใช้ในการวิเคราะห์ผล

**ตารางที่ 7** ขนาดของอัลลีลที่ได้ในแต่ละตัวอย่างจากการวิเคราะห์ผล genotyping บริเวณโลคัส Gpa39 และ Gpa41

หมายเลขตัวอย่าง	ขนาดอัลลีล (bp)	
	Gpa39	Gpa41
8	106, 110	416, 456
9	98, 102	382, 402
10	106, 114	402, 424
11	110, 114	408, 412
12	114	382, 412
13	110	382, 408
14	102, 114	298, 386
15	102, 114	394, 464
16	110, 114	294, 412
34	110, 114	386, 402
36	110	382, 408
17	98, 106	402, 420
18	106, 110	370, 420
19	110, 118	416
20	102, 110	416, 456
21	110, 118	390

หมายเลขตัวอย่าง	ขนาดอัลลีล (bp)	
	Gpa39	Gpa41
21	110, 118	390
22	110, 114	390, 444
23	110, 114	416, 456
24	114	394, 420
25	98, 102	408, 484
26	110, 114	416, 456
27	110, 114	428, 476
28	110	436, 468
29	114	390, 444
30	110	420, 480
31	98, 106	382, 394
32	114	444, 468
33	102, 110	456, 484

#### 4.4 ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ไมโครแซทเทลไลท์ (microsatellite product)

ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม MEGA เวอร์ชัน 6.0 ให้ผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ซ้ำกัน และ จำนวนชุดซ้ำในตำแหน่งไมโครแซทเทลไลท์ โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ซ้ำกันของทั้ง 28 โลไซม์ทั้งลำดับที่เหมือนและแตกต่างกันในแต่ละโลคัส โดยมีลำดับการซ้ำกันตั้งแต่ 2 นิวคลีโอไทด์ ได้แก่  $(TG)_n(TA)_n$  และ  $(GT)_n$ , 3 นิวคลีโอไทด์ ได้แก่  $(GTT)_n$  และ  $(CTT)_n$ , 4 นิวคลีโอไทด์ ได้แก่  $(AGAT)_n$ ,  $(AGGT)_n$ ,  $(CTTT)_n$ ,  $(GTTT)_n$ ,  $(AAGG)_n$ ,  $(AAAC)_n$ ,  $(ATTG)_n$ ,  $(GATA)_n$ ,  $(TTTC)_n$ , และ  $(CTAT)_n$ , 6 นิวคลีโอไทด์ ได้แก่  $(TTTCTC)_n$  และ มีลำดับการซ้ำของนิวคลีโอไทด์เป็นชุด ได้แก่  $(TTTC)_n(TC)_n(TTTC)_n$  และ  $(TTTC)_n(TC)_n(TTTC)_n(TC)_n(TTTC)_n$  โดยภายในตำแหน่งเดียวกันจะมีจำนวนชุดการซ้ำที่เหมือนหรือแตกต่างกันออกไป โดยจะขึ้นอยู่กับขนาดอัลลีลของแต่ละตัวอย่าง ดังแสดงในตารางที่ 8

จากผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของนกกระเรียนพันธุ์ไทยในทุกโลไซม์พบว่า มีรูปแบบการซ้ำของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนและแตกต่างกับการศึกษาใน whooping crane (Jones et al., 2010a) และ blue crane (Meares et al., 2008) โดยโลไซม์ที่แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างจากการศึกษาใน whooping crane มี 9 โลไซม์ ได้แก่ Gram8, Gram20, Gram22, Gram24, Gram31, Gram32a, Gram41, Gram42 และ Gram45 และใน blue crane มี 7 โลไซม์ ได้แก่ Gpa14, Gpa33, Gpa35, Gpa36, Gpa37, Gpa38 และ Gpa41 ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งไมโครแซทเทลไลท์ของนกแต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน

**ตารางที่ 8** ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ซ้ำกัน จำนวนชุดซ้ำของนิวคลีโอไทด์ที่มากที่สุด ขนาดของอัลลีลและรูปแบบไพรเมอร์ของทั้ง 28 โลไซ

โลคัส	รูปแบบการซ้ำ	ขนาดอัลลีล (bp)	รูปแบบไพรเมอร์
Gram6	(AGGT) <sub>8</sub> (AGAT) <sub>10</sub>	234–258	Polymorphism
Gram8	(AGAT) <sub>2</sub> (AGGT) <sub>10</sub> (AGAT) <sub>14</sub>	384–436	Polymorphism
Gram11	(AGAT) <sub>18</sub>	246–286	Polymorphism
Gram17	(CTTT) <sub>13</sub>	365–381	Polymorphism
Gram20	(CTTT) <sub>18</sub>	376–404	Polymorphism
Gram22	(GTTT) <sub>9</sub>	161–169	Polymorphism
Gram24	(GTTT) <sub>5</sub>	357	Monomorphism
Gram25	(GTTT) <sub>3</sub>	161	Monomorphism
Gram30	(AAGG) <sub>18</sub>	161–193	Polymorphism
Gram31	(AAAC) <sub>4</sub>	259	Monomorphism
Gram32a	(ATTG) <sub>7</sub>	238–246	Polymorphism
Gram41	(GTT) <sub>4</sub> ...(GTT) <sub>2</sub>	264	Monomorphism
Gram42	(GTT) <sub>6</sub>	160–166	Polymorphism
Gram45	(CTT) <sub>7</sub>	262–265	Polymorphism
Gpa11	(TTTC) <sub>21</sub>	180–208	Polymorphism
Gpa12	(GATA) <sub>11</sub>	197–217	Polymorphism
Gpa14	(TTTC) <sub>15</sub> (TC) <sub>3</sub> (TTTC) <sub>3</sub>	332–460	Polymorphism
Gpa32	(GT) <sub>14</sub>	170–186	Polymorphism
Gpa33	(TTTC) <sub>14</sub>	92–116	Polymorphism
Gpa34	(TTTCTC) <sub>16</sub>	225–280	Polymorphism

ตารางที่ 8 (ต่อ)

โลคัส	รูปแบบการซ้ำ	ขนาดอัลลีล (bp)	รูปแบบพหุเมอริ
Gpa35	(TG) <sub>12</sub> (TA) <sub>4</sub>	168–184	Polymorphism
Gpa36	(GATA) <sub>13</sub>	212–240	Polymorphism
Gpa37	(TTTC) <sub>31</sub>	268–420	Polymorphism
Gpa38	(CTAT) <sub>12</sub>	184–196	Polymorphism
Gpa39	(GATA) <sub>13</sub>	98–118	Polymorphism
Gpa41	(TTTC) <sub>13</sub> (TC) <sub>2</sub> (TTTC) <sub>2</sub> (TC) <sub>2</sub> (TTTC) <sub>2</sub>	294–484	Polymorphism
Gpa01	Not determined		Monomorphism
Gpa24	Not determined		Monomorphism



#### 4.5 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรม

การวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรมของนกกระเรียนพันธุ์ไทยแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มการวิเคราะห์ คือ

4.5.1 การวิเคราะห์ผลด้วย polymorphic loci จาก whooping crane จำนวน 10 โลไซ และจาก blue crane จำนวน 4 โลไซ คือ Gpa12, Gpa33, Gpa34 และ Gpa35 เพื่อตรวจสอบว่าผลการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์จากนกในสกุลเดียวกัน และนกต่างสกุลจะให้ผลการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมเป็นอย่างไร

4.5.2 การวิเคราะห์ผลด้วย polymorphic loci จาก blue crane จำนวน 12 โลไซ เพื่อตรวจสอบว่าการนำเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์จากนกต่างสกุลมาใช้ทั้งหมด จะให้ผลการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมเป็นอย่างไร

4.5.3 การวิเคราะห์ผลด้วย polymorphic loci จาก whooping crane จำนวน 10 โลไซ และ blue crane จำนวน 12 โลไซ เพื่อตรวจสอบว่าหากนำเครื่องหมายทางพันธุกรรมทั้งหมดของนกในสกุลเดียวกันและต่างสกุลมาใช้รวมกัน ผลการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมจะเป็นอย่างไร

โดยผลการศึกษาที่ได้มีดังนี้

##### 4.5.1 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลด้วย polymorphic loci จาก whooping crane จำนวน 10 โลไซ และจาก blue crane จำนวน 4 โลไซ คือ Gpa12, Gpa33, Gpa34 และ Gpa35

เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ทั้ง 14 โลไซ ที่แสดง polymorphism ได้นำมาใช้ในการวิเคราะห์ค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกกระเรียนพันธุ์ไทยในสภาพกรงเลี้ยง โดยแต่ละค่าแสดงผลดังนี้

##### 1. ค่า large allele dropout

จากผลการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Micro-Checker พบว่าไม่มีการปรากฏ large allele dropout ในทุกโลไซ แสดงว่าโอกาสในการเพิ่มปริมาณไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอของอัลลีลที่มีขนาดเล็กและขนาดใหญ่ในทุกโลไซมีเท่า ๆ กัน

##### 2. ค่า linkage disequilibrium (LD)

จากผลการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม FSTAT พบว่ามีคู่ของโลไซที่แสดงค่า  $p$ -value  $< 0.01$  ซึ่งบ่งบอกการปรากฏ LD จำนวน 4 คู่ ได้แก่ Gram6-Gpa35 ( $p = 0.003$ ), Gram11-Gpa12 ( $p = 0.000$ ), Gram30-Gpa12 ( $p = 0.010$ ) และ Gpa12-Gpa34 ( $p = 0.002$ ) แต่เนื่องจากผลที่ได้ยังไม่สามารถระบุได้แน่ชัดว่าที่โลคัสใดเป็นตำแหน่งที่มีการปรากฏ LD ที่แท้จริง ดังนั้นในขั้นตอนต่อไป

ผู้วิจัยจึงทำการวิเคราะห์ผลใหม่ โดยตั้งสมมติฐานว่าโลคัส Gram6, Gram11, Gram30, Gpa12, Gpa34 หรือ Gpa35 มีแนวโน้มการพบค่า  $p$ -value น้อยกว่า 0.01 จึงได้แบ่งกลุ่มการวิเคราะห์เป็น 8 กลุ่ม ดังนี้

2.1 วิเคราะห์ค่า LD ของทุกโลไซ แต่ตัดโลคัส Gram6 ออกจากการวิเคราะห์

ผลการวิเคราะห์พบว่ายังคงมีการปรากฏค่า LD ที่คู่ของโลไซ Gram11-Gpa12 ( $p = 0.000$ ) และ Gpa12-Gpa34 ( $p = 0.003$ )

2.2 วิเคราะห์ค่า LD ของทุกโลไซ แต่ตัดโลคัส Gram11 ออกจากการวิเคราะห์

ผลการวิเคราะห์พบว่ายังคงมีการปรากฏค่า LD ที่คู่ของโลไซ Gram6-Gpa35 ( $p = 0.002$ ) และ Gpa12-Gpa34 ( $p = 0.002$ )

2.3 วิเคราะห์ค่า LD ของทุกโลไซ แต่ตัดโลคัส Gram30 ออกจากการวิเคราะห์

ผลการวิเคราะห์พบว่ายังคงมีการปรากฏค่า LD ที่คู่ของโลไซ Gram6-Gpa35 ( $p = 0.004$ ), Gram11-Gpa12 ( $p = 0.000$ ) และ Gpa12-Gpa34 ( $p = 0.003$ )

2.4 วิเคราะห์ค่า LD ของทุกโลไซ แต่ตัดโลคัส Gpa12 ออกจากการวิเคราะห์

ผลการวิเคราะห์พบว่ายังคงมีการปรากฏค่า LD ที่คู่ของโลไซ Gram6-Gpa35 ( $p = 0.003$ )

2.5 วิเคราะห์ค่า LD ของทุกโลไซ แต่ตัดโลคัส Gpa34 ออกจากการวิเคราะห์

ผลการวิเคราะห์พบว่ายังคงมีการปรากฏค่า LD ที่คู่ของโลไซ Gram6-Gpa35 ( $p = 0.003$ ), Gram11-Gpa12 ( $p = 0.000$ ) และ Gram30-Gpa12 ( $p = 0.010$ )

2.6 วิเคราะห์ค่า LD ของทุกโลไซ แต่ตัดโลคัส Gpa35 ออกจากการวิเคราะห์

ผลการวิเคราะห์พบว่ายังคงมีการปรากฏค่า LD ที่คู่ของโลไซ Gram11-Gpa12 ( $p = 0.000$ ) และ Gram30-Gpa12 ( $p = 0.010$ )

2.7 วิเคราะห์ค่า LD ของทุกโลไซ แต่ตัดโลคัส Gram6, Gram11 และ Gram30 (เครื่องหมาย ไมโครแซทเทลไลท์ที่ออกแบบมาจากจีโนมของ whooping crane) ออกจากการวิเคราะห์

ผลการวิเคราะห์พบว่ายังคงมีการปรากฏค่า LD ที่คู่ของโลไซ Gpa12-Gpa34 ( $p = 0.003$ )

2.8 วิเคราะห์ค่า LD ของทุกโลไซ แต่ตัดโลคัส Gpa12, Gpa34 และ Gpa35 (เครื่องหมาย ไมโครแซทเทลไลท์ที่ออกแบบมาจากจีโนมของ blue crane) ออกจากการวิเคราะห์

ผลการวิเคราะห์พบว่าไม่มีการปรากฏค่า LD ในทุกคู่โลไซ จากผลดังกล่าวทำให้สามารถสรุปได้ว่าโลคัส Gpa12, Gpa34 และ Gpa35 เป็นตำแหน่งที่ปรากฏ LD ซึ่งโลคัส Gpa12 เป็นตำแหน่งที่พบการปรากฏ LD ในการวิเคราะห์ผลของการศึกษาใน blue crane เช่นกัน (Meares et al., 2008) ดังนั้นทั้ง 3 โลไซจึงไม่เหมาะที่จะนำไปใช้ในการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม

ต่อไป เพราะจะทำให้เกิด pseudo-replication ได้ (Selkoe and Toonen, 2006) กล่าวคือ เมื่อนำ 2 โลไซที่แตกต่างกัน แต่เสมือนเป็นโลคัสเดียวกันเพราะเกิดการแยกกันอย่างไม่มีอิสระของอัลลีลต่าง โลคัสมาใช้วิเคราะห์ผล จะทำให้การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม (heterozygosity) มีความคลาดเคลื่อนกับค่าที่ควรจะเป็นจริง ยกตัวอย่างเช่น โลคัส A และ โลคัส B เป็นตำแหน่งที่แยกกันอย่างไม่มีอิสระบนโครโมโซม ถ้าผู้วิจัยเลือกใช้ทั้ง 2 โลไซในการวิเคราะห์ค่า heterozygosity พบว่าที่โลไซ A และ B แสดงค่า heterozygosity ต่ำกว่าความเป็นจริง หรือเกิดการเพิ่มขึ้นของ homozygous allele มากเกินไป (homozygote excess) จึงทำให้ผลการวิเคราะห์เกิดความผิดพลาดหากเลือกใช้ทั้ง 2 โลไซเป็นเครื่องหมายทางพันธุกรรม ดังนั้นเพื่อหลีกเลี่ยงเหตุการณ์ดังกล่าว การพิจารณาโลไซที่จะใช้ในการวิเคราะห์ผลต้องมีการตรวจสอบค่า  $p$ -value ที่แสดงการปรากฏ LD ทุกครั้ง จากผลการพิจารณาข้างต้นจะสังเกตได้ว่าสัดส่วนโลคัสที่แสดง LD เป็นเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ที่ออกแบบมาจากจีโนมของ blue crane ทั้งหมด ซึ่งเป็นนกอพยพต่างสกุลกับนกอพยพพันธุ์ไทย

จากการพิจารณาการปรากฏ LD ที่ได้กล่าวไปข้างต้นทำให้สรุปได้ว่าโลคัส Gpa12, Gpa34 และ Gpa35 ต้องถูกตัดออกจากการเป็นเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ที่จะนำไปวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกอพยพพันธุ์ไทยต่อไป

### 3. ค่าการเบี่ยงเบนออกจากสมมติ Hardy-Weinberg (HWE $p$ -value) และ null allele frequency (NAF)

จากการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรนกอพยพพันธุ์ไทยโดยการแยกพื้นที่และรวมพื้นที่การศึกษา พบว่าทั้ง 2 การวิเคราะห์พบการเบี่ยงเบนออกจากสมมติ Hardy-Weinberg ที่บริเวณโลคัส Gram8 (ตารางที่ 9 และ 10) ซึ่งเป็นโลคัสเดียวกันที่เกิดการเบี่ยงเบนออกจากสมมติ Hardy-Weinberg ในการวิเคราะห์ผลของ whooping crane และ Florida sandhill crane ด้วย (Jones et al., 2010a) เหตุผลหลักของการเกิดการเบี่ยงเบนจากสมมติ Hardy-Weinberg มักเกิดจากการลดลงของอัลลีลแบบ heterozygous (heterozygote deficit) (Selkoe and Toonen, 2006) โดยสามารถสังเกตได้จากค่า heterozygosity โดยค่า  $H_0$  จะมีค่าต่ำกว่าค่า  $H_E$  อย่างมาก กล่าวคือ เมื่อพิจารณาค่า heterozygosity ของประชากรนกจากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว พบว่าได้ค่า  $H_0 = 0.36$ ,  $H_E = 0.74$  และเมื่อพิจารณาที่ประชากรนกจากสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระพบว่าได้ค่า  $H_0 = 0.47$ ,  $H_E = 0.77$  (ตารางที่ 9) และเมื่อพิจารณาที่ประชากรทั้ง 2 พื้นที่พบว่าได้ค่า  $H_0 = 0.42$ ,  $H_E = 0.75$  (ตารางที่ 10) นอกจากนี้การลดลงของอัลลีลแบบ heterozygous ยังเป็นผลมาจากการเกิด null allele ได้อีกด้วย โดยในการศึกษาครั้งนี้พบ null allele เพียงบริเวณเดียว คือที่โลคัส Gram8 ทั้งจากการพิจารณาค่า null allele ของประชากรสวนสัตว์เปิดเขาเขียว

(NAF = 0.196) สถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ (NAF = 0.136) (ตารางที่ 9) และจากทั้ง 2 กลุ่ม ประชากร (NAF = 0.166) (ตารางที่ 10) โดยสาเหตุที่ทำให้เกิด null allele อาจเป็นผลมาจาก 3 สาเหตุ ดังกล่าวต่อไปนี้ (Dakin and Avise, 2004; Kalinowski and Taper, 2006; Selkoe and Toonen, 2006; Strzala et al., 2015)

### 1. คุณภาพหรือปริมาณของ DNA template ต่ำ

จากผลการเพิ่มปริมาณไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ และตรวจสอบขนาดของไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค gel electrophoresis พบว่า total DNA ที่สกัดมาได้ของทุกตัวอย่างสามารถนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้สำเร็จทุกตัวอย่าง (ภาพที่ 14-41; ตารางที่ 3-7) ดังนั้นการตรวจพบ null allele ในการศึกษานี้จึงไม่น่าจะเป็นผลมาจาก DNA ที่มีคุณภาพหรือปริมาณต่ำ

### 2. การเกิด inbreeding

การเกิด inbreeding ซึ่งเป็นการผสมพันธุ์ภายในเครือญาติที่จะเพิ่มโอกาสการเข้าสู่ของ อัลลีลแบบ identical by descent (IBD) จึงทำให้มีการสะสมของอัลลีลแบบ homozygous มากขึ้น หากประชากรมีการเกิด inbreeding จะต้องมีการตรวจพบค่า null allele frequency ในทุกโลไซ แต่จากการศึกษาครั้งนี้พบ null allele frequency เพียงโลคัสเดียวเท่านั้น

### 3. การเกิด sex linkage

Sex linkage คือ ความสัมพันธ์ของอัลลีลบนโลคัสที่ใช้ศึกษากับ sex chromosome โดยโลคัสนั้นอาจจะเป็นตำแหน่งที่อยู่บน sex chromosome หรือ ไม่สามารถแยกอย่างอิสระจาก sex chromosome ได้ หากสิ่งมีชีวิตที่ศึกษาเป็น diploid organism จะมีการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ 2 แบบ คือ homogametic cell และ heterogametic cell โดยถูกกำหนดจากความแตกต่างของ sex chromosome ยกตัวอย่างเช่น สิ่งมีชีวิตจำพวกนกจะมีการกำหนดเพศโดยใช้แท่งโครโมโซม Z และ W หากเป็นเพศผู้จะมีโครโมโซมเพศเป็น ZZ (homogametic) แต่เพศเมียมีโครโมโซมเพศเป็น ZW (heterogametic) และเนื่องจากสารพันธุกรรมที่บรรจุอยู่ในแท่งโครโมโซม Z มีมากกว่า W จึงทำให้มีโอกาสในการตรวจพบอัลลีลที่อยู่บนแท่งโครโมโซม Z เท่านั้น (Dubiec and Zagalska-Neubauer, 2006) ดังนั้นหากผู้วิจัยเลือกใช้ตำแหน่งไมโครแซทเทลไลท์ที่อยู่บน sex chromosome มาใช้ตรวจสอบค่า heterozygosity ของประชากรนกที่มีจำนวนเพศเมียมากกว่าเพศผู้แล้วนั้นจะทำให้มีโอกาสพบอัลลีลแบบ homozygous เกินกว่าความเป็นจริง และค่า  $H_0$  ที่ได้จะมีค่าต่ำกว่า  $H_E$

เพื่อทดสอบสมมติฐานในการพบ null allele จากสาเหตุของ sex linkage ผู้วิจัยได้ทำการวิเคราะห์ค่า heterozygosity ที่โลคัส Gram8 ใหม่ โดยแยกเพศของตัวอย่างเป็นเพศผู้ (homogametic sex: ZZ) และ เพศเมีย (heterogametic sex: ZW) ผลการวิเคราะห์พบว่าค่า  $H_0$

และ  $H_E$  ของนกกระเรียนเทศผู้มีค่าเท่ากับ 0.85 และ 0.82 ตามลำดับ ในขณะที่ค่า  $H_O$  และ  $H_E$  ในนกกระเรียนเทศเมียมีค่าเท่ากับ 0.07 และ 0.69 ตามลำดับ (ตารางที่ 11) จากผลที่ได้จะเห็นว่าค่า  $H_O$  ของนกกระเรียนเทศเมียมีค่าต่ำกว่าค่า  $H_E$  อย่างมาก เมื่อเทียบกับค่า heterozygosity ของโลคัสอื่น ๆ (ตารางที่ 11) ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าการลดลงของอัลลีลแบบ heterozygous ที่ส่งผลต่อการเกิด null allele นั้น เกิดจากสาเหตุของ sex linkage

จากการวิเคราะห์ข้างต้นจะเห็นได้ว่าหากนำโลคัส Gram8 มาใช้วิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรจะทำให้ค่า heterozygosity ที่คำนวณได้มีค่าต่ำกว่าความเป็นจริง ดังนั้นเพื่อไม่ให้เกิดการแปรผลเกิดความผิดพลาด ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยจึงเลือกใช้ตำแหน่งไมโครแซทเทลไลท์ที่ไม่พบ null allele จำนวน 10 โลไซ ได้แก่ โลคัส Gram6, Gram11, Gram17, Gram20, Gram22, Gram30, Gram32a, Gram42, Gram45 และ Gpa33 มาเป็นเครื่องหมายทางพันธุกรรมเพื่อใช้วิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรต่อไป

#### 4.5.1.1 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์จำนวน 10 โลไซ

##### 1. ผลการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกกระเรียนพันธุ์ไทยในพื้นที่สวนสัตว์เปิดเขาเขียว

จากผลการวิเคราะห์พบว่า ค่าเฉลี่ยของ  $N_A$  และ  $A_R$  เท่ากับ 4.2 โดยจำนวนอัลลีลต่อโลคัสที่น้อยที่สุดมีค่าเท่ากับ 1 (Gram45) และจำนวนอัลลีลต่อโลคัสที่สูงที่สุดมีค่าเท่ากับ 8 (Gram20) ค่าเฉลี่ย  $H_E$  เท่ากับ 0.59 โดยมีค่าต่ำสุดเท่ากับ 0.00 (Gram45) และค่าสูงสุดเท่ากับ 0.80 (Gram11 และ Gram30) ค่าเฉลี่ย  $H_O$  เท่ากับ 0.61 โดยมีค่าต่ำสุดเท่ากับ 0.00 (Gram45) และค่าสูงสุดเท่ากับ 1.00 (Gram30) ค่าเฉลี่ย  $F_{IS}$  เท่ากับ -0.030 ซึ่งแสดงว่านกในพื้นที่ของสวนสัตว์เปิดเขาเขียว มีการเกิด inbreeding น้อย โดยผลที่ได้ให้ผลการแปรผลที่ตรงข้ามกับการวิเคราะห์เมื่อรวมโลคัส Gram8 เข้าไป ( $F_{IS} = 0.029$ ) (ตารางที่ 9) ดังนั้นหากนำโลคัสที่แสดง null allele ไปใช้เป็นเครื่องหมายทางพันธุกรรมจะทำให้ผลการแปรผลของข้อมูลได้ค่าที่แตกต่างจากความเป็นจริง

##### 2. ผลการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกกระเรียนพันธุ์ไทยในพื้นที่สถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ

จากผลการวิเคราะห์พบว่า ค่าเฉลี่ยของ  $N_A$  และ  $A_R$  เท่ากับ 5.0 โดยจำนวนอัลลีลต่อโลคัสที่น้อยที่สุดมีค่าเท่ากับ 2 (Gram42 และ Gram45) และจำนวนอัลลีลต่อโลคัสที่สูงที่สุดมีค่าเท่ากับ 8 (Gram20 และ Gram30) ค่าเฉลี่ย  $H_E$  เท่ากับ 0.63 โดยมีค่าต่ำสุดเท่ากับ 0.17 (Gram42) และค่าสูงสุดเท่ากับ 0.84 (Gram30) ค่าเฉลี่ย  $H_O$  เท่ากับ 0.66 โดยมีค่าต่ำสุดเท่ากับ 0.18 (Gram42)

และค่าสูงสุดเท่ากับ 1.00 (Gram30) ค่าเฉลี่ย  $F_{IS}$  เท่ากับ -0.059 (ตารางที่ 9) โดยค่า  $F_{IS}$  ที่ได้แสดงค่าเป็นลบ แสดงว่านกในพื้นที่ของสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระมีการเกิด inbreeding น้อยภายในกลุ่มประชากร

จากค่า heterozygosity ที่ได้จะเห็นได้ว่านกกระเรียนทั้งสองพื้นที่ศึกษามีความหลากหลายทางพันธุกรรมค่อนข้างสูง โดยนกในพื้นที่ของสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงกว่านกในพื้นที่ของสวนสัตว์เปิดเขาเขียวเล็กน้อย ซึ่งอาจเป็นผลจากการพบ unique allele ในพื้นที่ของสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระมากกว่าสวนสัตว์เปิดเขาเขียว โดยพบ unique allele จำนวน 12 อัลลีล จาก 8 โลไซ ได้แก่ Gram6, Gram8, Gram11, Gram17, Gram30, Gram32a, Gram45 และ Gpa33 (ตารางที่ 12) ที่แตกต่างจากพื้นที่สวนสัตว์เปิดเขาเขียวอีกทั้งประชากรทั้งสองกลุ่มยังมีการเกิด inbreeding น้อย

3. ผลการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกกระเรียนพันธุ์ไทยทั้ง 2 พื้นที่การศึกษา (overall population)

จากผลการวิเคราะห์พบว่า ค่าเฉลี่ยของ  $N_A$  มีค่าเท่ากับ 5.3 โดยจำนวนอัลลีลต่อโลคัสที่น้อยที่สุดมีค่าเท่ากับ 2 (Gram42 และ Gram45) และจำนวนอัลลีลต่อโลคัสที่สูงที่สุดมีค่าเท่ากับ 9 (Gram11) ค่าเฉลี่ยของ  $A_R$  เท่ากับ 4.5 โดยมีค่าต่ำสุดคือ 1.9 (Gram45) และ ค่าสูงสุดคือ 7.3 (Gram30) ค่าเฉลี่ยของ  $H_E$  เท่ากับ 0.61 โดยมีค่าต่ำสุดเท่ากับ 0.15 (Gram45) และค่าสูงสุดเท่ากับ 0.82 (Gram30) ค่าเฉลี่ย  $H_O$  เท่ากับ 0.64 โดยมีค่าต่ำสุดเท่ากับ 0.18 (Gram42 และ Gram45) และค่าสูงสุดเท่ากับ 1.00 (Gram30) (ตารางที่ 10) จากค่า  $H_O$  และ  $H_E$  ที่ได้แสดงว่าประชากรนกกระเรียนจากสวนสัตว์เปิดเขาเขียวและสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ มีความหลากหลายทางพันธุกรรมค่อนข้างสูง เมื่อเปรียบเทียบกับค่า  $H_O$  กับนกกระเรียนชนิดอื่น ๆ เช่น จาก whooping crane ( $H_O$ : 0.04–0.79,  $\bar{X}$  = 0.46) (Jones et al., 2010a) sandhill crane ( $H_O$ : 0.22–0.98,  $\bar{X}$  = 0.55) (Henkel et al., 2012) และ red-crowned crane ( $H_O$ : 0.21–0.59,  $\bar{X}$  = 0.47 island population;  $H_O$ : 0.54–0.96,  $\bar{X}$  = 0.70 mainland population) (Hasegawa et al., 2000) แต่มีค่าต่ำกว่าเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับ blue crane ( $H_O$ : 0.50–0.95,  $\bar{X}$  = 0.76) (Meares et al., 2008) และ Siberian crane ( $H_O$ : 0.53–0.93,  $\bar{X}$  = 0.74) (Mudrik et al., 2014) นอกจากนี้ยังพบว่าค่า  $F_{ST}$  ของประชากรทั้งหมด เท่ากับ 0.023 ซึ่งมีค่าเข้าใกล้ศูนย์ แสดงว่าประชากรนกกระเรียนทั้ง 2 พื้นที่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมน้อย และค่าเฉลี่ย  $F_{IS}$  เท่ากับ -0.048 แสดงว่าประชากรนกกระเรียนมีการเกิด inbreeding ระหว่างประชากรน้อย

#### 4. ผลการวิเคราะห์จำนวนกลุ่มประชากรย่อย ( $K$ value) ด้วยโปรแกรม STRUCTURE

ผลการคำนวณกลุ่มประชากรย่อยตั้งแต่  $K = 1$  ถึง  $K = 5$  พบว่าได้ค่าเฉลี่ยของ  $\ln P(D)$  เท่ากับ -727.4, -806.9, -791.5, -747.4 และ -753.0 ตามลำดับ (ตารางที่ 13) แสดงว่ากลุ่มประชากรย่อยที่เหมาะสมสำหรับการศึกษาคั้งนี้คือ  $K = 1$  (ภาพที่ 44) เพราะมีค่าเฉลี่ยของ  $\log$  likelihood สูงที่สุด โดยมีค่า  $\ln P(D)$  เท่ากับ -727.4 แสดงว่าประชากรนกระเรียนพันธุ์ไทยจากสวนสัตว์เปิดเขาเขียวและสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ ไม่ได้แยกเป็นกลุ่มประชากรย่อย ซึ่งค่า  $K$  ที่ได้สอดคล้องกับค่า  $F_{ST}$  ที่บ่งบอกว่าประชากรทั้ง 2 พื้นที่การศึกษามีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมน้อย ( $F_{ST} = 0.023$ )



**ตารางที่ 9** ค่าการวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรมของประชากรนกกระเรียนพันธุ์ไทยในสภาพกรงเลี้ยงในแต่ละพื้นที่ของสวนสัตว์เปิดเขาเขียว (KKOZ) และสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ (BB) ด้วย polymorphic loci จำนวน 10 โลไค

โลคัส	KKOZ						BB									
	N	N <sub>A</sub>	A <sub>R</sub>	H <sub>E</sub>	H <sub>O</sub>	F <sub>IS</sub>	HWE p-value	NAF	N	N <sub>A</sub>	A <sub>R</sub>	H <sub>E</sub>	H <sub>O</sub>	F <sub>IS</sub>	HWE p-value	NAF
Gram6	11	4.0	4.0	0.75	0.73	0.030	0.675	0.025	17	6.0	5.9	0.79	0.76	0.035	0.492	0.000
Gram8	11	6.0	6.0	0.74	0.36	0.506	0.005*	0.196	17	6.0	5.9	0.77	0.47	0.389	0.007*	0.136
Gram11	11	6.0	6.0	0.80	0.82	-0.017	0.227	0.022	17	7.0	6.8	0.80	0.76	0.046	0.434	0.000
Gram17	11	4.0	4.0	0.63	0.82	-0.304	0.428	0.000	17	5.0	4.9	0.76	0.82	-0.085	0.507	0.000
Gram20	11	8.0	8.0	0.74	0.82	-0.111	0.500	0.000	16	8.0	8.0	0.76	0.75	0.014	0.400	0.000
Gram22	11	3.0	3.0	0.56	0.45	0.187	0.293	0.047	17	3.0	3.0	0.58	0.65	-0.107	0.863	0.000
Gram30	11	6.0	6.0	0.80	1.00	-0.243	0.715	0.000	17	8.0	7.9	0.84	1.00	-0.190	0.218	0.000
Gram32a	11	2.0	2.0	0.53	0.45	0.138	1.000	0.030	17	3.0	2.9	0.47	0.41	0.125	0.717	0.030
Gram42	11	2.0	2.0	0.32	0.18	0.429	0.279	0.112	17	2.0	2.0	0.17	0.18	-0.067	1.000	0.000
Gram45	11	1.0	1.0	0.00	0.00	NA	NA	0.000	17	2.0	2.0	0.30	0.35	-0.185	1.000	0.000
Gpa33	11	6.0	6.0	0.79	0.82	-0.040	0.720	0.000	17	6.0	5.9	0.79	0.94	-0.193	0.279	0.000
Average	11	4.4	4.4	0.61	0.59	0.029			16.9	5.1	5.1	0.64	0.64	-0.010		
Averaget	11	4.2	4.2	0.59	0.61	-0.030			16.9	5.0	5.0	0.63	0.66	-0.059		



**ตารางที่ 10** ค่าการวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรมของประชากรนกกระเรียนพันธุ์ไทยในสภาพทรงเลี้ยงของสวนสัตว์เปิดเขาเขียวและสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกก้น้ำบางพระ (overall population) ด้วย polymorphic loci จำนวน 10 โลไคส์

โลคัส	$N_A$	$A_R$	$H_E$	$H_O$	$F_{ST}$	$F_{IS}$	HWE $p$ -value	NAF
Gram6	6.0	5.0	0.77	0.75	-0.011	0.033	0.701	0.012
Gram8	7.0	6.1	0.75	0.42	0.055	0.434	0.0003*	<b>0.166</b>
Gram11	9.0	6.6	0.80	0.79	0.015	0.021	0.319	0.011
Gram17	5.0	4.5	0.69	0.82	0.009	-0.160	0.575	0.000
Gram20	8.0	6.8	0.75	0.78	-0.011	-0.036	0.549	0.000
Gram22	3.0	2.9	0.57	0.55	-0.011	0.004	0.597	0.024
Gram30	8.0	7.3	0.82	1.00	0.081	-0.210	0.473	0.000
Gram32a	3.0	2.4	0.50	0.43	0.032	0.130	0.955	0.030
Gram42	2.0	1.9	0.24	0.18	-0.006	0.204	0.635	0.056
Gram45	2.0	1.9	0.15	0.18	0.123	-0.179	NA	0.000
Gpa33	7.0	5.7	0.79	0.88	0.043	-0.134	0.522	0.000
ค่าเฉลี่ย	5.5	4.7	0.62	0.62	0.027	0.005		
ค่าเฉลี่ย†	5.3	4.5	0.61	0.64	0.023	-0.048		

หมายเหตุ:

$N_A$ : จำนวนของอัลลีลต่อโลคัส

$A_R$ : ค่า allelic richness

$H_E$ : ค่า expected heterozygosity

$H_O$ : ค่า observed heterozygosity

$F_{ST}$ : ค่า fixation index

$F_{IS}$ : ค่า inbreeding coefficient

HWE  $p$ -value: ค่าความน่าจะเป็นที่จะเข้าสู่สมมูลของ Hardy-Weinberg เมื่อ  $p > 0.05$

NAF: ค่า null allele frequency

\*: พบการเบี่ยงเบนออกจากสมมูล Hardy-Weinberg อย่างมีนัยสำคัญ

ตัวหนา: โลคัสที่พบ NAF

†: การวิเคราะห์ผลโดยไม่รวมโลคัส Gram8

ตารางที่ 11 ค่า  $H_E$  และ  $H_O$  และ Fisher's Exact Test probability ของนกกระเรียนพันธุ์ไทยเพศผู้ และเพศเมียเมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์จาก whooping crane และ Gpa33

โลคัส	เพศเมีย		เพศผู้		ค่า <i>p</i> -value
	$H_E$	$H_O$	$H_E$	$H_O$	
Gram6	0.75	0.73	0.80	0.77	1.000
<b>Gram8</b>	<b>0.69</b>	<b>0.07</b>	<b>0.82</b>	<b>0.85</b>	<b>0.000*</b>
Gram11	0.80	0.87	0.82	0.69	0.372
Gram17	0.76	0.73	0.59	0.92	0.333
Gram20	0.78	0.80	0.75	0.75	1.000
Gram22	0.61	0.40	0.52	0.54	1.000
Gram30	0.85	1.00	0.85	1.00	1.000
Gram32a	0.46	0.46	0.42	0.38	0.718
Gram42	0.35	0.27	0.08	0.08	0.333
Gram45	0.13	0.13	0.24	0.31	0.372
Gpa33	0.77	0.80	0.84	1.00	0.226

หมายเหตุ: ตัวหนา คือ ค่า heterozygosity ที่บ่งบอกการเกิด sex linkage

\* คือ ความแตกต่างระหว่างค่า  $H_E$  และ  $H_O$  ของนกเพศผู้และเมีย เมื่อใช้ Fisher's Exact Test

ตารางที่ 12 ความถี่ของ unique allele ที่พบในพื้นที่สวนสัตว์เปิดเขาเขียว (KKOZ) หรือ สถานีวิจัย  
เพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ (BB)

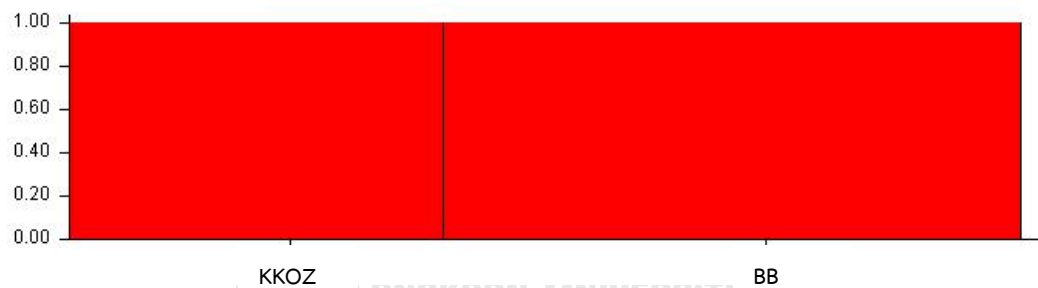
โลคัส	ขนาดอัลลีล (bp)	ความถี่อัลลีล	สถานที่พบ
Gram6	250	0.04	BB
Gram6	258	0.02	BB
Gram8	408	0.04	BB
Gram8	432	0.04	KKOZ
Gram11	246	0.05	KKOZ
Gram11	266	0.04	BB
Gram11	270	0.02	BB
Gram11	278	0.02	KKOZ
Gram11	286	0.02	BB
Gram17	365	0.04	BB
Gram30	161	0.05	BB
Gram30	165	0.04	BB
Gram32a	246	0.02	BB
Gram45	265	0.11	BB
Gpa33	92	0.02	BB
Gpa33	96	0.02	KKOZ

**ตารางที่ 13** ค่า log likelihood (Ln P(D)) จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม STRUCTURE ที่  $K = 1$  ถึง  $K = 5$  ด้วย polymorphic loci จำนวน 10 โลไซ

จำนวนซ้ำ	ค่า Ln P(D)				
	$K = 1$	$K = 2$	$K = 3$	$K = 4$	$K = 5$
1	<b>-727.4</b>	-735.5	-805.4	-741.4	-735.0
2	<b>-727.2</b>	-833.3	-790.2	-778.7	-775.9
3	<b>-727.8</b>	-866.5	-778.5	-743.2	-765.8
4	<b>-727.2</b>	-774.7	-792.8	-742.2	-728.2
5	<b>-727.5</b>	-824.5	-790.4	-731.3	-760.1
ค่าเฉลี่ย	<b>-727.4</b>	-806.9	-791.5	-747.4	-753.0

หมายเหตุ: ตัวหนา คือ ค่า log likelihood หรือ Ln P(D) ที่มีค่าสูงที่สุด

Proportion of each cluster



**ภาพที่ 44** ผลการวิเคราะห์ genetic clustering ที่แสดง  $K = 1$  ซึ่งได้จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม STRUCTURE ด้วย polymorphic loci จำนวน 10 โลไซ โดยแต่ละตัวอย่างของพื้นที่ KKOZ และ BB จะแสดงด้วยเส้น vertical line ซึ่งจะมีการแบ่งเป็นสีตามจำนวนของค่า  $K$  ที่ประเมินได้

หมายเหตุ      แกน X คือ พื้นที่การศึกษา

                  แกน Y คือ สัดส่วนของค่า  $K$  ที่ประเมินผ่านความถี่ของอัลลีล

                  KKOZ คือ สวนสัตว์เปิดเขาเขียว    BB คือ สถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ

#### 4.5.2 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลด้วย polymorphic loci จาก blue crane จำนวน 12 โลโซ

เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ทั้ง 12 โลโซ ที่แสดง polymorphism ได้นำมาใช้ในการวิเคราะห์ค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกกระเรียนพันธุ์ไทยในสภาพกรงเลี้ยง โดยแต่ละค่าแสดงผลดังนี้

##### 1. ค่า large allele dropout

ไม่มีการปรากฏค่า large allele dropout ในทุกโลโซ

##### 2. ค่า null allele frequency (NAF)

ไม่มีการปรากฏค่า NAF ในทุกโลโซของการวิเคราะห์ทั้งแบบแยกและรวมประชากรของสวนสัตว์เปิดเขาเขียวและสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ (ตารางที่ 14 และ 15) รวมทั้งไม่พบการเกิด sex linkage ในทุกโลโซอีกด้วย เนื่องจากค่า  $H_0$  และ  $H_E$  ของนกเพศผู้และเพศเมียไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 16)

##### 3. ค่า linkage disequilibrium (LD)

จากผลการวิเคราะห์พบการปรากฏของ LD จำนวน 5 คู่ ได้แก่ Gpa12-Gpa34 ( $p = 0.002$ ), Gpa12-Gpa11 ( $p = 0.001$ ), Gpa35-Gpa41 ( $p = 0.004$ ), Gpa11-Gpa36 ( $p = 0.007$ ) และ Gpa36-Gpa41 ( $p = 0.001$ ) เมื่อทำการวิเคราะห์ผลใหม่โดยตัดโลคัส Gpa12, Gpa34, Gpa35 และ Gpa36 ออก พบว่าไม่มีการปรากฏค่า LD ในทุกคู่โลโซ โดย Gpa12 และ Gpa36 เป็นตำแหน่งที่พบ LD ของการศึกษาใน blue crane เช่นกัน (Meares et al., 2008) แสดงว่าทั้ง 4 โลโซดังกล่าวเป็นตำแหน่งที่มีการปรากฏค่า LD ซึ่งจำเป็นต้องตัดออกจากการวิเคราะห์ผล หรืออาจกล่าวได้ว่ามีเพียง 8 โลโซเท่านั้น คือ Gpa11, Gpa14, Gpa32, Gpa33, Gpa37, Gpa38, Gpa39 และ Gpa41 ที่สามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์ค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกกระเรียนพันธุ์ไทยได้

#### 4.5.2.1 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์จำนวน 8 โลโซ

##### 1. ผลการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกกระเรียนพันธุ์ไทยในพื้นที่สวนสัตว์เปิดเขาเขียว

จากผลการวิเคราะห์ไม่พบการเบี่ยงเบนออกจากสมมติ Hardy-Weinberg ในทุกโลโซ ค่าเฉลี่ยของ  $N_A$  และ  $A_R$  เท่ากับ 7.4 โดยจำนวนอัลลีลต่อโลคัสที่น้อยที่สุดมีค่าเท่ากับ 4 (Gpa32 และ Gpa38) และจำนวนอัลลีลต่อโลคัสที่สูงที่สุดมีค่าเท่ากับ 14 (Gpa37) ค่าเฉลี่ย  $H_E$  เท่ากับ 0.68 โดยมี

ค่าต่ำสุดเท่ากับ 0.55 (Gpa32) และค่าสูงสุดเท่ากับ 0.94 (Gpa37) ค่าเฉลี่ย  $H_O$  เท่ากับ 0.75 โดยมีค่าต่ำสุดเท่ากับ 0.73 (Gpa14, Gpa32 และ Gpa39) และค่าสูงสุดเท่ากับ 1.00 (Gpa37 และ Gpa41) ค่าเฉลี่ย  $F_{IS}$  เท่ากับ -0.097 (ตารางที่ 14)

## 2. ผลการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกกระเรียนพันธุ์ไทยในพื้นที่สถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ

ผลการวิเคราะห์พบการเบี่ยงเบนออกจากสมมติ Hardy-Weinberg ใน 3 โลคัส ได้แก่ Gpa37 ( $p = 0.005$ ), Gpa38 ( $p = 0.004$ ) และ Gpa41 ( $p = 0.000$ ) ค่าเฉลี่ยของ  $N_A$  และ  $A_R$  เท่ากับ 8.7 โดยจำนวนอัลลีลต่อโลคัสที่น้อยที่สุดมีค่าเท่ากับ 3 (Gpa38) และจำนวนอัลลีลต่อโลคัสที่สูงที่สุดมีค่าเท่ากับ 18 (Gpa37) ค่าเฉลี่ย  $H_E$  เท่ากับ 0.69 โดยมีค่าต่ำสุดเท่ากับ 0.49 (Gpa32) และค่าสูงสุดเท่ากับ 0.96 (Gpa37) ค่าเฉลี่ย  $H_O$  เท่ากับ 0.76 โดยมีค่าต่ำสุดเท่ากับ 0.53 (Gpa32) และค่าสูงสุดเท่ากับ 1.00 (Gpa14 และ Gpa37) ค่าเฉลี่ย  $F_{IS}$  เท่ากับ -0.102 (ตารางที่ 14)

จากค่า  $H_O$  และ  $H_E$  ที่ได้แสดงว่านกกระเรียนในพื้นที่สวนสัตว์เปิดเขาเขียวและสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระมีความหลากหลายทางพันธุกรรม (heterozygosity) ค่อนข้างสูง โดยค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกทั้งสองพื้นที่ไม่แตกต่างกันมากนัก แต่จำนวนอัลลีลต่อโลคัสของนกจากสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระมีค่าสูงกว่าสวนสัตว์เปิดเขาเขียวเล็กน้อย นอกจากนี้การเบี่ยงเบนออกจากสมมติ Hardy-Weinberg ยังพบเพียงแคในประชากรของสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระเท่านั้น ซึ่งการเบี่ยงเบนดังกล่าวในโลคัส Gpa41 อาจเป็นผลมาจาก homozygous excess เนื่องจากค่า  $F_{IS}$  ที่ได้มีค่าเป็นบวก ( $F_{IS} = 0.063$ ) ในขณะที่การเบี่ยงเบนที่โลคัส Gpa37 และ Gpa38 อาจเป็นผลมาจาก heterozygous excess เนื่องจากความถี่อัลลีลมีความแตกต่างจากพ่อและแม่ (Rousset and Raymond, 1995) และค่า overall  $F_{IS}$  ที่วิเคราะห์ได้จากประชากรทั้งสองกลุ่มแสดงค่าเป็นลบ แสดงว่าภายในประชากรนกทั้งจากสวนสัตว์เปิดเขาเขียวและสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระมีการเกิด inbreeding น้อย

## 3. ผลการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกกระเรียนพันธุ์ไทยทั้ง 2 พื้นที่การศึกษา (overall population)

จากผลการวิเคราะห์พบการเบี่ยงเบนออกจากสมมติ Hardy-Weinberg ที่โลคัส Gpa38 เพียงตำแหน่งเดียว ( $p = 0.004$ ) ค่าเฉลี่ยของ  $N_A$  มีค่าเท่ากับ 10.4 โดยจำนวนอัลลีลต่อโลคัสที่น้อยที่สุดมีค่าเท่ากับ 4 (Gpa38) และจำนวนอัลลีลต่อโลคัสที่สูงที่สุดมีค่าเท่ากับ 25 (Gpa37) ค่าเฉลี่ยของ  $A_R$  เท่ากับ 7.1 โดยมีค่าต่ำสุดคือ 3.1 (Gpa38) และ ค่าสูงสุดคือ 14.6 (Gpa37) จะเห็นได้ว่าโลคัส Gpa37 และ Gpa41 เป็นตำแหน่งที่มีความหลากหลายของอัลลีลสูง คือมีค่า  $N_A$  เท่ากับ 25 และ 22

อัลลีลต่อโลคัส ตามลำดับ จากผลที่ได้แสดงว่าทั้ง 2 โลไซที่เหมาะสมที่จะใช้เป็น DNA marker ในการระบุตัวอย่าง (individual identification) ของนกกระเรียนพันธุ์ไทยได้ในกรณีที่มีการใช้ตัวอย่างแบบ non-invasive เช่น ตัวอย่างขนที่ร่วงลงบนพื้นดิน หรือตัวอย่างอุจจาระ ในการศึกษาพันธุศาสตร์ประชากร

ค่าเฉลี่ยของ  $H_E$  เท่ากับ 0.69 โดยมีค่าต่ำสุดเท่ากับ 0.51 (Gpa32) และค่าสูงสุดเท่ากับ 0.95 (Gpa37) ค่าเฉลี่ย  $H_O$  เท่ากับ 0.76 โดยมีค่าต่ำสุดเท่ากับ 0.61 (Gpa32) และค่าสูงสุดเท่ากับ 1.00 (Gpa37) จากค่า  $H_O$  และ  $H_E$  ที่ได้แสดงว่าประชากรนกกระเรียนจากสวนสัตว์เปิดเขาเขียวและสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระมีความหลากหลายทางพันธุกรรมค่อนข้างสูง ( $H_O$ : 0.61–1.00,  $\bar{X}$  = 0.76) เมื่อเทียบกับนกกระเรียนชนิดอื่น ๆ ที่วิเคราะห์ด้วยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ตำแหน่งเดียวกัน เช่น blue crane ( $H_O$ : 0.50–0.95,  $\bar{X}$  = 0.76) grey crowned crane ( $H_O$ : 0.30–0.80,  $\bar{X}$  = 0.59) และ wattled crane ( $H_O$ : 0.00–0.95,  $\bar{X}$  = 0.55) (Meares et al., 2008) นอกจากนี้ยังพบว่าค่า  $F_{ST}$  ของประชากรทั้งหมด เท่ากับ 0.043 ซึ่งมีค่าเข้าใกล้ศูนย์ แสดงว่าประชากรนกกระเรียนทั้ง 2 พื้นที่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมน้อย และค่าเฉลี่ย  $F_{IS}$  เท่ากับ -0.100 โดยค่าเฉลี่ยที่ได้เป็นค่าลบ แสดงว่าประชากรนกกระเรียนมีการเกิด inbreeding ระหว่างประชากรน้อย (ตารางที่ 15)

#### 4. ผลการวิเคราะห์จำนวนกลุ่มประชากรย่อย ( $K$ value) ด้วยโปรแกรม STRUCTURE

ผลการคำนวณกลุ่มประชากรย่อยตั้งแต่  $K = 1$  ถึง  $K = 5$  พบว่าได้ค่าเฉลี่ยของ  $\ln P(D)$  เท่ากับ -934.7, -945.0, -1602.6, -1067.6 และ -1174.8 ตามลำดับ (ตารางที่ 17) แสดงว่ากลุ่มประชากรย่อยที่เหมาะสมสำหรับการศึกษาคั้งนี้คือ  $K = 1$  (ภาพที่ 45) เพราะมีค่าเฉลี่ยของ  $\log$  likelihood สูงที่สุด โดยมีค่า  $\ln P(D)$  เท่ากับ -934.7 แสดงว่าประชากรนกกระเรียนพันธุ์ไทยจากสวนสัตว์เปิดเขาเขียวและสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ ไม่ได้แยกเป็นกลุ่มประชากรย่อย ซึ่งค่า  $K$  ที่ได้สอดคล้องกับค่า  $F_{ST}$  ที่บ่งบอกว่าประชากรทั้ง 2 พื้นที่การศึกษามีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมน้อย ( $F_{ST} = 0.043$ )

**ตารางที่ 14** ค่าการวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรมของประชากรนกกระเรียนพันธุ์ไทยในสภาพทรงเลี้ยงในแต่ละพื้นที่ของสวนสัตว์เปิดเขาเขียว (KKOZ) และสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ (BB) ด้วย polymorphic loci จำนวน 8 โลกซ์

โลกซ์	KKOZ							BB								
	N	N <sub>A</sub>	A <sub>R</sub>	H <sub>E</sub>	H <sub>O</sub>	F <sub>IS</sub>	HWE p-value	NAF	N	N <sub>A</sub>	A <sub>R</sub>	H <sub>E</sub>	H <sub>O</sub>	F <sub>IS</sub>	HWE p-value	NAF
Gpa11	11	5.0	5.0	0.75	0.91	-0.212	0.901	0.000	17	8.0	8.0	0.85	0.94	-0.111	0.748	0.000
Gpa14	11	9.0	9.0	0.80	0.73	0.091	0.208	0.000	17	16.0	16.0	0.94	1.00	-0.069	0.921	0.000
Gpa32	11	4.0	4.0	0.55	0.73	-0.322	0.664	0.000	17	5.0	5.0	0.49	0.53	-0.083	0.735	0.000
Gpa33	11	6.0	6.0	0.79	0.82	-0.040	0.724	0.000	17	6.0	6.0	0.79	0.94	-0.193	0.286	0.000
Gpa37	11	14.0	14.0	0.94	1.00	-0.063	0.692	0.000	17	18.0	18.0	0.96	1.00	-0.044	0.005*	0.000
Gpa38	11	4.0	4.0	0.64	0.82	-0.286	0.078	0.000	17	3.0	3.0	0.52	0.88	-0.690	0.004*	0.000
Gpa39	11	5.0	5.0	0.74	0.73	0.018	0.659	0.000	17	6.0	6.0	0.76	0.71	0.077	0.091	0.000
Gpa41	11	12.0	12.0	0.93	1.00	-0.078	0.818	0.000	17	16.0	16.0	0.94	0.88	0.063	0.000*	0.000
Average	11	7.4	7.4	0.68	0.75	-0.097			17	8.7	8.7	0.69	0.76	-0.102		



**ตารางที่ 15** ค่าการวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรมของประชากรนกกระเรียนพันธุ์ไทยในสภาพทรงเลี้ยงของสวนสัตว์เปิดเขาเขียวและสถานวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ (overall population) ด้วย polymorphic loci จำนวน 8 โลไซ

โลคัส	$N_A$	$A_R$	$H_E$	$H_O$	$F_{ST}$	$F_{IS}$	HWE $p$ -value	NAF
Gpa11	8.0	7.1	0.81	0.93	0.120	-0.148	0.947	0.000
Gpa14	17.0	11.0	0.88	0.89	0.087	-0.012	0.514	0.000
Gpa32	5.0	4.1	0.51	0.61	-0.000	-0.184	0.844	0.000
Gpa33	7.0	5.6	0.79	0.89	0.043	-0.134	0.515	0.000
Gpa37	25.0	14.6	0.95	1.00	0.028	-0.051	0.124	0.000
Gpa38	4.0	3.1	0.57	0.86	0.008	-0.515	0.004*	0.000
Gpa39	6.0	5.3	0.76	0.71	-0.032	0.054	0.275	0.000
Gpa41	22.0	13.3	0.94	0.93	0.038	0.008	0.052	0.000
ค่าเฉลี่ย	10.4	7.1	0.69	0.76	0.043	-0.100		

หมายเหตุ:

$N_A$ : จำนวนของอัลลีลต่อโลคัส

$A_R$ : ค่า allelic richness

$H_E$ : ค่า expected heterozygosity

$H_O$ : ค่า observed heterozygosity

$F_{ST}$ : ค่า fixation index

$F_{IS}$ : ค่า inbreeding coefficient

HWE  $p$ -value: ค่าความน่าจะเป็นที่จะเข้าสู่สมดุลของ Hardy-Weinberg เมื่อ  $p > 0.05$

NAF: ค่า null allele frequency

\*: พบการเบี่ยงเบนออกจากสมดุล Hardy-Weinberg อย่างมีนัยสำคัญ

ตารางที่ 16 ค่า  $H_E$  และ  $H_O$  และ Fisher's Exact Test probability ของนกกระเรียนพันธุ์ไทยเพศผู้ และเพศเมียเมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์จาก blue crane

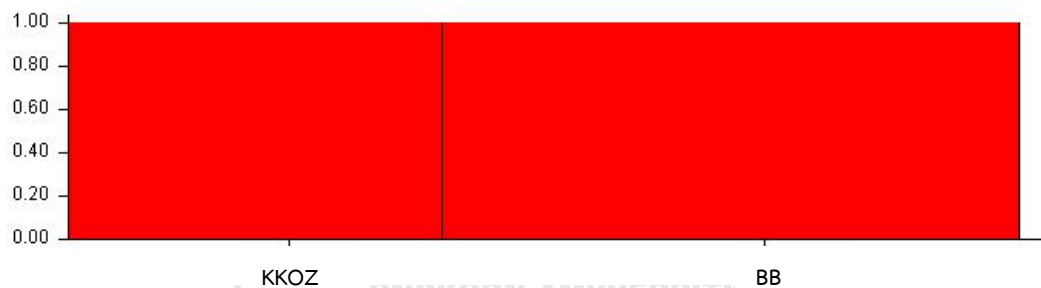
โลคัส	เพศเมีย		เพศผู้		ค่า <i>p</i> -value
	$H_E$	$H_O$	$H_E$	$H_O$	
Gpa11	0.80	0.86	0.77	1.00	0.484
Gpa12	0.67	0.78	0.56	0.49	0.433
Gpa14	0.84	0.83	0.91	0.90	1.000
Gpa32	0.49	0.67	0.51	0.58	1.000
Gpa33	0.77	0.78	0.84	1.00	0.226
Gpa34	0.84	0.94	0.85	1.00	1.000
Gpa35	0.70	0.79	0.72	0.80	1.000
Gpa36	0.83	0.86	0.89	0.84	1.000
Gpa37	0.96	1.00	0.95	1.00	1.000
Gpa38	0.55	0.81	0.59	0.90	0.600
Gpa39	0.78	0.61	0.76	0.84	0.221
Gpa41	0.90	0.94	0.95	0.94	1.000

ตารางที่ 17 ค่า log likelihood (Ln P(D)) จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม STRUCTURE ที่  $K = 1$  ถึง  $K = 5$  ด้วย polymorphic loci จำนวน 8 โลไซ

จำนวนซ้ำ	ค่า Ln P(D)				
	$K = 1$	$K = 2$	$K = 3$	$K = 4$	$K = 5$
1	<b>-934.7</b>	-940.1	-1044.0	-1002.0	-1751.2
2	<b>-935.0</b>	-951.4	-1787.5	-1023.5	-1001.8
3	<b>-934.5</b>	-963.6	-1705.9	-1026.8	-1030.3
4	<b>-934.6</b>	-935.0	-1729.1	-998.3	-1067.8
5	<b>-934.8</b>	-934.8	-1746.6	-1287.3	-1022.9
Mean	<b>-934.7</b>	-945.0	-1602.6	-1067.6	-1174.8

หมายเหตุ: ตัวหนา คือ ค่า log likelihood หรือ Ln P(D) ที่มีค่าสูงที่สุด

Proportion of each cluster



ภาพที่ 45 ผลการวิเคราะห์ genetic clustering ที่แสดง  $K = 1$  ซึ่งได้จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม STRUCTURE ด้วย polymorphic loci จำนวน 8 โลไซ โดยแต่ละตัวอย่างของพื้นที่ KKOZ และ BB จะแสดงด้วยเส้น vertical line ซึ่งจะมีการแบ่งเป็นสีตามจำนวนของค่า  $K$  ที่ประเมินได้

หมายเหตุ

แกน X คือ พื้นที่การศึกษา

แกน Y คือ สัดส่วนของค่า  $K$  ที่ประเมินผ่านความถี่ของอัลลีล

KKOZ คือ สวนสัตว์เปิดเขาเขียว BB คือ สถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ

#### 4.5.3 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลด้วย polymorphic loci จาก whooping crane จำนวน 10 โลไซ และ blue crane จำนวน 12 โลไซ

เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ทั้ง 22 โลไซ ที่แสดง polymorphism ได้นำมาใช้ในการวิเคราะห์ค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกกระเรียนพันธุ์ไทยในสภาพกรงเลี้ยง โดยแต่ละค่าแสดงผลดังนี้

##### 1. ค่า large allele dropout

ไม่มีการปรากฏ large allele dropout ในทุกโลไซ

##### 2. ค่า linkage disequilibrium (LD)

จากผลการวิเคราะห์พบว่ามีคู่ของโลไซที่แสดงค่า  $p$ -value < 0.01 จำนวน 13 คู่ ได้แก่ Gram6-Gpa35 ( $p = 0.002$ ), Gram6-Gpa14 ( $p = 0.001$ ), Gram6-Gpa36 ( $p = 0.000$ ), Gram6-Gpa41 ( $p = 0.002$ ), Gram8-Gpa41 ( $p = 0.007$ ), Gram11-Gpa12 ( $p = 0.000$ ), Gram20-Gpa39 ( $p = 0.009$ ), Gram30-Gpa12 ( $p = 0.010$ ), Gpa12-Gpa34 ( $p = 0.001$ ), Gpa12-Gpa11 ( $p = 0.001$ ), Gpa35-Gpa41 ( $p = 0.004$ ), Gpa11-Gpa36 ( $p = 0.007$ ) และ Gpa36-Gpa41 ( $p = 0.002$ ) ซึ่งหลังจากทำการวิเคราะห์ค่า  $p$ -value ของทุกโลไซใหม่ โดยตัดโลคัส Gpa12, Gpa14, Gpa34, Gpa35, Gpa36, Gpa39, Gpa41 และ Gram20 ออก พบว่าไม่มีการปรากฏค่า LD ในทุกคู่โลไซ แสดงว่าทั้ง 8 โลไซดังกล่าวเป็นตำแหน่งที่มีการปรากฏค่า LD ซึ่งจำเป็นต้องตัดออกจากการวิเคราะห์ผล หรืออาจกล่าวได้ว่ามีเพียง 14 โลไซ เท่านั้น คือ Gram6, Gram8, Gram11, Gram17, Gram22, Gram30, Gram32a, Gram42, Gram45, Gpa11, Gpa32, Gpa33, Gpa37 และ Gpa38 ที่สามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมต่อไปได้ จะเห็นได้ว่าในกลุ่มการทดลองที่ 3 พบจำนวนโลคัสที่ปรากฏค่า LD มากกว่ากลุ่มการวิเคราะห์อื่น ๆ ซึ่งอาจจะเป็นผลมาจากการนำเอาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ของนกในสกุลเดียวกันและต่างสกุลมาใช้รวมกันมากเกินไป จนอาจทำให้พบโอกาสที่หลายโลไซจะเป็นตำแหน่งเดียวกันได้ แต่อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาลำดับนิวคลีโอไทด์ของทุกโลไซ (ตารางที่ 8) พบว่าตำแหน่งไมโครแซทเทลไลท์ที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากไพรเมอร์ของ whooping crane และ blue crane ไม่มีรูปแบบการซ้ำของนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกัน ดังนั้นการพบ LD ในกลุ่มการวิเคราะห์นี้จึงไม่ได้มีสาเหตุมาจากเหตุผลดังกล่าว แต่เมื่อพิจารณาจำนวนของโลไซที่ตรวจพบ LD จะเห็นได้ว่าส่วนใหญ่เป็นเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ที่ได้จากการศึกษาใน blue crane ดังนั้นในการเลือกใช้ไพรเมอร์สำหรับวิธี cross-species amplification ควรจะเลือกใช้ไพรเมอร์จากนกในสกุลเดียวกันมากกว่านกต่างสกุล เพื่อลดโอกาสการตรวจพบ LD ใน polymorphic loci ที่คัดกรองได้

3. ค่าการเบี่ยงเบนออกจากสมมูล Hardy-Weinberg (HWE  $p$ -value) และ null allele frequency (NAF)

จากการวิเคราะห์ผลโดยการแยกพื้นที่และรวมพื้นที่การศึกษา พบว่าทั้ง 2 การวิเคราะห์พบการเบี่ยงเบนออกจากสมมูล Hardy-Weinberg ที่บริเวณโลคัส Gram8 ซึ่งเป็นผลมาจากการปรากฏค่า NAF ที่ตำแหน่งนี้เช่นเดียวกัน (ตารางที่ 18 และ 19) โดย NAF ที่ตรวจพบเป็นผลมาจากการเกิด sex linkage (ตารางที่ 11) ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยจึงเลือกใช้ตำแหน่งไมโครแซทเทลไลท์ที่ไม่พบ null allele จำนวน 13 โลไซ ได้แก่ Gram6, Gram11, Gram17, Gram22, Gram30, Gram32a, Gram42, Gram45, Gpa11, Gpa32, Gpa33, Gpa37 และ Gpa38 มาเป็นเครื่องหมายทางพันธุกรรมเพื่อใช้วิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรต่อไป

4.5.3.1 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์จำนวน 13 โลไซ

1. ผลการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกระเรียนพันธุ์ไทยในพื้นที่สวนสัตว์เปิดเขาเขียว

จากผลการวิเคราะห์ไม่พบการเบี่ยงเบนออกจากสมมูล Hardy-Weinberg ในทุกโลไซ ค่าเฉลี่ย  $N_A$  และ  $A_R$  เท่ากับ 4.7 โดยจำนวนอัลลีลต่อโลคัสที่น้อยที่สุดมีค่าเท่ากับ 1 (Gram45) และจำนวนอัลลีลต่อโลคัสที่สูงที่สุดมีค่าเท่ากับ 14 (Gpa37) ค่าเฉลี่ย  $H_E$  เท่ากับ 0.62 โดยมีค่าต่ำสุดเท่ากับ 0.00 (Gram45) และค่าสูงสุดเท่ากับ 0.94 (Gpa37) ค่าเฉลี่ย  $H_O$  เท่ากับ 0.67 โดยมีค่าต่ำสุดเท่ากับ 0.00 (Gram45) และค่าสูงสุดเท่ากับ 1.00 (Gram30 และ Gpa37) ค่าเฉลี่ย  $F_{IS}$  เท่ากับ -0.084 (ตารางที่ 18)

2. ผลการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกระเรียนพันธุ์ไทยในพื้นที่สถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ

จากผลการวิเคราะห์พบว่ามีการเบี่ยงเบนออกจากสมมูล Hardy-Weinberg นั้นปรากฏอยู่ใน 2 โลไซ ได้แก่ Gpa37 และ Gpa38 ค่าเฉลี่ยของ  $N_A$  และ  $A_R$  เท่ากับ 5.8 โดยจำนวนอัลลีลต่อโลคัสที่น้อยที่สุดมีค่าเท่ากับ 2 (Gram42 และ Gram45) และจำนวนอัลลีลต่อโลคัสที่สูงที่สุดมีค่าเท่ากับ 18 (Gpa37) ค่าเฉลี่ย  $H_E$  เท่ากับ 0.64 โดยมีค่าต่ำสุดเท่ากับ 0.17 (Gram42) และค่าสูงสุดเท่ากับ 0.96 (Gpa37) ค่าเฉลี่ย  $H_O$  เท่ากับ 0.71 โดยมีค่าต่ำสุดเท่ากับ 0.18 (Gram42) และค่าสูงสุดเท่ากับ 1.00 (Gram30 และ Gpa37) ค่าเฉลี่ย  $F_{IS}$  เท่ากับ -0.111 (ตารางที่ 18)

จากค่า  $H_O$  และ  $H_E$  ที่ได้จะเห็นได้ว่านกระเรียนทั้งสองพื้นที่ศึกษามีความหลากหลายทางพันธุกรรมค่อนข้างสูง โดยค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกระเรียนจากสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำ

บางพระ มีค่าสูงกว่านกจากสวนสัตว์เปิดเขาเขียวเล็กน้อย ( $H_E = 0.64$ ;  $H_O = 0.71$  vs  $H_E = 0.62$ ;  $H_O = 0.67$ ) และค่า  $F_{IS}$  ที่ได้แสดงค่าเป็นลบ แสดงว่าภายในประชากรนกทั้งจากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว และสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระมีการเกิด inbreeding น้อย

### 3. ผลการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกกระเรียนพันธุ์ไทยทั้ง 2 พื้นที่ การศึกษา (overall population)

จากผลการวิเคราะห์พบว่า ค่าเฉลี่ยของ  $N_A$  มีค่าเท่ากับ 6.7 โดยจำนวนอัลลีลต่อโลคัสที่น้อยที่สุดมีค่าเท่ากับ 2 (Gram42 และ Gram45) และจำนวนอัลลีลต่อโลคัสที่สูงที่สุดมีค่าเท่ากับ 25 (Gpa37) ค่าเฉลี่ยของ  $A_R$  เท่ากับ 5.1 โดยมีค่าต่ำสุดคือ 1.9 (Gram42 และ Gram45) และ ค่าสูงสุดคือ 14.6 (Gpa37) ค่าเฉลี่ยของ  $H_E$  เท่ากับ 0.63 โดยมีค่าต่ำสุดเท่ากับ 0.15 (Gram45) และค่าสูงสุดเท่ากับ 0.95 (Gpa37) ค่าเฉลี่ย  $H_O$  เท่ากับ 0.69 โดยมีค่าต่ำสุดเท่ากับ 0.18 (Gram42 และ Gram45) และค่าสูงสุดเท่ากับ 1.00 (Gram30 และ Gpa37) จากค่า  $H_O$  และ  $H_E$  ที่ได้แสดงว่าประชากรนกกระเรียนจากสวนสัตว์เปิดเขาเขียวและสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระมีความหลากหลายทางพันธุกรรมค่อนข้างสูง นอกจากนี้ยังพบว่าค่า  $F_{ST}$  ของประชากรทั้งหมด เท่ากับ 0.035 ซึ่งมีค่าเข้าใกล้ศูนย์ แสดงว่าประชากรนกกระเรียนทั้ง 2 พื้นที่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมน้อย และไม่แยกออกเป็นกลุ่มประชากรย่อย (population subdivision) และค่าเฉลี่ย  $F_{IS}$  เท่ากับ -0.100 โดยค่าเฉลี่ยที่ได้เป็นค่าลบ แสดงว่าประชากรนกกระเรียนมีการเกิด inbreeding น้อย (ตารางที่ 19)

### 4. ผลการวิเคราะห์จำนวนกลุ่มประชากรย่อย (K value) ด้วยโปรแกรม STRUCTURE

ผลการคำนวณกลุ่มประชากรย่อยตั้งแต่  $K = 1$  ถึง  $K = 5$  พบว่าได้ค่าเฉลี่ยของ  $\ln P(D)$  เท่ากับ -1048.5, -1077.3, -1324.4, -1346.9 และ -1200.9 ตามลำดับ (ตารางที่ 20) แสดงว่ากลุ่มประชากรย่อยที่เหมาะสมสำหรับการศึกษาคั้งนี้คือ  $K = 1$  (ภาพที่ 46) เพราะมีค่าเฉลี่ยของ  $\log$  likelihood สูงที่สุด โดยมีค่า  $\ln P(D)$  เท่ากับ -1048.5 ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าประชากรนกกระเรียนพันธุ์ไทยจากสวนสัตว์เปิดเขาเขียวและสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระไม่ได้แยกเป็นกลุ่มประชากรย่อย ซึ่งค่า  $K$  ที่ได้สอดคล้องกับค่า  $F_{ST}$  ที่บ่งบอกว่าประชากรทั้ง 2 พื้นที่การศึกษามีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมน้อย ( $F_{ST} = 0.035$ )

**ตารางที่ 18** ค่าการวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรมของประชากรนกกระเรียนพันธุ์ไทยในสภาพความเสี่ยงในแต่ละพื้นที่ของสวนสัตว์เปิดเขาเขียว (KKOZ) และสถานวิจัยเพาะเลี้ยงนกอ้นบางพระ (BB) ด้วย polymorphic loci จำนวน 13 โลไซ

โลคัส	KKOZ							BB								
	N	N <sub>A</sub>	A <sub>R</sub>	H <sub>E</sub>	H <sub>O</sub>	F <sub>IS</sub>	HWE p-value	NAF	N	N <sub>A</sub>	A <sub>R</sub>	H <sub>E</sub>	H <sub>O</sub>	F <sub>IS</sub>	HWE p-value	NAF
Gram6	11	4.0	4.0	0.75	0.73	0.030	0.662	0.025	17	6.0	6.0	0.79	0.76	0.035	0.489	0.000
Gram8	11	6.0	6.0	0.74	0.36	0.506	0.001*	<b>0.196</b>	17	6.0	6.0	0.77	0.47	0.389	0.004*	<b>0.136</b>
Gram11	11	6.0	6.0	0.80	0.82	-0.017	0.225	0.022	17	7.0	7.0	0.80	0.76	0.046	0.402	0.000
Gram17	11	4.0	4.0	0.63	0.82	-0.304	0.428	0.000	17	5.0	5.0	0.76	0.82	-0.085	0.534	0.000
Gram22	11	3.0	3.0	0.56	0.45	0.187	0.289	0.047	17	3.0	3.0	0.58	0.65	-0.107	0.861	0.000
Gram30	11	6.0	6.0	0.80	1.00	-0.243	0.723	0.000	17	8.0	8.0	0.84	1.00	-0.190	0.185	0.000
Gram32a	11	2.0	2.0	0.53	0.45	0.138	1.000	0.030	17	3.0	3.0	0.47	0.41	0.125	0.719	0.030
Gram42	11	2.0	2.0	0.32	0.18	0.429	0.279	0.112	17	2.0	2.0	0.17	0.18	-0.067	1.000	0.000
Gram45	11	1.0	1.0	0.00	0.00	NA	NA	0.000	17	2.0	2.0	0.30	0.35	-0.185	1.000	0.000
Gpa11	11	5.0	5.0	0.75	0.91	-0.212	0.897	0.000	17	8.0	8.0	0.85	0.94	-0.111	0.754	0.000
Gpa32	11	4.0	4.0	0.55	0.73	-0.322	0.661	0.000	17	5.0	5.0	0.49	0.53	-0.083	0.755	0.000
Gpa33	11	6.0	6.0	0.79	0.82	-0.040	0.712	0.000	17	6.0	6.0	0.79	0.94	-0.193	0.277	0.000
Gpa37	11	14.0	14.0	0.94	1.00	-0.063	0.684	0.000	17	18.0	18.0	0.96	1.00	-0.044	0.014*	0.000
Gpa38	11	4.0	4.0	0.64	0.82	-0.286	0.084	0.000	17	3.0	3.0	0.52	0.88	-0.690	0.005*	0.000
Average	11	4.5	4.5	0.59	0.61	-0.053			17	5.5	5.5	0.61	0.65	-0.069		
Average†	11	4.7	4.7	0.62	0.67	-0.084			17	5.8	5.8	0.64	0.71	-0.111		

**ตารางที่ 19** ค่าการวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรมของประชากรนกกระเรียนพันธุ์ไทยในสภาพกรงเลี้ยงของสวนสัตว์เปิดเขาเขียวและสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ (overall population) ด้วย polymorphic loci จำนวน 13 โลไซ

โลคัส	$N_A$	$A_R$	$H_E$	$H_O$	$F_{ST}$	$F_{IS}$	HWE $p$ -value	NAF
Gram6	6.0	4.9	0.77	0.75	-0.011	0.033	0.707	0.013
Gram8	7.0	6.0	0.75	0.42	0.055	0.434	0.000*	<b>0.166</b>
Gram11	9.0	6.4	0.80	0.79	0.015	0.021	0.305	0.011
Gram17	5.0	4.4	0.69	0.82	0.009	-0.160	0.570	0.000
Gram22	3.0	2.9	0.57	0.55	-0.011	0.004	0.584	0.024
Gram30	8.0	7.2	0.82	1.00	0.081	-0.210	0.444	0.000
Gram32a	3.0	2.4	0.50	0.43	0.032	0.130	0.954	0.030
Gram42	2.0	1.9	0.24	0.18	-0.006	0.204	0.635	0.056
Gram45	2.0	1.9	0.15	0.18	0.123	-0.179	NA	0.000
Gpa11	8.0	7.1	0.81	0.93	0.120	-0.148	0.940	0.000
Gpa32	5.0	4.1	0.51	0.61	-0.000	-0.184	0.844	0.000
Gpa33	7.0	5.6	0.79	0.88	0.043	-0.134	0.516	0.000
Gpa37	25.0	14.6	0.95	1.00	0.028	-0.051	0.123	0.000
Gpa38	4.0	3.1	0.57	0.86	0.008	-0.512	0.003*	0.000
ค่าเฉลี่ย†	6.7	5.1	0.63	0.69	0.035	-0.100		

หมายเหตุ:

$N_A$ : จำนวนของอัลลีลต่อโลคัส

$A_R$ : ค่า allelic richness

$H_E$ : ค่า expected heterozygosity

$H_O$ : ค่า observed heterozygosity

$F_{ST}$ : ค่า fixation index

$F_{IS}$ : ค่า inbreeding coefficient

HWE  $p$ -value: ค่าความน่าจะเป็นที่จะเข้าสู่สมดุลของ Hardy-Weinberg เมื่อ  $p > 0.05$

NAF: ค่า null allele frequency

\*: พบการเบี่ยงเบนออกจากสมดุล Hardy-Weinberg อย่างมีนัยสำคัญ

ตัวหนา: โลคัสที่พบ NAF

†: การวิเคราะห์ผลโดยไม่รวมโลคัส Gram8

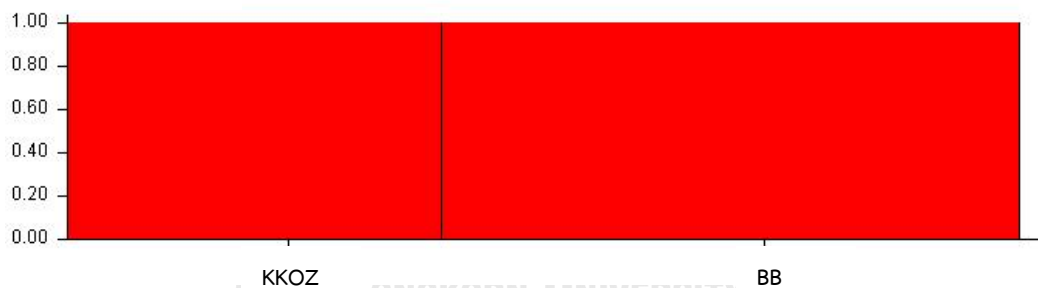


ตารางที่ 20 ค่า log likelihood (Ln P(D)) จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม STRUCTURE ที่  $K = 1$  ถึง  $K = 5$  ด้วย polymorphic loci จำนวน 13 โลไซ

จำนวนซ้ำ	ค่า Ln P(D)				
	$K = 1$	$K = 2$	$K = 3$	$K = 4$	$K = 5$
1	-1048.4	-1107.1	-1305.9	-1271.7	-1123.7
2	-1048.4	-1051.6	-1431.2	-1230.8	-1555.4
3	-1048.5	-1048.8	-1181.6	-1170.6	-1127.7
4	-1048.4	-1048.4	-1250.5	-1337.8	-1130.7
5	-1048.7	-1130.5	-1453.0	-1723.8	-1066.9
ค่าเฉลี่ย	-1048.5	-1077.3	-1324.4	-1346.9	-1200.9

หมายเหตุ: ตัวหนา คือ ค่า log likelihood หรือ Ln P(D) ที่มีค่าสูงที่สุด

Proportion of each cluster



ภาพที่ 46 ผลการวิเคราะห์ genetic clustering ที่แสดง  $K = 1$  ซึ่งได้จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม STRUCTURE ด้วย polymorphic loci จำนวน 13 โลไซ โดยแต่ละตัวอย่างของพื้นที่ KKOZ และ BB จะแสดงด้วยเส้น vertical line ซึ่งจะมีการแบ่งเป็นสีตามจำนวนของค่า  $K$  ที่ประเมินได้

หมายเหตุ

แกน X คือ พื้นที่การศึกษา

แกน Y คือ สัดส่วนของค่า  $K$  ที่ประเมินผ่านความถี่ของอัลลีล

KKOZ คือ สวนสัตว์เปิดเขาเขียว BB คือ สถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ

#### 4.5.4 ผลการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมจากทั้ง 3 กลุ่มการวิเคราะห์

จากผลการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกกระเรียนพันธุ์ไทยจากสวนสัตว์เปิดเขาเขียวและสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ แสดงให้เห็นว่านกจากทั้งสองพื้นที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงเนื่องจากค่า heterozygosity ที่วิเคราะห์ได้มีค่ามากกว่า 0.5 มีการเกิด inbreeding ต่ำ เพราะค่า  $F_{IS}$  จากทุกกลุ่มการวิเคราะห์ให้ค่าน้อยกว่าศูนย์ รวมถึงประชากรทั้งสองกลุ่มมีความแตกต่างทางพันธุกรรมน้อย เพราะค่า  $F_{ST}$  ที่ได้แสดงค่าต่ำ (ตารางที่ 10, 15 และ 19) และนกทั้งสองพื้นที่ไม่มีการแบ่งออกเป็นกลุ่มประชากรย่อย เพราะค่า  $K$  มีค่าเท่ากับ 1 (ตารางที่ 13, 17 และ 20) จากผลการศึกษาที่ได้ให้ผลที่เป็นไปในทิศทางเดียวกันกับการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกกระเรียนพันธุ์ไทยด้วยเครื่องหมายทางพันธุกรรมชนิดอื่น ๆ เช่น การศึกษาของ Insee (2013) ที่ได้ใช้เครื่องหมายไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ คือ cytochrome *b*, *ND6* และ control region พบว่านกกระเรียนพ่อแม่พันธุ์ตั้งต้นจำนวน 51 ตัวจากทั้งสวนสัตว์เปิดเขาเขียว สวนสัตว์นครราชสีมา และสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงเพราะพบจำนวนแฮพลোটাইป์ถึง 46 แฮพลোটাইป์ (Insee, 2013) และ การศึกษาของ Tanee et al. (2009) ที่ได้ใช้เครื่องหมายนิวเคลียร์ดีเอ็นเอ คือ เครื่องหมาย ISSR วิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกกระเรียนจากสวนสัตว์นครราชสีมาจำนวน 27 ตัว พบว่านกกระเรียนมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง โดยมีค่า Shannon's diversity index ( $H'$ ) เท่ากับ 0.501 (Tanee et al., 2009) ดังนั้นจะเห็นได้ว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกกระเรียนในกรงเลี้ยงของประเทศไทยมีค่าสูงจริง เพราะไม่ว่าจะใช้เครื่องหมายทางพันธุกรรมชนิดใดมาวิเคราะห์ผลก็จะแสดงผลที่สอดคล้องกัน ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่านกที่ประเทศไทยได้รับบริจาคมาจากประเทศกัมพูชานั้นเป็นประชากรที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมที่สูงอยู่ก่อนหน้าแล้ว เพราะนกในแต่ละพื้นที่จากธรรมชาติของประเทศกัมพูชาอาจจะสามารถ migrate ถึงกันและเกิด gene flow ระหว่างประชากรได้ จึงทำให้นกในแต่ละพื้นที่มีโอกาสได้แลกเปลี่ยนสารพันธุกรรมกันมากขึ้น และส่งผลให้เพิ่มความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรได้เช่นกัน แต่อย่างไรก็ตามยังไม่เคยมีรายงานการศึกษาการเกิด gene flow ของประชากรในแต่ละพื้นที่ของประเทศกัมพูชา ถึงแม้ว่านกกระเรียนพันธุ์ไทยจะเป็นนกไม่อพยพ (non-migratory bird) แต่นกในวงศ์ Gruidae มีความสามารถในการบินได้หลายร้อยกิโลเมตรต่อวัน โดยจากการศึกษาระยะทางที่นกสามารถบินได้ของ red-crowned crane บนเกาะฮอกไกโด ซึ่งเป็น non-migratory bird เช่นเดียวกับนกกระเรียนพันธุ์ไทย พบว่าระยะทางเฉลี่ยที่นกสามารถบินระหว่างประชากรได้คือ 204 กิโลเมตรต่อวัน (Sugimoto et al., 2015) จากการศึกษาแหล่งที่อยู่อาศัยของนกกระเรียนในธรรมชาติของประเทศกัมพูชาจากงานของ Van Zalinge et al. (2011) พบว่าระยะห่างของพื้นที่อยู่อาศัยแต่ละแห่งอยู่ในช่วง 100–400 กิโลเมตร ซึ่งเป็นระยะที่นกกระเรียนจะสามารถ migrate ไปถึงกันได้ ดังนั้นจากข้อมูลข้างต้นจึงสนับสนุนความเป็นไปได้ในการเกิด gene

flow ของนกในแต่ละพื้นที่ จึงทำให้ผลการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกกะเรียน พันธุ์ไทยจากการศึกษาครั้งนี้ รวมถึงจาก Insee (2013) และ Tanee et al. (2009) นั้นพบความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรค่อนข้างสูง ในอนาคตการติดตามระยะทางที่นกในธรรมชาติของประเทศกัมพูชาสามารถ migrate ถึงกันได้จะเป็นข้อมูลที่ชี้บ่งบอกว่านกกะเรียนสามารถบินได้ไกลมากที่สุดกี่กิโลเมตร และข้อมูลที่ได้สามารถนำมาประเมินการเกิด gene flow ของประชากรนกในประเทศกัมพูชาได้

นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบค่า overall  $F_{ST}$  จากการศึกษานี้ (ตารางที่ 10, 15 และ 19) กับงานของ Jones, Barzen, et al. (2005) ที่ศึกษาโครงสร้างทางพันธุกรรมของ sarus crane ทั้ง 3 ชนิดย่อยพบว่าค่า  $F_{ST}$  ของนกกะเรียนพันธุ์ไทยจากสวนสัตว์เปิดเขาเขียวและสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระมีค่าต่ำกว่า sarus crane ทั้ง 3 ชนิดย่อย ( $F_{ST} = 0.21$ ) (Jones, Barzen, et al., 2005) จากข้อมูลดังกล่าวจึงอาจบ่งบอกได้ว่านกกะเรียนพ่อแม่พันธุ์ตั้งต้นของทั้งสองพื้นที่อาจมาจากกลุ่มประชากรเดียวกันในประเทศกัมพูชา แต่อย่างไรก็ตามข้อมูลต้นกำเนิดของนกกะเรียนที่ประเทศไทยได้รับมามีค่อนข้างน้อย จึงทำให้ยังไม่สามารถยืนยันได้อย่างแน่ชัดว่าประชากรนกกะเรียนที่ได้รับมาจากประเทศกัมพูชานั้นมาจากกลุ่มนกเพียงกลุ่มเดียวหรือไม่ เพราะมีการศึกษาของ Van Zalinge et al. (2011) ที่ได้สำรวจแหล่งที่อยู่อาศัยของนกกะเรียนในธรรมชาติของประเทศกัมพูชา พบว่านกมีการกระจายตัวอยู่อย่างน้อย 6 พื้นที่ คือ Ang Trapeang Thmor (จังหวัด Banteay Meanchey), Tonle Sap Grasslands (จังหวัด Kampong Thom), Preah Net Preah (จังหวัด Banteay Meanchey), Kulen Promtep Wildlife Sanctuary (จังหวัด Preah Vihear), Preah Vihear Protected Forest (จังหวัด Preah Vihear) และ Western Siem Pang (จังหวัด Stung Treng) (Van Zalinge et al., 2011) จากข้อมูลข้างต้นอาจจะบ่งบอกได้ว่านกกะเรียนพ่อแม่พันธุ์ตั้งต้นที่สวนสัตว์เปิดเขาเขียวและสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระได้รับมานั้นอาจจะมาจากกลุ่มประชากรมากกว่า 1 กลุ่ม แต่ตัวอย่างเหล่านั้นมีการกระจายตัวแบบสุ่มไปยังพื้นที่การเพาะเลี้ยงทั้งสองแห่งเท่า ๆ กัน จึงทำให้ผลของค่า  $F_{ST}$  ที่ได้จากการวิเคราะห์ครั้งนี้มีค่าต่ำ และได้ค่า  $K = 1$  ดังนั้นการตรวจสอบโครงสร้างทางพันธุกรรมของนกกะเรียนในธรรมชาติของประเทศกัมพูชาจะเป็นข้อมูลสำคัญที่ใช้ในการยืนยันจำนวนกลุ่มของประชากรพ่อแม่พันธุ์ตั้งต้นที่ประเทศไทยได้รับมาได้

## บทที่ 5

### สรุปผลการศึกษา

จากการศึกษาการคัดกรองเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกกกระเรียนพันธุ์ไทยในสภาพกรงเลี้ยงของสวนสัตว์เปิดเขาเขียว และสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ จังหวัดชลบุรี จำนวนทั้งหมด 28 ตัวอย่าง พบว่าไพรเมอร์ที่นำมาศึกษาด้วยวิธี cross-species amplification ทั้ง 28 คู่ สามารถนำมาเพิ่มปริมาณไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอของนกกกระเรียนพันธุ์ไทยได้ทั้งหมด แต่มีไพรเมอร์เพียง 22 คู่ที่แสดง polymorphism ได้แก่ ไพรเมอร์จาก whooping crane จำนวน 10 คู่ และ ไพรเมอร์จาก blue crane จำนวน 12 คู่ โดย polymorphic primer ทั้งหมดสามารถนำไปใช้สำหรับการวิเคราะห์ผลต่อไปได้ แต่อย่างไรก็ตามเมื่อวิเคราะห์ผลของค่า linkage disequilibrium การเบี่ยงเบนออกจากสมดุล Hardy-Weinberg และ null allele แล้วนั้นกลับพบว่า

- หากวิเคราะห์ผลด้วยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์จาก whooping crane ทั้งหมด 14 โลไซและจาก blue crane 4 โลไซ (Gpa12, Gpa33, Gpa34 และ Gpa35) จะมีเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่เหมาะสมสำหรับวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม จำนวน 10 โลไซ

- หากวิเคราะห์ผลด้วยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์จาก blue crane ทั้งหมด 14 โลไซ จะมีเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่เหมาะสม จำนวน 8 โลไซ

- หากวิเคราะห์ผลด้วยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์จาก whooping crane และ blue crane ทั้งหมด 28 โลไซ จะมีเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่เหมาะสม จำนวน 13 โลไซ

จากการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกกกระเรียนพันธุ์ไทยด้วยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ที่เหมาะสมจาก whooping crane และ blue crane พบว่านกกกระเรียนจากสวนสัตว์เปิดเขาเขียวและสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระมีความหลากหลายทางพันธุกรรมค่อนข้างสูง ( $H_E = 0.61$ ;  $H_O = 0.64$  vs  $H_E = 0.69$ ;  $H_O = 0.76$  vs  $H_E = 0.63$ ;  $H_O = 0.69$ ) มีการเกิด inbreeding ต่ำ ( $F_{IS} = -0.048$  vs  $-0.100$  vs  $-0.100$ ) และประชากรไม่มีการแบ่งออกเป็นกลุ่มย่อยเพราะมีความแตกต่างของโครงสร้างทางพันธุกรรมต่ำ ( $F_{ST} = 0.023$  vs  $0.043$  vs  $0.035$ ;  $K = 1$ ) จากผลที่ได้สามารถสรุปได้ว่านกกกระเรียนพ่อแม่พันธุ์ตั้งต้นจากสวนสัตว์เปิดเขาเขียวและสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงและเหมาะสมที่จะใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ในการเพิ่มจำนวนประชากรในกรงเลี้ยงต่อไปในอนาคตได้ เพื่อเป็นตัวแทนประชากรที่จะนำกลับไปปล่อยคืนสู่พื้นที่ชุ่มน้ำในธรรมชาติของประเทศไทยต่อไป เพราะพื้นฐานการมีความหลากหลายทางพันธุกรรมที่สูงและ

โครงสร้างทางพันธุกรรมที่ดีจะทำให้นักเรียนสามารถต้านทานต่อโรคหรือการเปลี่ยนแปลงอย่าง  
ฉับพลันทางธรรมชาติได้



## ข้อเสนอแนะเกี่ยวกับแนวทางการอนุรักษ์นกกระเรียนพันธุ์ไทย

### 1. ด้านการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมสำหรับงานวิจัยในอนาคต

1.1 ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรจำเป็นต้องทราบข้อมูลเพศที่ถูกต้องของนกแต่ละตัว เนื่องจากเป็นข้อมูลสำคัญที่จะสามารถใช้ในการประเมิน sex linkage และ sex ratio ของประชากร นอกจากนี้ยังเป็นข้อมูลที่มีประโยชน์สำหรับแหล่งเพาะเลี้ยงในการจับคู่นกให้ถูกต้องเพื่อให้สามารถเข้าคู่และผสมพันธุ์กันได้ โดยเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่ใช้สำหรับระบุเพศนกกระเรียนจากการศึกษาของ Insee (2013) มีความเหมาะสมสำหรับนำไปใช้เพื่อยืนยันเพศที่ถูกต้องได้

1.2 เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ที่นำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้สามารถนำไปปรับใช้กับการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกกระเรียนในกรงเลี้ยงของสวนสัตว์วันครราชสีมา และนกที่ปล่อยไปยังพื้นที่ชุ่มน้ำในจังหวัดบุรีรัมย์ได้ โดยสามารถนำข้อมูลมาประกอบกันเป็นภาพรวมของโครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรนกทั้งในกรงเลี้ยงและในธรรมชาติ ซึ่งในอนาคตการศึกษาและเปรียบเทียบความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกทั้งในกรงเลี้ยงและนกที่ได้ปล่อยคืนสู่ธรรมชาติจะมีความสำคัญต่อการวางแผนการเพาะเลี้ยงและขยายพันธุ์ เพื่อให้นกในกรงเลี้ยงมีความหลากหลายทางพันธุกรรมมากพอที่จะอยู่รอดต่อการคัดเลือกโดยธรรมชาติได้ นอกจากนี้การติดตามอัตราการอยู่รอดและการผสมพันธุ์ (fitness) ของประชากรนกในธรรมชาติอย่างต่อเนื่องยังมีความสำคัญต่อการอนุรักษ์นกกระเรียนให้สามารถอยู่รอดได้อย่างยั่งยืน

1.3 การศึกษาโครงสร้างทางพันธุกรรมของนกกระเรียนในธรรมชาติของประเทศกัมพูชาด้วยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์สามารถนำมาใช้เป็นข้อมูลในการยืนยันจุดกำเนิดที่ถูกต้องของนกที่ประเทศไทยได้รับบริจาคมาว่ามาจากกลุ่มประชากร อีกทั้งยังสามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการเปรียบเทียบความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างนกทั้งสองประเทศได้

### 2. ด้านการวางแผนการอนุรักษ์นกกระเรียนทั้งในกรงเลี้ยงและในธรรมชาติของประเทศไทย

2.1 จากประวัติของการเริ่มต้นการเพาะเลี้ยงและขยายพันธุ์นกกระเรียนในประเทศไทยพบว่าประชากรที่ใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ตั้งต้นมีเพียง 59 ตัว โดยกระจายไปยังแหล่งเพาะเลี้ยงทั้ง 3 แห่ง แต่จำนวนพ่อแม่พันธุ์ตั้งต้นจำนวนน้อยจะส่งผลต่อความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรในกรงเลี้ยงรุ่นถัดไปได้ โดยอาจจะทำให้ประชากรมีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำ เนื่องจากเกิดการ inbreeding ขึ้นภายในกรงเลี้ยง ดังนั้นเพื่อให้การขยายพันธุ์ประชากรรุ่นลูกจากประชากรตั้งต้นจำนวนน้อยให้มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงและมีอัตราการอยู่รอดที่ยืนยาวได้นั้น จำเป็นต้องให้ความสำคัญกับการวางแผนการเพาะเลี้ยง โดยการตรวจสอบข้อมูลทางพันธุกรรมของกลุ่ม

ประชากรนกกระเรียนพันธุ์ไทยทั้งหมดในประเทศเป็นแนวทางการวางแผนหนึ่งที่ทำให้สามารถทราบได้ว่านกกระเรียนมีความหลากหลายทางพันธุกรรมเป็นอย่างไร

2.2 เมื่อทราบความหลากหลายทางพันธุกรรมและเพศที่ถูกตั้งของประชากรนกในแต่ละพื้นที่แล้ว สามารถนำข้อมูลเหล่านั้นไปปรับใช้ในการจับคู่ผสมพันธุ์นกเพื่อลดการเกิด inbreeding ภายในประชากรเดียวกัน

2.3 นกกระเรียนจากสวนสัตว์เปิดเขาเขียวและสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระควรถูกจัดให้เป็น single management unit เพื่อให้ในอนาคตสามารถแลกเปลี่ยนพ่อแม่พันธุ์ระหว่างสถานที่เพาะเลี้ยงทั้งสองแห่ง เพื่อเพิ่มความหลากหลายทางพันธุกรรมและลดโอกาสการเกิด inbreeding ภายในประชากร แต่หากนกกระเรียนในกรงเลี้ยงของประเทศไทยเริ่มมีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำลง การแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรมกับประชากรนกในธรรมชาติของประเทศกัมพูชา ซึ่งเป็นประชากรต้นกำเนิดของนกกระเรียนที่ได้นำมาเพาะเลี้ยงในประเทศไทย อาจจะสามารถเพิ่มความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรได้ แต่ทั้งนี้จำเป็นต้องมีการประเมินโครงสร้างทางพันธุกรรมของนกในประเทศกัมพูชาด้วยเครื่องมือไม่โครแซทเทลไลท์จากการศึกษาครั้งก่อนเพื่อนำผลการวิเคราะห์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับโครงสร้างทางพันธุกรรมกับนกในกรงเลี้ยงของประเทศไทย นอกจากนี้เครื่องมือไม่โครแซทเทลไลท์ทั้ง 28 โลไซ ยังสามารถนำไปปรับใช้เพื่อประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกกระเรียนพันธุ์ไทยที่มีการกระจายตัวในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ได้อีกด้วย

## รายการอ้างอิง

- Archibald, G. W., Gopi Sundar, K. S. and Barzen, J. 2003. A review of the three subspecies of sarus cranes *Grus antigone*. Journal of Ecological Society 16: 5–15.
- Barzen, J. A. and Seal, U. S. 2000. Eastern Sarus Crane PHVA Final Report. IUCN/SSC Conservation Breeding Specialist Group. Apple Valley, Minnesota, USA.
- BirdLife International. 2016. *Antigone antigone*. The IUCN Red List of Threatened Species 2016. e.T22692064A93335364. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-3.RLTS.T22692064A93335364.en>.
- Dakin, E. E. and Avise, J. C. 2004. Microsatellite null alleles in parentage analysis. Heredity 93: 504–509.
- Das, R. 2010. Mitochondrial Control Region Variation among the Subspecies of Sarus Crane (*Grus antigone*). Master's Thesis, Department of Zoology, Graduate School, Southern Illinois University Carbondale.
- Dubiec, A. and Zagalska-Neubauer, M. 2006. Molecular techniques for sex identification in birds. Biological Letters 43: 3–12.
- Goudet, J. 2001. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices version 2.9.3. <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>.
- Hansen, T. O., Simonsen, M. K., Nielsen, F. C. and Hundrup, Y. A. 2007. Collection of blood, saliva, and buccal cell samples in a pilot study on the Danish nurse cohort: Comparison of the response rate and quality of genomic DNA. Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers 16: 2072–2076.
- Hartl, D. L. and Clark, A. G. 2007. Principle of Population Genetics. 4th edn. Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- Hasegawa, O., Ishibashi, Y. and Abe, S. 2000. Isolation and characterization of microsatellite loci in the red-crowned crane *Grus japonensis*. Molecular Ecology 9: 1677–1678.
- Hayes, M. A., Britten, H. B. and Barzen, J. A. 2006. Extra-pair fertilizations in sandhill cranes revealed using microsatellite DNA markers. The Condor 108: 970–976.



- Henkel, J. R., Jones, K. L., Hereford, S. G., Savoie, M. L., Leibo, S. P. and Howard, J. J. 2012. Integrating microsatellite and pedigree analyses to facilitate the captive management of the endangered Mississippi sandhill crane (*Grus canadensis pulla*). Zoo Biology 31: 322–335.
- Insee, J. 2013. Genetic Diversity of Mitochondrial DNA, Melanocortin-1 Receptor Gene (MC1R) and Sex Chromosome in Captive Eastern Sarus Crane (*Grus antigone sharpii*) and Its Application for Sexing, Subspecies Identification and Genetic Management. Doctoral dissertation, Graduate School, Kasetsart University.
- Johnsgard, P. A. 1983. Cranes of the World: Sarus Crane (*Grus antigone*). NE: Indiana University Press.
- Jones, K. L., Barzen, J. A. and Ashley, M. V. 2005. Geographical partitioning of microsatellite variation in the sarus crane. Animal Conservation 8: 1–8.
- Jones, K. L., Glenn, T. C., Lacy, R. C., Pierce, J. R., Unruh, N., Mirande, C. M. and Chavez-Ramirez, F. 2002. Refining the whooping crane studbook by incorporating microsatellite DNA and leg-banding analyses. Conservation Biology 16: 789–799.
- Jones, K. L., Henkel, J. R., Howard, J. J., Lance, S. L., Hagen, C. and Glenn, T. C. 2010a. Isolation and characterization of 14 polymorphic microsatellite DNA loci for the endangered whooping crane (*Grus americana*) and their applicability to other crane species. Conservation Genetics Resources 2: 251–254.
- Jones, K. L., Henkel, J. R., Howard, J. J., Lance, S. L., Hagen, C. and Glenn, T. C. 2010b. Erratum to: Isolation and characterization of 14 polymorphic microsatellite DNA loci for the endangered whooping crane (*Grus americana*) and their applicability to other crane species. Conservation Genetics Resources 2: 255–255.
- Jones, K. L., Krapu, G. L., Brandt, D. A. and Ashley, M. V. 2005. Population genetic structure in migratory sandhill cranes and the role of Pleistocene glaciations. Molecular Ecology 14: 2645–2657.
- Kalinowski, S. T. and Taper, M. L. 2006. Maximum likelihood estimation of the frequency of null alleles at microsatellite loci. Conservation Genetics 7: 991–995.

- Keller, L. F. and Waller, D. M. 2002. Inbreeding effects in wild populations. Trends in Ecology and Evolution 17: 230–241.
- Krajewski, C. 1989. Phylogenetic relationships among cranes (Gruiformes: Gruidae) based on DNA hybridization. The Auk 106: 603–618.
- Krajewski, C. and Fetzner, J. W. 1994. Phylogeny of cranes (Gruiformes: Gruidae) based on cytochrome-b DNA sequences. The Auk 111: 351–365.
- Krajewski, C., Sipiorski, J. T. and Anderson, F. E. 2010. Complete mitochondrial genome sequences and the phylogeny of cranes (Gruiformes: Gruidae). The Auk 127: 440–452.
- Mearns, K., Dawson, D. A., Horsburgh, G. J., Glenn, T. C., Jones, K. L., Braun, M. J., Perrin, M. R. and Taylor, T. D. 2009. Microsatellite loci characterized in three African crane species (Gruidae, Aves). Molecular Ecology Resources 9: 308–311.
- Mearns, K., Dawson, D. A., Horsburgh, G. J., Perrin, M. R., Burke, T. and Taylor, T. D. 2008. Characterisation of 14 blue crane *Grus paradisea* (Gruidae, AVES) microsatellite loci for use in detecting illegal trade. Conservation Genetics 9: 1363–1367.
- Meine, C. and Archibald, G. 1996. The Cranes: Status Survey and Conservation Action Plan. Gland, Switzerland: IUCN.
- Mekong wetlands biodiversity programme. 2006. MWBP Working Papers on Eastern Sarus Crane, *Grus antigone sharpii*. MWBP, Vientiane, Lao PDR.
- Mudrik, E., Kashentseva, T., Gamburg, E. and Politov, D. 2014. Genetic passportization and identification of Siberian cranes (*Grus leucogeranus* Pallas) in captivity. Biology Bulletin 41: 208–215.
- Ng, W. and Tan, S. 2015. Inter-simple sequence repeat (ISSR) markers: Are we doing it right?. ASM Science Journal 9: 30–39.
- Oliveira, E. J., Pádua, J. G., Zucchi, M. I., Vencovsky, R. and Vieira, M. L. C. 2006. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. Genetics and Molecular Biology 29: 294–307.
- Primmer, C. R., Painter, J. N., Koskinen, M. T., Palo, J. U. and Merilä, J. 2005. Factors affecting avian cross-species microsatellite amplification. Journal of Avian Biology 36: 348–360.

- Pritchard, J. K., Stephens, M. and Donnelly, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics 155: 945–959.
- Purchkoon, N., Salangsing, N., Senanok, S., Noisaward, C. and Poksaward, C. 2015. Eastern Sarus Crane Will Be Back (เจ้าจะกลับมา นกกระเรียนพันธุ์ไทย). Zoological Park Organization of Thailand under Royal Patronage of H.M. The King, Bangkok
- Raymond, M. and Rousset, F. 1995. GENEPOP (version 1.2): Population genetics software for exact tests and ecumenism. Journal of Heredity 86: 248–249.
- Raymond, M. and Rousset, F. 2003. A population genetic software for exact test and ecumenism: GENEPOP, version 3.4. Heredity 68: 248–249.
- Rousset, F. and Raymond, M. 1995. Testing heterozygote excess and deficiency. Genetics 140: 1413–1419.
- Sanguansombat, W. 2005. Thailand Red Data: Birds. Bangkok, Thailand: Office of Natural Resources and Environment Policy and Planning.
- Schodde, R., Blackman, J. G. and Haffenden, A. T. 1988. New subspecies of Australian birds. Canberra Birds Notes 13: 119–122.
- Selkoe, K. A. and Toonen, R. J. 2006. Microsatellites for ecologists: A practical guide to using and evaluating microsatellite markers. Ecology Letters 9: 615–629.
- Strzała, T., Kowalczyk, A. and Łukaszewicz, E. 2015. Reintroduction of the European capercaillie from the Capercaillie Breeding Centre in Wisła Forest District: Genetic assessments of captive and reintroduced populations. PloS one 10: e0145433. CHULALONGKORN UNIVERSITY
- Sugimoto, T., Hasegawa, O., Azuma, N., Masatomi, H., Sato, F., Matsumoto, F., Masatomi, Y., Izumi, H. and Abe, S. 2015. Genetic structure of the endangered red-crowned cranes in Hokkaido, Japan and conservation implications. Conservation Genetics 16: 1395–1401.
- Sundar, K. S. G., Kaur, J. and Choudhury, B. C. 2000. Distribution, demography and conservation status of the Indian sarus crane (*Grus antigone antigone*) in India. Journal of the Bombay Natural History Society 97: 319–339.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. and Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Molecular Biology and Evolution 30: 2725–2729.

- Tanee, T., Chaveerach, A., Anuniwat, A., Tanomtong, A., Pinthong, K., Sudmoon, R. and Morkkamul, P. 2009. Molecular analysis for genetic diversity and distance of introduced *Grus antigone sharpii* L. to Thailand. Pakistan Journal of Biological Sciences 12: 163–167.
- Tran, T. and Barzen, J. 2016. Tram Chim: Mekong river basin (Vietnam). The Wetland Book. DOI 10.1007/978-94-007-6173-5\_41-4.
- van Oosterhout, C., Hutchinson, W. F., Wills, D. P. and Shipley, P. 2004. MICRO-CHECKER: Software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. Molecular Ecology Resources 4: 535–538.
- Van Zalinge, R., Triet, T., Evans, T., Hong, C., Seng, K. and Barzen, J. 2011. Census of non-breeding Sarus Cranes in Cambodia and Vietnam, 2011. Wildfowl & Wetlands Trust (WWT), Cambodian Lower Mekong Wetlands Project, Phnom Penh.
- Wan, Q. H., Wu, H., Fujihara, T. and Fang, S. G. 2004. Which genetic marker for which conservation genetics issue?. Electrophoresis 25: 2165–2176.
- Yav, N., Parrot, M., Seng, K. and van Zalinge, R. 2015. Foraging preferences of eastern sarus cranes *Antigone antigone sharpii* in Cambodia. Cambodian Journal of Natural History 2: 165–171.
- Zou, H., Dong, H., Kong, W., Ma, J. and Liu, J. 2010. Characterization of 18 polymorphic microsatellite loci in the red-crowned crane (*Grus japonensis*), an endangered bird. Animal Science Journal 81: 519–522.
- กรมป่าไม้ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2527. ประวัติการอนุรักษ์นกกระเรียนในพระบรมราชูปถัมภ์. กรุงเทพมหานคร: กรมป่าไม้.
- ข่าวไทยพีบีเอส. 2560. เสนอปลด "นกกระเรียนพันธุ์ไทย" พันธุ์สูญพันธุ์ หลังเจอลูกนกเกิดใหม่ 2 ตัว ครั้งแรกในรอบ 50 ปี [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: <http://news.thaipbs.or.th/content/260379>
- จารุจินต์ นภิตะภักดิ์ กานต์ เลชะกุล และ วัชรระ สงวนสมบัติ. 2555. นกเมืองไทย คู่มือศึกษาธรรมชาติหมอบุญส่ง เลชะกุล. กรุงเทพมหานคร: คณะบุคคลนายแพทย์บุญส่ง เลชะกุล.
- ธวัชชัย ธาณี. 2552. ความหลากหลายทางชีวภาพและการจัดการ: กรณีศึกษานกกระเรียนไทย. ก้าวทันโลกวิทยาศาสตร์ 9: 117–119.
- นุชจรี พิษคุณ. 2556. นกกระเรียนพันธุ์ไทย. วารสารธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม 2: 6–15.

- บุบผา อ่ำเกตุ และ ศิริพร ทองอารีย์. 2527. นกกระเรียนพันธุ์ไทยในประเทศไทย *Grus antigone sharpii*. การสัมมนาเรื่องสัตว์ป่าเมืองไทย 5: 263-277.
- ภูวดล โกมลนเตียร. 2555. นกกระเรียนพันธุ์ไทยคืนถิ่น: ข้อกำหนดและตัวชี้วัดสำหรับการประเมินพื้นที่ชุ่มน้ำที่เหมาะสม. วารสารวิทยาศาสตร์ มข 40: 1013-1024.
- รังสิณี สันคม. 2557. การคัดเลือกเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์และการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกกระเรียนไทย (*Grus antigone sharpii*) ในสภาพกรงเลี้ยง. ปริญญาบัณฑิต, ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สถานีเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ จังหวัดชลบุรี. 2559. โครงการเพาะและขยายพันธุ์นกกระเรียนสายพันธุ์ไทย. กลุ่มงานเพาะเลี้ยงสัตว์ป่า สำนักอนุรักษ์สัตว์ป่า กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช.
- หทัยทิพย์ ศีกษะชาติ ทรงกลด ภู่ทอง และ พันัส ธรรมกิริตวงศ์. 2555. วิทยาต่อมไร้ท่อเชิงนิเวศเพื่อการอนุรักษ์นกกระเรียน. กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช.





ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
**CHULALONGKORN UNIVERSITY**

### ภาคผนวก ก.

#### วัสดุ อุปกรณ์และสารเคมี

##### วัสดุและอุปกรณ์

- กรรไกรผ่าตัด
- กล้องถ่ายรูป Fujifilm X-A1
- ตู้เย็น (Mitsubishi Electric, Japan)
- Forceps
- หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ (microcentrifuge tube) ขนาด 0.2, 0.5 และ 1.5 ml (Treff® Switzerland)
- ถุงมือยาง
- Automatic micropipette P2, P10, P20, P200 และ P1000 (PIPETMAN®, USA)
- Electronic clock timer model CT-30 (Canon Co., Ltd., Japan)
- Centrifuge model 5418 (Eppendorf, Germany)
- Cubee mini-centrifuge (GeneReach Biotechnology Corp., Taiwan)
- Vortex mixture model VM-300 (Germany Industrial Corp., Taiwan)
- AccuBlock™ Digital Dry Bath model D1100 (Labnet International, Inc., USA)
- -20°C Freezer (Sharp, Japan)
- DNA thermal cycle model T100™ (Bio-Rad, Laboratories, Inc., USA)
- Safe Image Transilluminator (Invitrogen™)
- Ice-box (Eppendorf, Germany)
- Microwave (Samsung, Korea)
- Pioneer™ electronic balance model PA413 (Ohaus Instruments Co., Ltd., USA)
- Electrophoresis chamber and power supply (Cosmo Bio Co., Ltd., USA)
- Whatman® Laboratory sealing film (Fisher Scientific Co., Ltd., UK)

## สารเคมี

- FavorPrep™ Tissue Genomic DNA Extraction Mini Kit (Favorgen Biotech corp., Taiwan)
- Agarose NuSieve powder (Lonza, Inc., USA)
- Agarose powder (EMD Chemicals, Inc., USA)
- 10  $\mu$ M Gram6, Gram8, Gram11, Gram17, Gram20, Gram22, Gram24, Gram25, Gram30, Gram31, Gram32a, Gram41, Gram42 และ Gram45 primers (forward และ reverse primers)
- 10  $\mu$ M Gram6, Gram8, Gram11, Gram17, Gram20, Gram22, Gram24, Gram25, Gram30, Gram31, Gram32a, Gram41, Gram42 และ Gram45 primers 5' fluorescent-labeled primer (6-FAM™) (Macrogen, Inc., Korea)
- 10  $\mu$ M Gpa01, Gpa11, Gpa12, Gpa14, Gpa24, Gpa33, Gpa33, Gpa34, Gpa35, Gpa36, Gpa37, Gpa38, Gpa39 และ Gpa41 (forward และ reverse primers)
- 10  $\mu$ M Gpa11, Gpa12, Gpa14, Gpa33, Gpa33, Gpa34, Gpa35, Gpa36, Gpa37, Gpa38, Gpa39 และ Gpa41 (6-FAM™) (Macrogen, Inc., Korea)
- 10,000X SYBR® Safe DNA gel stain
- 100  $\mu$ g/ml 100 bp DNA ladder
- 200 ng/ $\mu$ l 20 bp DNA ladder
- 2X EmeraldAmp MAX PCR Master Mix (Takara, Japan)
- 100% ethanol
- 0.5X TBE buffer
- Sterile distilled water
- MilliQ



## ภาคผนวก ข.

### การสกัดดีเอ็นเอ

ในการศึกษาครั้งนี้ได้สกัดดีเอ็นเอจากคอนชนของนกกระเรียนพันธุ์ไทยโดยใช้ชุดสารเคมีสำเร็จรูปสำหรับสกัดดีเอ็นเอ คือ FavorPrep™ Tissue Genomic DNA Extraction Mini Kit (Favorgen Biotech corp., Taiwan) โดยสกัดตามคู่มือการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเนื้อเยื่อ ดังนี้

1. ใช้กรรไกรที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วตัดบริเวณคอนชนของนกกระเรียนพันธุ์ไทยให้ได้ความยาวประมาณ 1 เซนติเมตร และตัดคอนชนนั้นให้ละเอียดมากที่สุด และใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ (microcentrifuge tube) ขนาด 1.5 ml จากนั้นเติม FATG1 buffer ปริมาตร 200  $\mu$ l ลงไปเพื่อทำให้เซลล์แตกและได้นิวเคลียสออกมา ทำลายเยื่อหุ้มนิวเคลียสให้ดีเอ็นเอละลายอยู่ในสารละลาย

2. เติมเอนไซม์ Proteinase K (11 mg/ml) ปริมาตร 9  $\mu$ l ตามลงไป นำไปวอร์เท็กซ์ (vortex) และ บ่ม (incubate) ที่ 60°C เป็นเวลาประมาณ 4 ชั่วโมง เพื่อย่อยสลายโปรตีนที่อยู่ภายในเนื้อเยื่อ

3. เติม FATG2 buffer ปริมาตร 200  $\mu$ l ลงใน sample mixture จากนั้นนำไป vortex และ incubate ต่อที่ 70°C เป็นเวลา 15 นาที

4. เติม 100% ethanol ปริมาตร 200  $\mu$ l ลงใน sample mixture จากนั้นนำไป vortex และนำไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ 14,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที เพื่อให้เนื้อเยื่อที่ไม่ผ่านการย่อยสลายตกตะกอนลงมาอยู่ที่ก้นหลอด

5. ประกอบ FATG mini column ให้เข้ากับ collection tube จากนั้นใช้ไมโครปิเปตต์ (micropipette) ดูดสารละลายส่วนใสที่ได้จากการ centrifuge ปริมาตร 560  $\mu$ l ใส่ลงใน FATG mini column และนำ column ไป centrifuge ที่ 14,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที หลังจาก centrifuge เสร็จ ดีเอ็นเอที่ต้องการจะติดอยู่กับแผ่น membrane ที่อยู่ภายใน FATG mini column เทสารละลายที่อยู่ภายใน collection tube ทิ้ง

6. เติม W1 buffer ปริมาตร 500  $\mu$ l ลงใน FATG mini column จากนั้นนำไป centrifuge ที่ 14,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ขั้นตอนนี้จะทำให้ดีเอ็นเอที่ต้องการที่ติดอยู่บริเวณ membrane มีความบริสุทธิ์มากขึ้น หลังจาก centrifuge เสร็จ เทสารละลายที่อยู่ภายใน collection tube ทิ้ง

7. เติม Wash buffer ปริมาตร 750  $\mu$ l ลงใน FATG mini column จากนั้นนำไป centrifuge ที่ 14,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ขั้นตอนนี้จะทำให้ดีเอ็นเอที่ต้องการที่ติดอยู่บริเวณ membrane มีความบริสุทธิ์มากยิ่งขึ้น หลังจาก centrifuge เสร็จ เทสารละลายที่อยู่ภายใน collection tube ทิ้ง และ นำ FATG mini column อันเดิมไป centrifuge ต่อที่ 14,000 rpm เป็นเวลา 3 นาที เพื่อให้ของเหลวที่ยังอาจหลงเหลืออยู่ตกลงมาใน collection tube ทั้งหมด

8. นำ FATG mini column ไปประกอบให้เข้ากับ microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml เติม elution buffer ปริมาตร 55  $\mu$ l ลงไป ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที จากนั้นนำไป centrifuge ที่ 14,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที เพื่อชะดีเอ็นเอที่ติดอยู่บริเวณ membrane ให้ตกลงมายัง microcentrifuge tube

9. เก็บรักษาดีเอ็นเอที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ 4°C



## ภาคผนวก ค.

### การตรวจสอบขนาดของแถบไมโครแซทเทลไลท์ (microsatellite band) ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis

โดยปกติแล้วการตรวจสอบขนาดของแถบไมโครแซทเทลไลท์จะใช้การตรวจสอบด้วย polyacrylamide gel แต่เนื่องด้วยวิธีดังกล่าวมีความซับซ้อน อีกทั้งผง polyacrylamide ยังมีความเป็นพิษต่อร่างกาย เพราะเป็นสารตั้งต้นที่ก่อให้เกิดมะเร็งในมนุษย์ได้ เพื่อให้เกิดความปลอดภัยผู้วิจัยจึงเลือกใช้ผง agarose NuSieve แทน เนื่องจากมีคุณสมบัติพิเศษกว่าผง agarose ทั่วไป นั่นคือ เมื่อเตรียม 3% agarose NuSieve จะทำให้สามารถแยกชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดต่ำกว่า 500 bp ได้ คุณสมบัติดังกล่าวเทียบเท่ากับการเตรียม 8% polyacrylamide gel ซึ่งเป็นความเข้มข้นของเจลที่นิยมนำมาใช้ในการตรวจสอบขนาดของ microsatellite bands

ขั้นตอนที่ผู้วิจัยเตรียม 3% agarose NuSieve สำหรับใช้ในการตรวจสอบขนาดของ microsatellite bands มีดังนี้

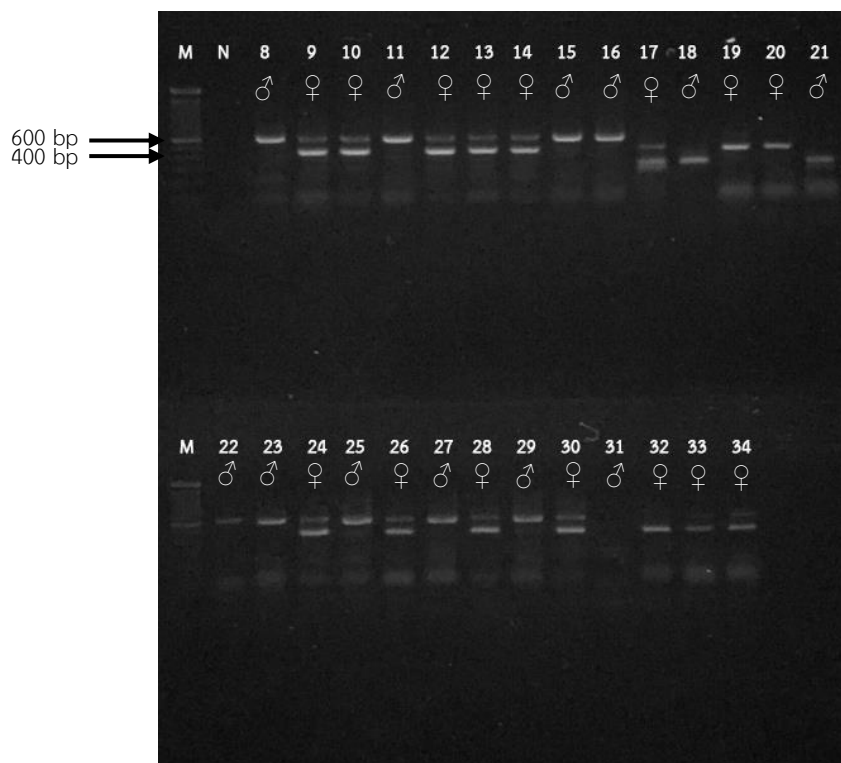
1. ชั่งผง agarose NuSieve ให้ได้น้ำหนัก 3 กรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ แล้วเท 0.5X TBE buffer ปริมาตร 100 ml ลงไป
2. นำไปต้มในไมโครเวฟ พอ buffer เริ่มเดือดเล็กน้อยให้หยุดการทำงานของไมโครเวฟแล้วนำขวดรูปชมพู่ออกมาสังเกต หากผง agarose NuSieve ยังไม่ละลายเข้ากับ buffer ให้ต้มต่อไปจนกว่าจะละลายเป็นเนื้อเดียวกัน หากละลายเข้ากันแล้วให้นำออกมาพักไว้ที่อุณหภูมิของเป็นเวลาประมาณ 5 นาที หรือมีอุณหภูมิอุ่นพอที่จะสามารถนำขวดรูปชมพู่มาสัมผัสกับผิวหนังได้
3. ใส่ 10,000X SYBR<sup>®</sup> Safe DNA gel stain ลงไป 3  $\mu$ l ใน 100 ml ซึ่ง SYBR<sup>®</sup> Safe เป็นสีย้อมที่มีคุณสมบัติคล้ายกับ ethidium bromide ที่สามารถแทรกตัวจับกับคู่เบสที่อยู่ภายในสายของดีเอ็นเอได้ เมื่อกระตุ้นด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ตจะปรากฏแถบดีเอ็นเอขึ้น
4. เท gel ที่เตรียมไว้ใส่ลงใน plate ที่เสียบ comb เรียบร้อยแล้ว ให้ได้ความสูงประมาณ 5 มิลลิเมตร รอจน gel แข็งตัว
5. ดึง comb ออก เช็ดเศษ gel ที่เกาะอยู่บน plate ออกให้หมด นำ plate ไปใส่ลงใน electrophoresis chamber แล้วเท 0.5X TBE buffer ให้ท่วม gel
6. หยอด PCR products ปริมาตร 5  $\mu$ l และหยอด 20 bp DNA ladder ปริมาตร 1  $\mu$ l เพื่อใช้เป็น DNA marker ในการบอกขนาดของ DNA ลงในหลุมเจล
7. เริ่มการทำงานของเครื่อง electrophoresis โดยใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ 100 โวลต์เป็นเวลา 90–120 นาที
8. นำ gel ไปส่องภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง UV transilluminator จากนั้นถ่ายภาพ gel ด้วยกล้องดิจิทัล Fujifilm X-A1

ภาคผนวก ง.

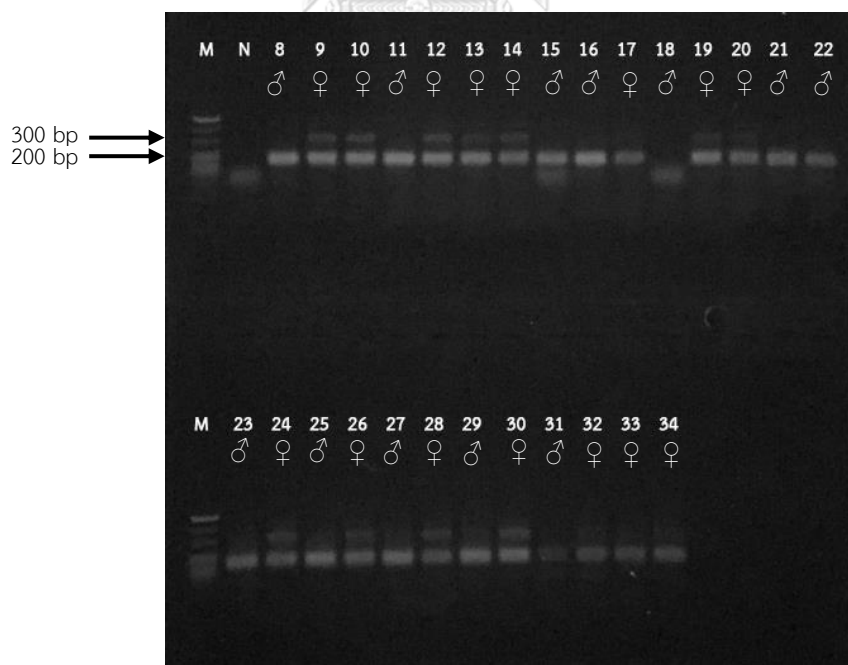
### การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเพื่อตรวจสอบเพศของนกกระเรียนด้วยชีววิทยาโมเลกุล (molecular sexing)

ในการระบุเพศของนกกระเรียนจากทั้งสองพื้นที่ที่ศึกษานอกจากจะใช้ความชำนาญของผู้ดูแลนกในการจำแนกเพศแล้ว ยังได้นำไพรเมอร์ที่มีประสิทธิภาพในการระบุเพศจากการศึกษาของ Insee (2013) มาใช้ยืนยันความถูกต้องด้วย เนื่องจากหากพิจารณาด้วยลักษณะสัณฐานภายนอกของนกกระเรียนแล้วอาจไม่สามารถแยกนกเพศผู้และเพศเมียออกจากกันได้ เพราะนกทั้งสองเพศมีลักษณะที่ใกล้เคียงกัน ในการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้ไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR ในตำแหน่ง EE0.6 โดยใช้ชุดของไพรเมอร์ AWS05/NRD4 และ SINT-F/SINT-R และ ยีน CHD โดยใช้ชุดของไพรเมอร์ 2550F/2718R จากนั้นตั้งโปรแกรมของเครื่อง thermal cycle ให้มีสภาวะ PCR ตามงานของ Insee (2013) และตรวจสอบขนาดของแบนด้วย 0.8% agarose gel electrophoresis

ผลการตรวจสอบเพศของนกกระเรียนพบว่าไพรเมอร์ทั้ง 3 ชุดสามารถใช้ในการระบุเพศของนกกระเรียนพันธุ์ไทยได้อย่างชัดเจนโดยสามารถทราบผลได้จากภาพเจล การตรวจสอบขนาดของ PCR product ของยีน CHD สามารถพิจารณาได้จากแบนขนาด 475 bp และ 635 bp โดยตัวอย่างนกเพศผู้จะปรากฏแบน 1 แบนที่ขนาด 635 bp แต่นกเพศเมียจะปรากฏแบน 2 แบนที่ขนาด 475 bp และ 635 bp (ภาพที่ 47) ในขณะที่การตรวจสอบขนาดของ PCR product ในตำแหน่ง EE0.6 สามารถพิจารณาได้จากแบนขนาด 150 bp และ 300 bp โดยตัวอย่างนกเพศผู้จะปรากฏแบน 1 แบนที่ขนาด 150 bp แต่นกเพศเมียจะปรากฏแบน 2 แบนที่ขนาด 150 bp และ 300 bp (ภาพที่ 48)



ภาพที่ 47 การตรวจสอบขนาดของ PCR product เพื่อระบุเพศของนกกระเรียนด้วยไพรเมอร์ 2550F/2718R เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในยีน CHD



ภาพที่ 48 การตรวจสอบขนาดของ PCR product เพื่อระบุเพศของนกกระเรียนโดยใช้ชุดไพรเมอร์ AWS05/NRD4 และ SINT-F/SINT-R เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในตำแหน่ง EE0.6

### ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวรังสิณี สันคม เกิดเมื่อวันที่ 24 มีนาคม พ.ศ. 2536 สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต จากภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2557 จากนั้นได้เข้าศึกษาต่อระดับปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ในสาขาวิชาสัตววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2558

#### ผลงาน

ได้รับรางวัล Outstanding Poster Award ในการประชุมวิชาการ International Conference of Agriculture and Natural Resources 2018 ในหัวข้อเรื่อง Genetic diversity assessment of captive eastern sarus crane in Thailand using microsatellite DNA markers ระหว่างวันที่ 26–28 เมษายน พ.ศ. 2561

ได้รับรางวัล The Best Oral Presentation ในงานประชุมวิชาการ Biological Sciences Graduate Congress ครั้งที่ 22 ณ National University of Singapore (NUS) ประเทศสิงคโปร์ ในหัวข้อเรื่อง Screening and application of microsatellite markers for genetic diversity analysis of eastern sarus crane in captivity ระหว่างวันที่ 19–21 ธันวาคม พ.ศ. 2560

เข้าร่วมการนำเสนอผลงานทางวิชาการของการประชุม Biological Sciences Graduate Congress ครั้งที่ 21 ณ University of Malaya (UM) ประเทศมาเลเซีย ในหัวข้อเรื่อง Screening and application of microsatellite markers for genetic diversity analysis of eastern sarus crane in captivity ระหว่างวันที่ 15–17 ธันวาคม พ.ศ. 2559

เข้าร่วมการนำเสนอผลงานทางวิชาการในรูปแบบโปสเตอร์ของการประชุม The Joint meeting of the 22nd International Congress of Zoology and the 87th meeting of Zoological Society of Japan ณ Okinawa Institute of Science and Technology Graduate University (OIST) และ Okinawa Convention Center (OCC) จังหวัดโอกินาวา ประเทศญี่ปุ่น ในหัวข้อเรื่อง Screening and application of microsatellite markers for genetic diversity analysis of eastern sarus crane in captivity ระหว่างวันที่ 14–18 พฤศจิกายน พ.ศ. 2559