



รายงานผลการดำเนินงาน

ปีงบประมาณ 2560

โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ  
สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี  
สนองพระราชดำริโดย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เรื่อง

การคัดเลือกเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอสำหรับนกกระเรียนพันธุ์ไทย  
(*Grus antigone sharpii*) ในสภาพกรงเลี้ยง

ผู้รับผิดชอบโครงการ

อาจารย์ ดร.อัมพร วิเวกแก้ว

อาจารย์ ดร.ณัฐพจน์ วาฤทธิ

นางสาวรังสินี สันคม

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รายงานผลการดำเนินงาน  
ปีงบประมาณ 2560

โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ  
สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี  
สนองพระราชดำริโดย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เรื่อง

การคัดเลือกเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอสำหรับนกกระเรียนพันธุ์ไทย  
(*Grus antigone sharpii*) ในสภาพกรงเลี้ยง

ผู้รับผิดชอบโครงการ

อาจารย์ ดร.อัมพร วิเวกแก้ว

อาจารย์ ดร.ณัฐพจน์ วาฤทธิ

นางสาวรังสิณี สันคม

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รายงานการวิจัย  
ทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินปี 2560

โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ  
สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี

เรื่อง  
การคัดเลือกเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอสำหรับนกกระเรียนพันธุ์ไทย  
(*Grus antigone sharpii*) ในสภาพกรงเลี้ยง  
Screening of microsatellite DNA markers for captive eastern sarus crane  
(*Grus antigone sharpii*)

อาจารย์ ดร.อัมพร วิเวกแก้ว (หัวหน้าโครงการ)  
อาจารย์ ดร.ณัฐพจน์ วาฤทธิ (ผู้ร่วมวิจัย)  
นางสาวรังสิณี สันคม (ผู้ร่วมวิจัย)  
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
พ.ศ. 2561

### กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2560 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี ขอขอบคุณ คุณสุรียา แสงพงศ์ ผู้อำนวยการสวนสัตว์เปิด เขาเขียวและคุณทรงกลด ภูทอง หัวหน้าสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเข้าไป เก็บตัวอย่างขนนกกระเรียนพันธุ์ไทย และขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัยที่ให้การสนับสนุนและอำนวยความสะดวกในทุกๆ ด้าน



### บทคัดย่อ

นกกระเรียนพันธุ์ไทย (*Grus antigone sharpii*) ได้สูญพันธุ์ไปจากธรรมชาติของประเทศไทย โดยมีสาเหตุหลักมาจากการสูญเสียแหล่งที่อยู่อาศัยบริเวณพื้นที่ชุ่มน้ำ ต่อมาได้มีการขอรับบริจาคคนกระเรียนพันธุ์ไทยจากประเทศกัมพูชามาเพาะเลี้ยงและขยายพันธุ์ในสภาพกรงเลี้ยง ซึ่งการเพาะเลี้ยงและขยายพันธุ์ไม่ต้องการเพิ่มจำนวนและอัตราความอยู่รอดของประชากรในสภาพกรงเลี้ยงเท่านั้น แต่ยังคงคำนึงถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากร ดังนั้นผู้วิจัยจึงใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ ตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกกระเรียนพันธุ์ไทยจากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว ( $n = 9$ ) และสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ ( $n = 17$ ) โดยเก็บตัวอย่างเส้นขนมาสกัดดีเอ็นเอ เพิ่มปริมาณไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ที่เคยใช้ศึกษาในนกกระเรียนกู่ (*G. americana*) จำนวน 14 คู่ รวมถึงหาจำนวนของอัลลีล ลำดับเบสซ้ำ จำนวนชุดการซ้ำ และค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมบริเวณโลคัส Gram6 ผลการศึกษาพบว่าไพรเมอร์ทั้งหมดสามารถใช้เพิ่มปริมาณไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอในจีโนมของนกกระเรียนพันธุ์ไทยได้ แต่มีเพียง 9 คู่ที่แสดงความเป็น polymorphism โดยลำดับเบสที่ซ้ำกัน คือ  $(AGGT)_n(AGAT)_n$  จำนวนของอัลลีลมีค่าเท่ากับ 6 ค่า observed และค่า expected heterozygosity เท่ากับ 0.7692 และ 0.7825 ตามลำดับ แสดงว่าประชากรนกกระเรียนพันธุ์ไทยในสภาพกรงเลี้ยงจาก 2 พื้นที่การศึกษามีความหลากหลายทางพันธุกรรมค่อนข้างสูงและค่า  $F_{ST}$  เท่ากับ 0.0274 แสดงว่าทั้ง 2 ประชากรมีอัลลีลร่วมกัน

**คำสำคัญ:** ความหลากหลายทางพันธุกรรม นกกระเรียนพันธุ์ไทย โพลีมอร์ฟิซึม ไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ เฮเทอโรไซโกซิตี

## Abstract

*Grus antigone sharpii* is the only crane species that was reported in Thailand, though it has become extinct in the wild due to the depletions of its natural habitats and food sources. The Thai government with the Cambodian collaboration has tried to repopulate *G. a. sharpii* using wild Cambodian specimens as an initial breeding stock. Captive breeding can increase the population size and survivorship of the *G. a. sharpii* in Thailand, but the genetic diversity of the crane are also of immense importance as well, since the fixation of unfavorable alleles may drive the reemerging population to become extinct again. In this study, 14 microsatellite primers isolated from a closely related species of *G. a. sharpii*, the whooping crane (*G. americana*), were used to screened 26 *G. a. sharpii* individuals collected from Khao Kheow open zoo (n = 9) and Bangpra water bird research center (n = 17). Our results show that all of the 14 primers are successfully amplified however, only 9 pairs exhibit polymorphisms. The repeated sequences of the Gram6 locus is (AGGT)<sub>n</sub>(AGAT)<sub>n</sub>, with a total number of alleles at this locus at 6. The observed ( $H_O$ ) and expected heterozygosities ( $H_E$ ) are 0.7692 and 0.7825, respectively; albeit,  $H_O$  is lower than  $H_E$ , the Hardy-Weinberg equilibrium is attained at this locus ( $p > 0.05$ ). The  $F$  coefficient suggests that the populations from the two breeding stocks share many common alleles ( $F_{ST} = 0.0274$ ,  $p < 0.05$ ). Our result suggests that the breeding stocks may be suitable for future re-habitation initiatives of the *G. a. sharpii* in Thailand.

**Keywords:** genetic diversity, eastern sarus crane, polymorphism, microsatellite DNA, heterozygosity

## สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ข
บทคัดย่อภาษาไทย	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
สารบัญ	จ
สารบัญรูปภาพ	ฉ
สารบัญตาราง	ฎ
บทที่ 1 บทนำ	
– บทนำและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	1
– เอกสารที่เกี่ยวข้อง	3
– วัตถุประสงค์ของโครงการ	5
บทที่ 2 วิธีการดำเนินงาน	
– วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี	6
– สถานที่ศึกษาและการเก็บตัวอย่าง	7
– ขั้นตอนการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลองในห้องปฏิบัติการ	7
บทที่ 3 ผลการทดลอง	
– ผลการเก็บตัวอย่าง	14
– ผลการสกัดดีเอ็นเอ	15
– ผลการคัดเลือกเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์	15
– ผลการทำ genotyping ด้วยวิธี GeneScan	23
– ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ไมโครแซทเทลไลท์	31
– ผลการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม	31
บทที่ 4 วิจารณ์และสรุปผลการศึกษา	
– วิจารณ์ผลการศึกษา	33
– สรุปผลการศึกษา	34
เอกสารอ้างอิง	35

## สารบัญรูปภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของนกกระเรียนเพศผู้และนกกระเรียนเพศเมีย	3
ภาพที่ 2 การตรวจสอบขนาด microsatellite bands ด้วยวิธี 3% agarose MS gelelectrophoresis ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 120 นาที ของตัวอย่างนกกระเรียนพันธุ์ไทยจากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว (ตัวอย่างหมายเลข 8-16) และสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ (ตัวอย่างหมายเลข 17-33) โดยใช้ไพรเมอร์ Gram6	16
ภาพที่ 3 การตรวจสอบขนาด microsatellite bands ด้วยวิธี 3% agarose MS gelelectrophoresis ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 120 นาที ของตัวอย่างนกกระเรียนพันธุ์ไทยจากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว (ตัวอย่างหมายเลข 8-16) และสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ (ตัวอย่างหมายเลข 17-33) โดยใช้ไพรเมอร์ Gram8	16
ภาพที่ 4 การตรวจสอบขนาด microsatellite bands ด้วยวิธี 3% agarose MS gelelectrophoresis ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 120 นาที ของตัวอย่างนกกระเรียนพันธุ์ไทยจากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว (ตัวอย่างหมายเลข 8-16) และสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ (ตัวอย่างหมายเลข 17-33) โดยใช้ไพรเมอร์ Gram11	17
ภาพที่ 5 การตรวจสอบขนาด microsatellite bands ด้วยวิธี 3% agarose MS gelelectrophoresis ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 120 นาที ของตัวอย่างนกกระเรียนไทยพันธุ์จากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว (ตัวอย่างหมายเลข 8-16) และสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ (ตัวอย่างหมายเลข 17-33) โดยใช้ไพรเมอร์ Gram17	17
ภาพที่ 6 การตรวจสอบขนาด microsatellite bands ด้วยวิธี 3% agarose MS gelelectrophoresis ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 120 นาที ของตัวอย่างนกกระเรียนพันธุ์ไทยจากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว (ตัวอย่างหมายเลข 8-16) และสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ (ตัวอย่างหมายเลข 17-33) โดยใช้ไพรเมอร์ Gram20	18

## สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

	หน้า
<p><b>ภาพที่ 7</b> การตรวจสอบขนาด microsatellite bands ด้วยวิธี 3% agarose MS gelelectrophoresis ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 120 นาที ของตัวอย่างนกระเรียนพันธุ์ไทยจากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว (ตัวอย่างหมายเลข 8-16) และสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ (ตัวอย่างหมายเลข 17-33) โดยใช้ไพรเมอร์ Gram22</p>	18
<p><b>ภาพที่ 8</b> การตรวจสอบขนาด microsatellite bands ด้วยวิธี 3% agarose MS gelelectrophoresis ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 120 นาที ของตัวอย่างนกระเรียนพันธุ์ไทยจากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว (ตัวอย่างหมายเลข 8-16) และสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ (ตัวอย่างหมายเลข 17-33) โดยใช้ไพรเมอร์ Gram24</p>	19
<p><b>ภาพที่ 9</b> การตรวจสอบขนาด microsatellite bands ด้วยวิธี 3% agarose MS gelelectrophoresis ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 120 นาที ของตัวอย่างนกระเรียนพันธุ์ไทยจากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว (ตัวอย่างหมายเลข 8-16) และสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ (ตัวอย่างหมายเลข 17-33) โดยใช้ไพรเมอร์ Gram25</p>	19
<p><b>ภาพที่ 10</b> การตรวจสอบขนาด microsatellite bands ด้วยวิธี 3% agarose MS gelelectrophoresis ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 120 นาที ของตัวอย่างนกระเรียนพันธุ์ไทยจากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว (ตัวอย่างหมายเลข 8-16) และสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ (ตัวอย่างหมายเลข 17-33) โดยใช้ไพรเมอร์ Gram30</p>	20
<p><b>ภาพที่ 11</b> การตรวจสอบขนาด microsatellite bands ด้วยวิธี 3% agarose MS gelelectrophoresis ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 120 นาที ของตัวอย่างนกระเรียนพันธุ์ไทยจากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว (ตัวอย่างหมายเลข 8-16) และสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ (ตัวอย่างหมายเลข 17-33) โดยใช้ไพรเมอร์ Gram31</p>	20

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

	หน้า
<p>ภาพที่ 12 การตรวจสอบขนาด microsatellite bands ด้วยวิธี 3% agarose MS gelelectrophoresis ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 120 นาที ของตัวอย่างนกระเรียนพันธุ์ไทยจากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว (ตัวอย่างหมายเลข 8-16) และสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ (ตัวอย่างหมายเลข 17-33) โดยใช้ไพรเมอร์ Gram32a</p>	21
<p>ภาพที่ 13 การตรวจสอบขนาด microsatellite bands ด้วยวิธี 3% agarose MS gelelectrophoresis ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 120 นาที ของตัวอย่างนกระเรียนพันธุ์ไทยจากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว (ตัวอย่างหมายเลข 8-16) และสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ (ตัวอย่างหมายเลข 17-33) โดยใช้ไพรเมอร์ Gram41</p>	21
<p>ภาพที่ 14 การตรวจสอบขนาด microsatellite bands ด้วยวิธี 3% agarose MS gelelectrophoresis ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 120 นาที ของตัวอย่างนกระเรียนพันธุ์ไทยจากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว (ตัวอย่างหมายเลข 8-16) และสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ (ตัวอย่างหมายเลข 17-33) โดยใช้ไพรเมอร์ Gram42</p>	22
<p>ภาพที่ 15 การตรวจสอบขนาด microsatellite bands ด้วยวิธี 3% agarose MS gelelectrophoresis ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 120 นาที ของตัวอย่างนกระเรียนพันธุ์ไทยจากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว (ตัวอย่างหมายเลข 8-16) และสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ (ตัวอย่างหมายเลข 17-33) โดยใช้ไพรเมอร์ Gram45</p>	22
<p>ภาพที่ 16 electropherogram ของการทำ genotyping ด้วยวิธี GeneScan ของตัวอย่างที่ 8 ที่โลคัส Gram6</p>	23
<p>ภาพที่ 17 electropherogram ของการทำ genotyping ด้วยวิธี GeneScan ของตัวอย่างที่ 9 ที่โลคัส Gram6</p>	23
<p>ภาพที่ 18 electropherogram ของการทำ genotyping ด้วยวิธี GeneScan ของตัวอย่างที่ 10 ที่โลคัส Gram6</p>	23
<p>ภาพที่ 19 electropherogram ของการทำ genotyping ด้วยวิธี GeneScan ของตัวอย่างที่ 11 ที่โลคัส Gram6</p>	24

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

	หน้า
ภาพที่ 20 electropherogram ของการทำ genotyping ด้วยวิธี GeneScan ของตัวอย่างที่ 12 ที่โลคัส Gram6	24
ภาพที่ 21 electropherogram ของการทำ genotyping ด้วยวิธี GeneScan ของตัวอย่างที่ 13 ที่โลคัส Gram6	24
ภาพที่ 22 electropherogram ของการทำ genotyping ด้วยวิธี GeneScan ของตัวอย่างที่ 14 ที่โลคัส Gram6	24
ภาพที่ 23 electropherogram ของการทำ genotyping ด้วยวิธี GeneScan ของตัวอย่างที่ 15 ที่โลคัส Gram6	25
ภาพที่ 24 electropherogram ของการทำ genotyping ด้วยวิธี GeneScan ของตัวอย่างที่ 16 ที่โลคัส Gram6	25
ภาพที่ 25 electropherogram ของการทำ genotyping ด้วยวิธี GeneScan ของตัวอย่างที่ 17 ที่โลคัส Gram6	25
ภาพที่ 26 electropherogram ของการทำ genotyping ด้วยวิธี GeneScan ของตัวอย่างที่ 18 ที่โลคัส Gram6	25
ภาพที่ 27 electropherogram ของการทำ genotyping ด้วยวิธี GeneScan ของตัวอย่างที่ 19 ที่โลคัส Gram6	26
ภาพที่ 28 electropherogram ของการทำ genotyping ด้วยวิธี GeneScan ของตัวอย่างที่ 20 ที่โลคัส Gram6	26
ภาพที่ 29 electropherogram ของการทำ genotyping ด้วยวิธี GeneScan ของตัวอย่างที่ 21 ที่โลคัส Gram6	26
ภาพที่ 30 electropherogram ของการทำ genotyping ด้วยวิธี GeneScan ของตัวอย่างที่ 22 ที่โลคัส Gram6	26
ภาพที่ 31 electropherogram ของการทำ genotyping ด้วยวิธี GeneScan ของตัวอย่างที่ 23 ที่โลคัส Gram6	27
ภาพที่ 32 electropherogram ของการทำ genotyping ด้วยวิธี GeneScan ของตัวอย่างที่ 24 ที่โลคัส Gram6	27
ภาพที่ 33 electropherogram ของการทำ genotyping ด้วยวิธี GeneScan ของตัวอย่างที่ 25 ที่โลคัส Gram6	27

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

	หน้า
ภาพที่ 34 electropherogram ของการทำ genotyping ด้วยวิธี GeneScan ของตัวอย่างที่ 26 ที่โลคัส Gram6	27

ภาพที่ 35 electropherogram ของการทำ genotyping ด้วยวิธี GeneScan ของตัวอย่างที่ 27 ที่โลคัส Gram6	28
ภาพที่ 36 electropherogram ของการทำ genotyping ด้วยวิธี GeneScan ของตัวอย่างที่ 28 ที่โลคัส Gram6	28
ภาพที่ 37 electropherogram ของการทำ genotyping ด้วยวิธี GeneScan ของตัวอย่างที่ 29 ที่โลคัส Gram6	28
ภาพที่ 38 electropherogram ของการทำ genotyping ด้วยวิธี GeneScan ของตัวอย่างที่ 30 ที่โลคัส Gram6	28
ภาพที่ 39 electropherogram ของการทำ genotyping ด้วยวิธี GeneScan ของตัวอย่างที่ 31 ที่โลคัส Gram6	29
ภาพที่ 40 electropherogram ของการทำ genotyping ด้วยวิธี GeneScan ของตัวอย่างที่ 32 ที่โลคัส Gram6	29
ภาพที่ 41 electropherogram ของการทำ genotyping ด้วยวิธี GeneScan ของตัวอย่างที่ 33 ที่โลคัส Gram6	29



## สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 ไพรมอร์และอุณหภูมิที่ใช้ในขั้นตอน annealing ( $T_A$ ) ของไพรมอร์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้	10
ตารางที่ 2 ผลการเก็บตัวอย่างขนนกกระเรียนพันธุ์ไทยจากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว (เขาเขียว) และสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ (บางพระ)	14
ตารางที่ 3 ขนาดและรูปแบบของอัลลีลของตัวอย่างนกกระเรียนพันธุ์ไทยทั้ง 26 ตัวอย่างที่ไลค์ส Gram6	30
ตารางที่ 4 ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ซ้ำกันและจำนวนชุดการซ้ำของลำดับ นิวคลีโอไทด์ที่ไลค์ส Gram6	31
ตารางที่ 5 ค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรนกกระเรียนพันธุ์ไทย ในสภาพกรงเลี้ยงของสวนสัตว์เปิดเขาเขียวและสถานีวิจัยเพาะเลี้ยง นกน้ำบางพระ เมื่อพิจารณาที่ไลค์ส Gram6	31

การคัดเลือกเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอสำหรับนกกระเรียนพันธุ์ไทย  
*(Grus antigone sharpii)* ในสภาพกรงเลี้ยง  
 Screening of microsatellite DNA markers for captive eastern sarus crane  
*(Grus antigone sharpii)*

อัมพร วิเวกแว่ว, ณัฐพจน์ วาฤทธิ และ รังสินี สันคม  
 Amporn Wiwegweaw, Natapot Warrit and Rangsee Sankhom

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถนนพญาไท แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน  
 กรุงเทพฯ 10330

Department of Biology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Phayathai  
 Road, Pathumwan, Bangkok, 10330

บทนำและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

นกกระเรียน (crane) เป็นนกน้ำที่มีรูปร่างสวยงาม สูงโปร่ง มีคอและขายาว จัดอยู่ในวงศ์ Gruidae พบได้ 15 ชนิดทั่วโลก กระจายตัวอยู่ในเขตเอเชียตะวันออกเฉียง ออสเตรเลีย อเมริกาเหนือและแอฟริกา (Meine & Archibald, 1996) ในประเทศไทยพบนกกระเรียนเพียงชนิดเดียว คือ *Grus antigone* ซึ่งแบ่งได้เป็น 4 ชนิดพันธุ์ย่อย คือ นกกระเรียนอินเดีย (Indian sarus crane: *Grus antigone antigone*), นกกระเรียนออสเตรเลีย (Australian sarus crane: *Grus antigone gillae*), นกกระเรียนเกาะลูซอน (Philippine sarus crane: *Grus antigone luzonica*) และนกกระเรียนพันธุ์ไทย (eastern sarus crane: *Grus antigone sharpii*) ซึ่งเป็นชนิดพันธุ์ย่อยที่เคยพบในประเทศไทยในอดีต นกกระเรียนพันธุ์ไทยมีแหล่งที่อยู่อาศัยบริเวณพื้นที่ชุ่มน้ำและที่ราบลุ่ม แหล่งอาหารจะมีทั้งพืชและสัตว์ พืชที่เป็นอาหารส่วนใหญ่จะเป็นพวกเมล็ดพืช เมื่อมีการบุกรุกแหล่งเพาะปลูกทางการเกษตรไปเป็นแหล่งที่อยู่อาศัยของมนุษย์และมีการเปลี่ยนแปลงพืชที่ใช้เพาะปลูกทางการเกษตรทำให้แหล่งที่อยู่อาศัยและแหล่งอาหารของนกกระเรียนพันธุ์ไทยลดลง ส่งผลให้นกกระเรียนพันธุ์ไทยสูญพันธุ์ไปจากธรรมชาติของประเทศไทยในอดีต (Sanguansombat, 2005) จากเหตุการณ์ดังกล่าว ต่อมา ประเทศไทยได้ตระหนักถึงความสำคัญของนกกระเรียนพันธุ์ไทยและได้มีความพยายามของหน่วยงานหรือองค์การสวนสัตว์ต่างๆ ในการคืนชีวิตให้กับนกกระเรียนพันธุ์ไทยได้กลับมาอาศัยอยู่ในถิ่นธรรมชาติเดิมในประเทศไทย โดยสวนสัตว์นครราชสีมา จังหวัดนครราชสีมา เป็นแหล่งเพาะพันธุ์นกกระเรียนพันธุ์ไทยแห่งแรกของประเทศไทย โดยได้ขอรับบริจาคคนกระเรียนที่มีถิ่นกำเนิดในประเทศกัมพูชา มาศึกษาวิธีการเพาะเลี้ยงและขยายพันธุ์ในสภาพกรงเลี้ยง (Meine & Archibald, 1996) ต่อมาสวนสัตว์เปิดเขาเขียว และสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ จังหวัดชลบุรี สามารถเพาะเลี้ยงและขยายพันธุ์นกกระเรียนพันธุ์ไทยในสภาพกรงเลี้ยงได้เช่นกัน ซึ่งการเพาะเลี้ยงและขยายพันธุ์นกกระเรียนไม่ได้ต้องการเพียงแค่เพิ่มปริมาณ

ประชากรในกรงเลี้ยงเพื่อนำไปปล่อยคืนสู่ธรรมชาติเท่านั้น แต่ยังคงคำนึงถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากรในสภาพกรงเลี้ยงด้วย เพื่อความอยู่รอดของนกในสภาพแวดล้อมธรรมชาติที่อาจมีการเปลี่ยนแปลงอย่างฉับพลันหรือมีการแพร่ระบาดของเชื้อโรค การมีความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ต่ำ (เช่น เกิดการผสมพันธุ์กันภายในเครือญาติ) จะทำให้นกกระเรียนพันธุ์ไทยมีสุขภาพที่ไม่แข็งแรง เจ็บป่วย ติดเชื้อโรคได้ง่าย และไม่สามารถทนทานต่อการคัดเลือกโดยธรรมชาติได้ จนสุดท้ายแล้วประชากรของนกกระเรียนก็อาจจะสูญพันธุ์ไปจากธรรมชาติอีกครั้ง ดังนั้นการประเมินค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรนกกระเรียนพันธุ์ไทยในสภาพกรงเลี้ยงก่อนทำการปล่อยคืนสู่ธรรมชาติจึงถือเป็นขั้นตอนสำคัญในการคืนชีวิตในกับนกกระเรียนพันธุ์ไทยอย่างยั่งยืน ทั้งนี้หากประชากรนกสามารถดำรงชีวิตอยู่ในธรรมชาติได้สำเร็จ สถานภาพทางการอนุรักษ์ของนกกระเรียนพันธุ์ไทยอาจยกระดับจากสถานภาพสูญพันธุ์แล้วจากธรรมชาติของประเทศไทยเป็นสถานภาพของสิ่งมีชีวิตที่มีความเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ นอกจากนี้ยังเป็นการบ่งบอกความอุดมสมบูรณ์ของแหล่งพื้นที่ชุ่มน้ำและความเหมาะสมที่จะใช้พื้นที่เหล่านั้นเป็นแหล่งที่อยู่อาศัยของนก (ภูวดล โภภณเทียร, 2555) ทั้งยังเป็นการเชื่อมเส้นทางการอยู่อาศัยของนกกระเรียนพันธุ์ไทยในเขตภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ได้อีกด้วย (นุชจรี พิษคุณ, 2556)

การพิจารณาค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมสามารถดูได้จากค่า heterozygosity ซึ่งจะบอกสัดส่วนของอัลลีลแบบ heterozygous ของประชากร (Nei & Roychoudhury, 1974) ความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรนกกระเรียนพันธุ์ไทยในสภาพกรงเลี้ยงจะมีค่าสูงถ้าหากมีการคัดเลือกพันธุ์ของประชากรตั้งต้นที่ดี เพราะฉะนั้นการคัดเลือกพันธุ์นกกระเรียนพันธุ์ไทยให้มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงจึงเป็นขั้นตอนที่สำคัญก่อนการปล่อยนกกระเรียนสู่ธรรมชาติ (นุชจรี พิษคุณ, 2556) แต่เนื่องด้วยการหาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยวิธีไมโครแซทเทลไลท์ที่เอ็นเอในนกกระเรียนพันธุ์ไทยของประเทศไทยยังไม่เคยมีรายงานการศึกษามาก่อนจึงทำให้ในขั้นต้นจำเป็นต้องมีการคัดเลือกไพรเมอร์จากนกกระเรียนชนิดอื่นซึ่งมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันทางวิวัฒนาการที่เคยมีการศึกษามาก่อนหน้านี้แล้ว มาใช้ในการเพิ่มปริมาณไมโครแซทเทลไลท์ที่เอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ เรียกการคัดเลือกไพรเมอร์วิธีนี้ว่า cross-species amplification โดยในการศึกษาครั้งนี้ได้นำไพรเมอร์ที่เคยใช้ศึกษาในนกกระเรียนกุ่ม จำนวน 14 คู่ (Jones et al., 2010) มาเพิ่มปริมาณไมโครแซทเทลไลท์ที่เอ็นเอของนกกระเรียนพันธุ์ไทย เนื่องจากนกกระเรียนกุ่มมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันทางวิวัฒนาการกับนกกระเรียนไทยมากที่สุด

### เอกสารที่เกี่ยวข้อง

นกกระเรียนจัดอยู่ในวงศ์ Gruidae พบได้ 15 ชนิดกระจายตัวอยู่ในเขตเอเชียตะวันออกเฉียง ออสเตรเลีย อเมริกาเหนือและแอฟริกา (Meine & Archibald, 1996) ในประเทศไทยพบนกกระเรียนเพียงชนิดเดียว คือ *Grus antigone* ซึ่งแบ่งได้เป็น 4 ชนิดย่อย คือ นกกระเรียนอินเดีย (Indian sarus crane: *Grus antigone antigone*) มีขนาดใหญ่ที่สุดในกลุ่มนกกระเรียน มีปลอกคอสีขาวคั่นอยู่ระหว่างคอตอนบนและคอตอนล่าง และขนตามลำตัวมีสีเทา นกกระเรียนพันธุ์ไทย (eastern sarus crane: *Grus antigone sharpii*) เป็นชนิดย่อยที่เคยพบในประเทศไทย (Tanee et al., 2009) มีขนาดใหญ่รองลงมา ไม่มีปลอกคอสีขาวอยู่บริเวณคอ และมีขนตามลำตัวสีเทาเข้มกว่านกกระเรียนอินเดีย ปัจจุบันกระจายตัวอยู่ในประเทศจีน พม่า กัมพูชา และเวียดนาม นกกระเรียนออสเตรเลีย (Australian sarus crane: *Grus antigone gillae*) มีหนังเปลือกสีแดงอยู่

บริเวณคอแต่จะไม่แผ่ขยายเท่ากับชนิดย่อยอื่นๆ (Archibald et al., 2003) และนกกระเรียนเกาะลูซอน (Philippine sarus crane: *Grus antigone luzonica*) นกกระเรียนชนิดย่อยนี้พบได้ที่ประเทศฟิลิปปินส์ เท่านั้นซึ่งขณะนี้ได้สูญพันธุ์แล้ว (Meine & Archibald, 1996) ลักษณะทางสัณฐานของนกกระเรียนเพศผู้และเพศเมียนั้นไม่มีความแตกต่างกัน แต่สามารถแยกเพศได้จากการดูขนาดตัว โดยนกกระเรียนเพศผู้จะมีขนาดตัวใหญ่กว่าเพศเมียอย่างชัดเจน (นุชจรี พีชคุณ, 2556) (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 นกกระเรียนทางตอนเหนือของเกาะลูซอน (ซ้าย) และนกกระเรียนเกาะลูซอน (ขวา)

สาเหตุหลักที่ทำให้จำนวนของนกกระเรียนพันธุ์ไทยลดลง คือการที่มนุษย์เข้ารุกรานแหล่งพื้นที่ชุ่มน้ำ ซึ่งเป็นแหล่งที่อยู่อาศัย (ภูวตล โกมณเทียร, 2555; Wood & Krajewski, 1996) จนในปัจจุบัน กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพันธุ์พืช และองค์การสวนสัตว์ในพระบรมราชูปถัมภ์ได้จัดให้นกกระเรียนพันธุ์ไทยอยู่ในบัญชีรายชื่อ 1 ใน 15 ชนิดสัตว์ป่าสงวนของประเทศไทย ตามพระราชบัญญัติสงวนและคุ้มครองสัตว์ป่า พ.ศ. 2535 และสำนักงานโครงการพัฒนาแห่งสหประชาชาติ (UNDP) จัดนกกระเรียนพันธุ์ไทยให้อยู่ในสถานภาพสูญพันธุ์แล้วจากธรรมชาติของประเทศไทย (Sanguansombat, 2005) การคืนชีวิตของนกกระเรียนพันธุ์ไทยให้กลับมาอาศัยอยู่ในถิ่นธรรมชาติเดิมของประเทศไทยได้ไม่เพียงแต่จะเป็นการยกระดับสถานภาพทางอนุรักษ์เท่านั้น แต่ยังเป็นการบ่งบอกความอุดมสมบูรณ์ของแหล่งพื้นที่ชุ่มน้ำและความเหมาะสมที่จะใช้พื้นที่เหล่านั้นเป็นแหล่งที่อยู่อาศัยของนกกระเรียนไทย (ภูวตล โกมณเทียร, 2555) ทั้งยังเป็นการเชื่อมเส้นทางที่อยู่อาศัยของนกกระเรียนพันธุ์ไทยในเขตภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ได้อีกด้วย (นุชจรี พีชคุณ, 2556)

สวนสัตว์นครราชสีมา จังหวัดนครราชสีมา เป็นแหล่งเพาะพันธุ์นกกระเรียนไทยแห่งแรกของประเทศไทย โดยได้ขอรับบริจาคคนกกระเรียนพันธุ์ไทยที่มีถิ่นกำเนิดในประเทศกัมพูชา มาศึกษาวิธีการเพาะเลี้ยงและขยายพันธุ์ในสภาพกรงเลี้ยง (Meine & Archibald, 1996) ต่อมาสวนสัตว์เปิดเขาเขียวและสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ จังหวัดชลบุรี สามารถเพาะเลี้ยงและขยายพันธุ์นกกระเรียนพันธุ์ไทยในสภาพกรงเลี้ยงได้เช่นกันการเพาะเลี้ยงและขยายพันธุ์นกกระเรียนไม่ได้ต้องการเพิ่มปริมาณประชากรในกรงเลี้ยงเพื่อ

นำไปปล่อยสู่ถิ่นอาศัยเดิมได้เท่านั้น แต่ยังคงคำนึงถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากรนกในสภาพกรงเลี้ยงด้วย เพื่อความอยู่รอดของนกในสภาพแวดล้อมธรรมชาติที่อาจมีการเปลี่ยนแปลงอย่างฉับพลัน นกกระเรียนเป็นสัตว์หายาก มีพฤติกรรมการจับคู่ยากและเมื่อจับคู่ผสมพันธุ์แล้วจะผสมพันธุ์แบบคู่เดียวตลอดชีวิต เป็นเหตุให้ยากต่อการเพิ่มจำนวนประชากร ทั้งยังมีประชากรในธรรมชาติน้อยจึงเพิ่มโอกาสที่จะเกิดการผสมพันธุ์กันภายในเครือญาติ ทำให้ความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกต่ำลง (ธวัชชัยธานี, 2552) ผลเสียของการมีความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ต่ำจะทำให้ นกกระเรียนมีสุขภาพที่ไม่แข็งแรง เจ็บป่วย ติดเชื้อโรคได้ง่าย และไม่สามารถทนทานต่อการคัดเลือกโดยธรรมชาติ จนสุดท้ายแล้วประชากรของนกกระเรียนจะสูญพันธุ์

การพิจารณาค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมดูได้จากค่า heterozygosity วิธีไมโครแซทเทลไลท์ เป็นวิธีที่ศึกษาในระดับนิวคลีโอไทด์เอ็นเอที่สามารถแยกความแตกต่างทางพันธุกรรม (polymorphism) ได้ดี โดยมีลำดับเบสซ้ำกัน 2-6 เบสเป็นชุดๆ กระจายอยู่ทั่วจีโนม เช่น (AT)<sub>n</sub>, (CAG)<sub>n</sub> หรือ (GAAA)<sub>n</sub> จำนวนเบสซ้ำของสิ่งมีชีวิตที่แตกต่างกันนั้นทำให้เกิดความหลากหลายของอัลลีลในประชากรและสามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างอัลลีลแบบ homozygous และ heterozygous ได้ การหาค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมในประชากรนกกระเรียนพันธุ์ไทยด้วยวิธีไมโครแซทเทลไลท์นั้นยังไม่เคยมีรายงานการศึกษากับนกกระเรียนพันธุ์ไทยของประเทศไทยจึงทำให้ในขั้นต้นจำเป็นต้องมีการคัดเลือกไพรเมอร์จากนกกระเรียนชนิดอื่นซึ่งมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันทางวิวัฒนาการที่เคยมีการศึกษามาก่อนหน้านี้แล้ว มาใช้ในการเพิ่มปริมาณไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ เรียกการคัดเลือกไพรเมอร์วิธีนี้ว่า cross-species amplification ในการศึกษาครั้งนี้ได้นำไพรเมอร์ที่เคยใช้ศึกษาในนกกระเรียนกู่ (Whooping crane: *Grus americana*) จำนวน 14 คู่ (Jones et al., 2010) มาเพิ่มปริมาณไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอของนกกระเรียนไทย เนื่องจากนกกระเรียนกู่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันทางวิวัฒนาการกับนกกระเรียนไทยมากที่สุด (Krajewski et al., 2010) ผลการศึกษาในครั้งนี้จะเป็นฐานข้อมูลเบื้องต้นในการหาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์เพื่อใช้ในการประเมินค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกกระเรียนไทยในสภาพกรงเลี้ยง เพื่อใช้เป็นแนวทางในการเพาะเลี้ยงขยายพันธุ์และอนุรักษ์นกกระเรียนไทยในสภาพกรงเลี้ยงก่อนปล่อยสู่ธรรมชาติ อีกทั้งยังเป็นประโยชน์ต่อโครงการปล่อยนกกระเรียนไทยคืนถิ่นให้ได้นกกระเรียนไทยที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง และสามารถปรับตัวกับสิ่งแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไปได้ นกกระเรียนไทยจะได้กลับมาดำรงชีวิตในธรรมชาติได้อีกครั้ง

#### วัตถุประสงค์ของโครงการ

เพื่อคัดเลือกเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ที่สามารถนำมาใช้กับนกกระเรียนพันธุ์ไทย (*Grus antigone sharpii*) ในสภาพกรงเลี้ยงด้วยวิธี cross-species amplification

## วิธีการดำเนินงาน

### 2.1. วัสดุ อุปกรณ์และสารเคมี

#### วัสดุและอุปกรณ์

- กรรไกรผ่าตัด
- Forceps
- หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ (microcentrifuge tube) ขนาด 0.2, 0.5 และ 1.5 ml (Treff<sup>®</sup> Switzerland)
- ถุงมือยาง
- Automatic micropipette P2, P10, P20, P200 และ P1000 (Harikul Science Co., Ltd., Thailand)
- 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<sup>®</sup> Laboratory sealing film (Fisher Scientific Co., Ltd., UK)

#### สารเคมี

- FavorPrep™ Tissue Genomic DNA Extraction Mini Kit (Favorgen Biotech corp., Taiwan)
- Agarose MS powder (Axygen Scientific, Inc., USA)
- Agarose powder (EMD Chemicals, Inc., USA)
- 10 µM Gram6, Gram8, Gram11, Gram17, Gram20, Gram22, Gram24, Gram25, Gram30, Gram31, Gram32a, Gram41, Gram42 and Gram45 primers (forward และ reverse primers)
- 10 µM Gram6R 5' fluorescent-labeled primer (6-FAM™) (Macrogen, Inc., Korea)
- 10,000X SYBR<sup>®</sup> Safe DNA gel stain

- 100 µg/ml 100 bp DNA ladder
- 200 ng/µl 20 bp DNA ladder
- 2X EmeraldAmp MAXPCR Master Mix (Takara, Japan)
- 100% ethanol
- 0.5X TBE buffer
- Sterile distilled water
- MilliQ

## 2.2. วิธีการดำเนินงาน

### 2.2.1. สถานที่ศึกษาและการเก็บตัวอย่าง

#### สถานที่ศึกษา

1. สวนสัตว์เปิดเขาเขียว ตำบลบางพระ อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี
2. สถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ ตำบลบางพระ อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี

#### การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างขนนกกระเรียนพันธุ์ไทยที่สวนสัตว์เปิดเขาเขียวจำนวน 9 ตัว และสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระจำนวน 17 ตัว นำตัวอย่างขนนกที่เก็บได้กลับมายังห้องปฏิบัติการ ใช้กรรไกรที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ตัดเฉพาะบริเวณโคนขนและเก็บโคนขนแต่ละอันใส่ถุงซิปล็อคที่ติดฉลากข้อมูล โดยถุงซิปล็อคต้องผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากเชื้อราและแบคทีเรีย จากนั้นเก็บรักษาตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิห้องในห้องปฏิบัติการ

### 2.2.2. ขั้นตอนการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลองในห้องปฏิบัติการ

ประกอบด้วย 6 ขั้นตอน ดังนี้

- 2.2.2.1. การสกัดดีเอ็นเอ
- 2.2.2.2. การเพิ่มปริมาณไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน (Polymerase Chain Reaction: PCR)
- 2.2.2.3. การตรวจสอบขนาดของแถบไมโครแซทเทลไลท์ (microsatellite bands) ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis
- 2.2.2.4. การทำ genotyping ด้วยวิธี GeneScan
- 2.2.2.5. การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ไมโครแซทเทลไลท์ (microsatellite products)
- 2.2.2.6. การวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรม

#### 2.2.2.1. การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากโคนขนของนกกระเรียนไทยโดยใช้ชุดสารเคมีสำเร็จรูปสำหรับสกัด ดีเอ็นเอ คือ FavorPrep™ Tissue Genomic DNA Extraction Mini Kit (Favorgen Biotech corp., Taiwan) โดยสกัดตามคู่มือการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเนื้อเยื่อดังนี้



1. ใช้กรรไกรที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วตัดโคนขนของตัวอย่างนกกระเรียนพันธุ์ไทยให้ได้ความยาวประมาณ 1 เซนติเมตร ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ (microcentrifuge tube) ขนาด 1.5 ml จากนั้นเติม FATG1 buffer ปริมาตร 200  $\mu$ l ลงไป
2. เติมเอนไซม์ Proteinase K (11mg/ml) ปริมาตร 9  $\mu$ l ตามลงไป นำไปวอร์เท็กซ์ (vortex) และบ่ม (incubate) ที่ 60°C เป็นเวลาประมาณ 4 ชั่วโมง
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
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 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 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 เทสารละลายที่อยู่ภายใน collection tube ทิ้งและ นำ FATG mini column อันเดิมไป centrifuge ต่อที่ 14,000 rpm เป็นเวลา 3 นาที
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

#### 2.2.2.2. การเพิ่มปริมาณไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction:PCR)

นำสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอในนิวเคลียร์ดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่เคยศึกษาในนกกระเรียนกุ่มจำนวน 14 คู่ ดังที่แสดงในตารางที่ 1

ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอโดยการทำ PCR มีดังต่อไปนี้

1. เตรียมส่วนผสมของสารที่จะใช้ทำ PCR ลงในหลอด microcentrifuge tube ขนาด 0.2 ml ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว โดยใช้ปริมาตรสารละลายในแต่ละหลอด ดังนี้

Total DNA template	1	$\mu$ l
10 $\mu$ M forward primer	0.5	$\mu$ l
10 $\mu$ M reverse primer	0.5	$\mu$ l
MilliQ	3	$\mu$ l
2X EmeraldAmp MAXPCR Master Mix	5	$\mu$ l





ตารางที่ 1 โพรเมอร์และอุณหภูมิที่ใช้ในขั้นตอน annealing ( $T_A$ ) ของโพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้

Locus	$T_A$ ( $^{\circ}\text{C}$ )
Gram 6	60
Gram 8	60
Gram 11	60
Gram 17	TD58
Gram 20	60
Gram 22	60
Gram 24	60
Gram 25	TD58
Gram 30	60
Gram 31	TD58
Gram 32a	TD58
Gram 41	60
Gram 42	TD58
Gram 45	TD58

**แบบที่ 1** กำหนดโปรแกรมให้เครื่อง thermal cycle มีอุณหภูมิในขั้น annealing เท่ากับ 60°C

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

ตั้งโปรแกรมเครื่อง thermal cycle ให้ทำซ้ำในขั้นตอนที่ 2 ตามลำดับขั้นตอนย่อยดังกล่าวรวมทั้งสิ้น 40 รอบ

**แบบที่ 2** กำหนดโปรแกรมให้เครื่อง thermal cycle มีอุณหภูมิในขั้น annealing เท่ากับ touchdown 58 (TD58) ซึ่งหมายถึง การตั้งโปรแกรมให้เครื่อง thermal cycle มีอุณหภูมิในขั้น annealing ตั้งแต่ 58–50°C โดยจะลดอุณหภูมิจาก 58°C ลงรอบละ 0.5°C จำนวน 18 รอบ อีก 17 รอบคงอุณหภูมิไว้ที่ 50°C

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

ตั้งโปรแกรมเครื่อง thermal cycle ให้ทำซ้ำในขั้นตอนที่ 2 ตามลำดับขั้นตอนย่อยดังกล่าวรวมทั้งสิ้น 35 รอบ

3. นำหลอด microcentrifuge tube ที่มีส่วนผสมของสารที่ใช้ในการทำ PCR ใส่ลงในเครื่อง thermal cycle เครื่องจะเริ่มการทำงานตามโปรแกรมที่ได้ตั้งไว้ เมื่อเครื่องทำงานเสร็จนำ ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (PCR products) ที่ได้ไปตรวจสอบขนาดด้วยวิธี agarose gel electrophoresis

### 2.2.2.3. การตรวจสอบขนาดของแถบไมโครแซเทลไลท์ (microsatellite bands) ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis

การตรวจสอบขนาดของ microsatellite bands โดยมีขั้นตอนดังนี้

1. ชั่งผง agarose MS ให้ได้น้ำหนัก 3 กรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ แล้วเท 0.5X TBE buffer ปริมาตร 100 ml ลงไป

2. นำไปต้มในไมโครเวฟ พอ buffer เริ่มเดือดเล็กน้อยให้หยุดการทำงานของไมโครเวฟแล้วนำขวดรูปชมพู่ออกมาสังเกต หากผง agarose MS ยังไม่ละลายเข้ากับ buffer ให้ต้มต่อไปจนกว่าจะละลายเป็นเนื้อเดียวกัน หากละลายเข้ากันแล้วให้นำออกมาพักไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาประมาณ 5 นาที หรือมีอุณหภูมิอุ่นพอที่จะสามารถนำขวดรูปชมพู่มาสัมผัสกับผิวหนังได้

3. ใส่ 10,000XS<sup>®</sup>SYBR Safe DNA gel stain ลงไป 3  $\mu$ l ใน 100 ml
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 โวลต์ เป็นเวลา 120 นาที
8. นำ gel ไปส่องภายใต้ blue light ด้วยเครื่อง transilluminator จากนั้นถ่ายภาพ gel ด้วยกล้องดิจิทัล

#### 2.2.2.4. การทำ genotyping ด้วยวิธี GeneScan

ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างที่ใช้สำหรับทำ genotyping มีขั้นตอนและ temperature profile ในการทำ PCR เหมือนกับการเพิ่มปริมาณไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ แต่เพิ่มปริมาตรสุดท้ายจาก 10  $\mu$ l เป็น 20  $\mu$ l และจะใช้ reverse primer ที่ติดสีเรืองแสงด้วย 6-FAM แทน reverse primer ธรรมดาในการทำ PCR จากนั้นส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์ผลที่บริษัท MacroGen ประเทศเกาหลีใต้ โดยจะได้ข้อมูลเป็นไฟล์ .fsa กลับมา นำข้อมูลเหล่านี้มาตรวจดูขนาดของอัลลีลด้วยโปรแกรม GeneMarker เวอร์ชัน 2.6.3. (Softgenetics)

#### 2.2.2.5. การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ไมโครแซทเทลไลท์ (microsatellite products)

ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างที่ใช้สำหรับการหาลำดับนิวคลีโอไทด์มีขั้นตอนและ temperature profile ในการทำ PCR เหมือนกับการเพิ่มปริมาณไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ แต่เพิ่มปริมาตรสุดท้ายจาก 10  $\mu$ l เป็น 30  $\mu$ l จากนั้นส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์ผลที่บริษัท Bioneer ประเทศเกาหลีใต้ โดยจะได้ข้อมูลเป็นไฟล์ .abl กลับมา นำข้อมูลเหล่านี้มาตรวจดูลำดับการซ้ำและชุดการซ้ำของนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม MEGA เวอร์ชัน 5.2.

#### 2.2.2.6. การวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรม

นำข้อมูลที่ได้จากการทำ genotyping ของไพรเมอร์ทั้ง 14 คู่ มาวิเคราะห์หาค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรม Genepop เวอร์ชัน 4.3. ซึ่งจะได้ค่าต่างๆ ดังนี้

- ค่าจำนวนของอัลลีล ( $N_a$ )
- ค่า expected heterozygosity ( $H_E$ )
- ค่า observed heterozygosity ( $H_O$ )
- ค่า Hardy-Weinberg Equilibrium ( $p$ ) ประชากรจะเข้าสู่สมดุล Hardy-Weinberg ได้เมื่อได้ค่า  $p$  ที่มากกว่า 0.05

## ผลการทดลอง

### 3.1. ผลการเก็บตัวอย่าง

ตารางที่ 2 ผลการเก็บตัวอย่างขนนกกระเรียนพันธุ์ไทยจากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว (เขาเขียว) และสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ (บางพระ)

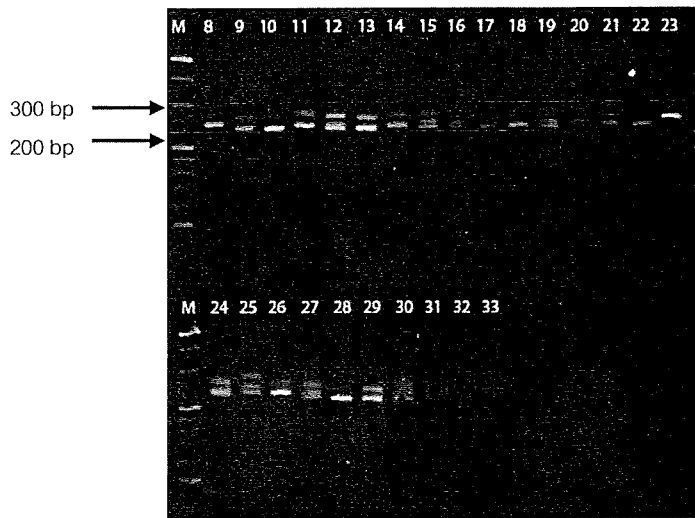
สถานที่เก็บตัวอย่าง	หมายเลขตัวอย่าง	เพศ	วิธีการเก็บตัวอย่าง
เขาเขียว	8	ผู้	เก็บขนส่วนโตก็ได้ที่ร่วงลงบนพื้นดิน
เขาเขียว	9	เมีย	เก็บขนส่วนโตก็ได้ที่ร่วงลงบนพื้นดิน
เขาเขียว	10	ไม่ทราบ	เก็บขนส่วนโตก็ได้ที่ร่วงลงบนพื้นดิน
เขาเขียว	11	ผู้	เก็บขนส่วนโตก็ได้ที่ร่วงลงบนพื้นดิน
เขาเขียว	12	ผู้	เก็บขนส่วนโตก็ได้ที่ร่วงลงบนพื้นดิน
เขาเขียว	13	เมีย	เก็บขนส่วนโตก็ได้ที่ร่วงลงบนพื้นดิน
เขาเขียว	14	เมีย	เก็บขนส่วนโตก็ได้ที่ร่วงลงบนพื้นดิน
เขาเขียว	15	ผู้	เก็บขนส่วนโตก็ได้ที่ร่วงลงบนพื้นดิน
เขาเขียว	16	ไม่ทราบ	เก็บขนส่วนโตก็ได้ที่ร่วงลงบนพื้นดิน
บางพระ	17	เมีย	เก็บขนส่วนโตก็ได้ที่ร่วงลงบนพื้นดิน
บางพระ	18	เมีย	เก็บขนส่วนโตก็ได้ที่ร่วงลงบนพื้นดิน
บางพระ	19	เมีย	เก็บขนส่วนโตก็ได้ที่ร่วงลงบนพื้นดิน
บางพระ	20	เมีย	เก็บขนส่วนโตก็ได้ที่ร่วงลงบนพื้นดิน
บางพระ	21	ผู้	เก็บขนส่วนโตก็ได้ที่ร่วงลงบนพื้นดิน
บางพระ	22	ผู้	เก็บขนส่วนโตก็ได้ที่ร่วงลงบนพื้นดิน
บางพระ	23	ผู้	ดิ่งขนโดยตรงจากบริเวณปีก
บางพระ	24	เมีย	ดิ่งขนโดยตรงจากบริเวณปีก
บางพระ	25	ผู้	ดิ่งขนโดยตรงจากบริเวณปีก
บางพระ	26	เมีย	ดิ่งขนโดยตรงจากบริเวณปีก
บางพระ	27	ผู้	ดิ่งขนโดยตรงจากบริเวณปีก
บางพระ	28	เมีย	ดิ่งขนโดยตรงจากบริเวณปีก
บางพระ	29	ผู้	ดิ่งขนโดยตรงจากบริเวณปีก
บางพระ	30	เมีย	ดิ่งขนโดยตรงจากบริเวณปีก
บางพระ	31	ผู้	เก็บขนส่วนโตก็ได้ที่ร่วงลงบนพื้นดิน
บางพระ	32	เมีย	เก็บขนส่วนโตก็ได้ที่ร่วงลงบนพื้นดิน
บางพระ	33	เมีย	เก็บขนส่วนโตก็ได้ที่ร่วงลงบนพื้นดิน

### 3.2. ผลการสกัดดีเอ็นเอ

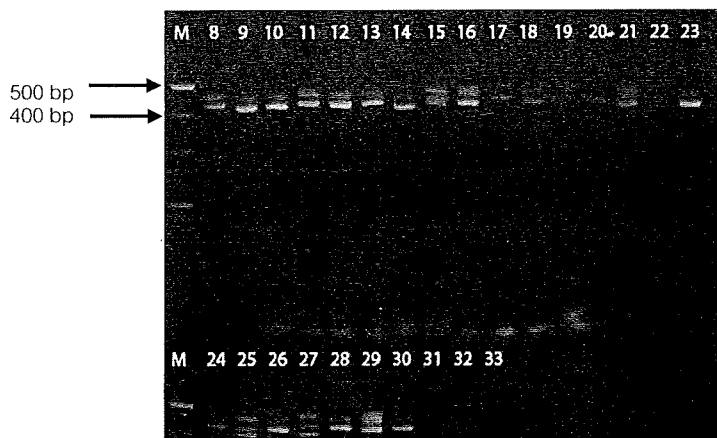
ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากบริเวณโคนขนของนกกระเรียนพันธุ์ไทยทั้ง 26 ตัวอย่าง มีปริมาณเพียงพอที่จะนำไปใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ และสามารถนำไปตรวจสอบขนาดได้ด้วยวิธี gel electrophoresis

### 3.3. ผลการคัดเลือกเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ

การศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยได้เลือกใช้ไพรเมอร์ 14 คู่ ซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่เคยใช้ศึกษาในนกกระเรียนกลุ่มมาเพิ่มปริมาณไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอของนกกระเรียนพันธุ์ไทย ผลการศึกษาพบว่าไพรเมอร์ทั้ง 14 คู่สามารถเพิ่มปริมาณไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอในจีโนมของนกกระเรียนพันธุ์ไทยได้ ซึ่งปรากฏผลออกมาเป็นแถบ microsatellite band ของทุกตัวอย่าง (ภาพที่ 2-15) แต่มีไพรเมอร์เพียง 9 คู่ เท่านั้น ได้แก่ Gram6, Gram8, Gram11, Gram17, Gram20, Gram22, Gram25, Gram30 และ Gram32a ที่แสดงความเป็น polymorphism โดยพิจารณาได้จากผล gel ที่แสดงขนาดของอัลลีลที่แตกต่างกันตั้งแต่ 2 ขนาดขึ้นไป (ภาพที่ 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 12) ส่วนไพรเมอร์ที่เหลือแสดงความเป็น monomorphism ซึ่งเมื่อดูจากผลเจลที่ได้จะเห็นว่าขนาดของอัลลีลไม่มีความแตกต่างกันในแต่ละตัวอย่าง (ภาพที่ 8, 11, 13, 14, 15)

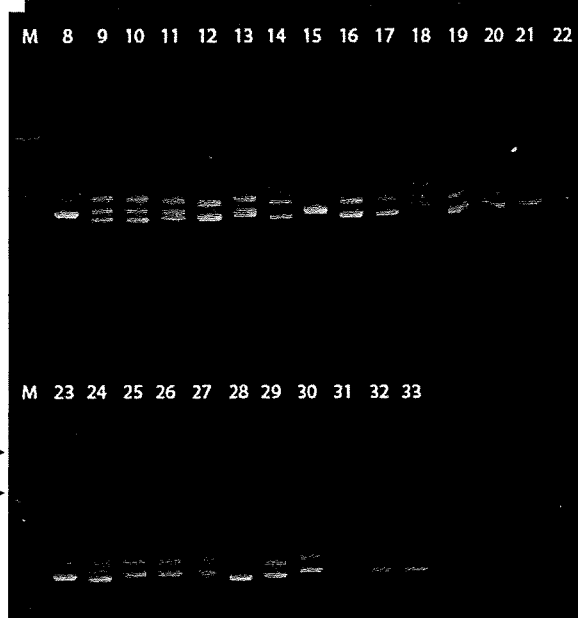


ภาพที่ 2 การตรวจสอบขนาด microsatellite bands ด้วยวิธี 3% agarose MS gel electrophoresis ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์นาน 120 นาที ของตัวอย่างนกกระเรียนพันธุ์ไทยจากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว (ตัวอย่างหมายเลข 8-16) และสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ (ตัวอย่างหมายเลข 17-33) โดยใช้ไพรเมอร์ Gram6



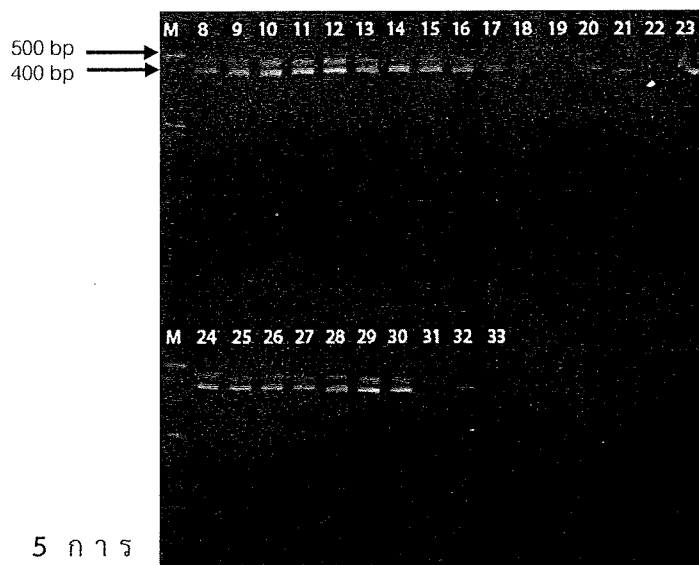
ภาพที่ 3 การตรวจสอบขนาด

microsatellite  
MS gel  
ศักย์ไฟฟ้า 100  
ตัวอย่างนก  
เปิดเขาเขียว  
สถานีวิจัย  
(ตัวอย่าง  
เมอร์Gram8

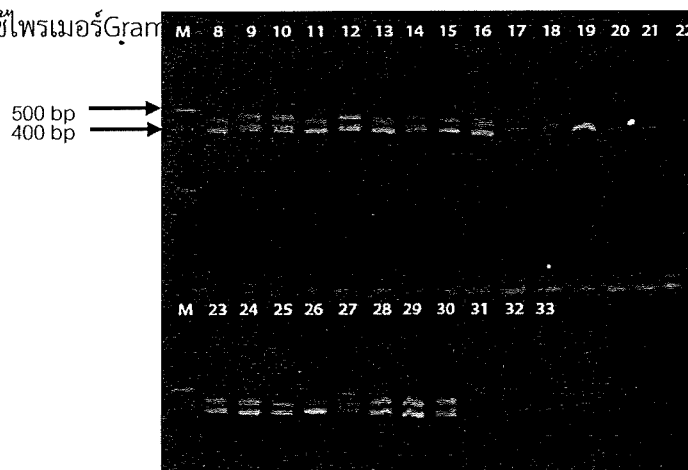


bands ด้วยวิธี 3% agarose  
electrophoresis ที่ความต่าง  
โวลต์นาน 120 นาที ของ  
กระเรียนพันธุ์ไทยจากสวนสัตว์  
(ตัวอย่างหมายเลข 8-16) และ  
เพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ  
หมายเลข 17-33) โดยใช้ไพร

ภาพที่ 4 การตรวจสอบขนาด microsatellite bands ด้วยวิธี 3% agarose MS gel electrophoresis ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์นาน 120 นาที ของตัวอย่างนกกระเรียนพันธุ์ไทยจากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว (ตัวอย่างหมายเลข 8-16) และสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ (ตัวอย่างหมายเลข 17-33) โดยใช้ไพรเมอร์ Gram11

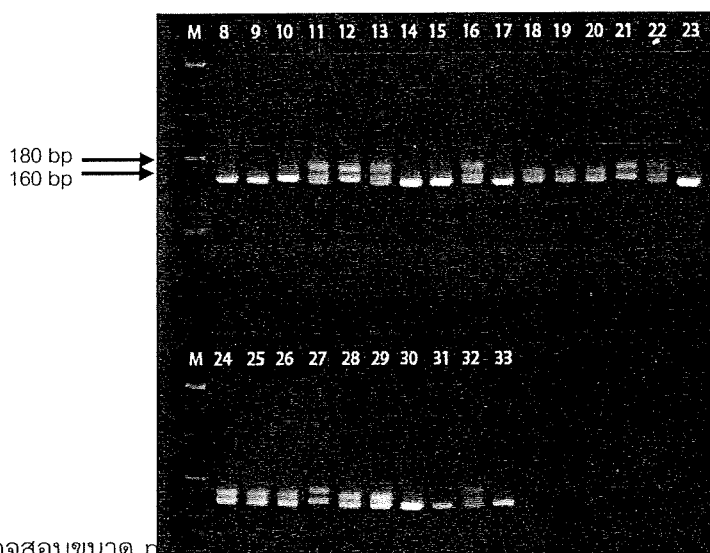


ภาพที่ 5 การตรวจสอบขนาด microsatellite bands ด้วยวิธี 3% agarose MS gel electrophoresis ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์นาน 120 นาที ของตัวอย่างนกกระเรียนไทยจากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว (ตัวอย่างหมายเลข 8-16) และสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ (ตัวอย่างหมายเลข 17-33) โดยใช้ไพรเมอร์ Gram11

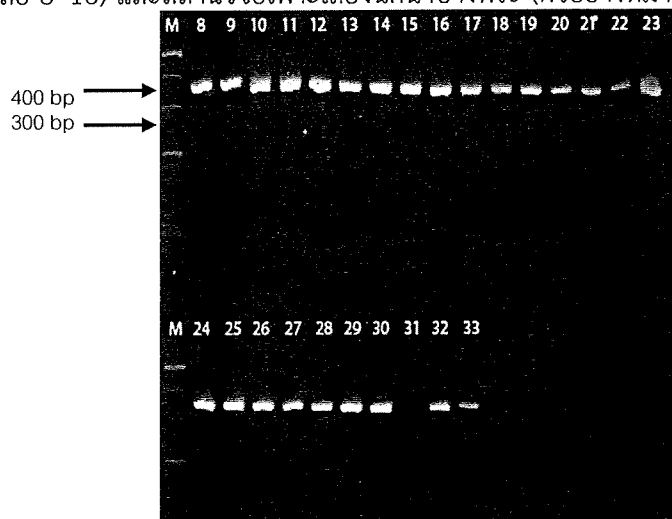




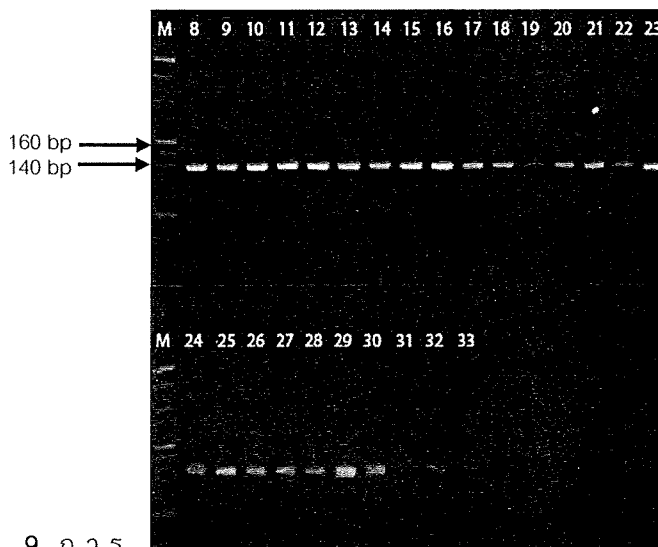
ภาพที่ 6 การตรวจสอบขนาด microsatellite bands ด้วยวิธี 3% agarose MS gel electrophoresis ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์นาน 120 นาที ของตัวอย่างนกระเรียนพันธุ์ไทยจากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว (ตัวอย่างหมายเลข 8-16) และสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ (ตัวอย่างหมายเลข 17-33) โดยใช้ไพรเมอร์ Gram20



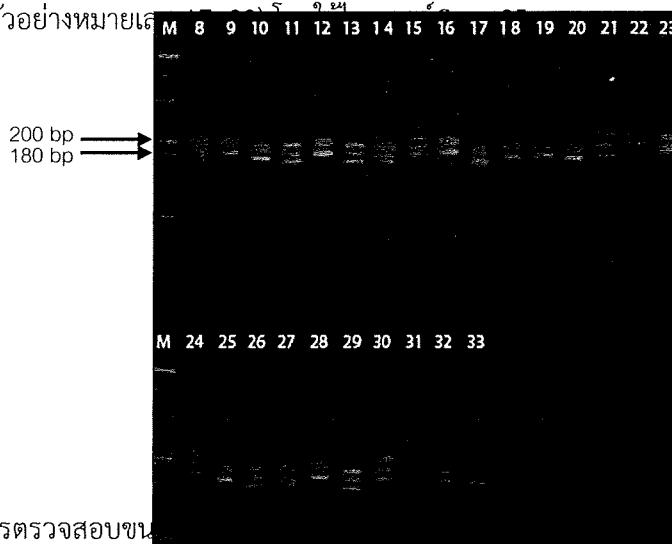
ภาพที่ 7 การตรวจสอบขนาด microsatellite bands ด้วยวิธี 3% agarose MS gel electrophoresis ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์นาน 120 นาที ของตัวอย่างนกระเรียนพันธุ์ไทยจากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว (ตัวอย่างหมายเลข 8-16) และสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ (ตัวอย่างหมายเลข 17-33) โดยใช้ไพรเมอร์ Gram22



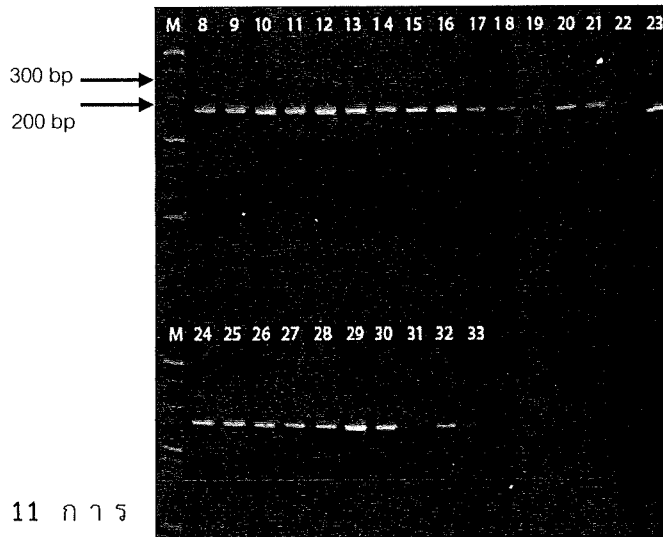
ภาพที่ 8 การตรวจสอบขนาด microsatellite bands ด้วยวิธี 3% agarose MS gel electrophoresis ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์นาน 120 นาที ของตัวอย่างนกระเรียนพันธุ์ไทยจากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว (ตัวอย่างหมายเลข 8-16) และสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ (ตัวอย่างหมายเลข 17-33) โดยใช้ไพรเมอร์ Gram24



ภาพที่ 9 การตรวจสอบขนาด microsatellite bands ด้วยวิธี 3% agarose MS gel electrophoresis ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์นาน 120 นาที ของตัวอย่างนกระเรียนพันธุ์ไทยจากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว (ตัวอย่างหมายเลข 8-16) และสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ (ตัวอย่างหมายเลข 17-33) โดยใช้ไพรเมอร์ Gram25



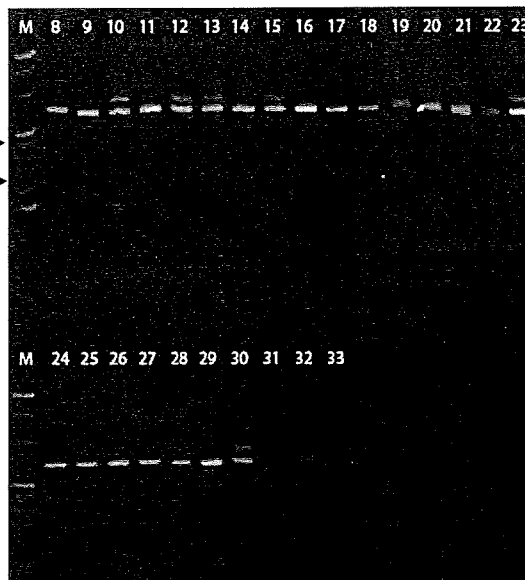
ภาพที่ 10 การตรวจสอบขนาด microsatellite bands ด้วยวิธี 3% agarose MS gel electrophoresis ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์นาน 120 นาที ของตัวอย่างนกระเรียนพันธุ์ไทยจากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว (ตัวอย่างหมายเลข 8-16) และสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ (ตัวอย่างหมายเลข 17-33) โดยใช้ไพรเมอร์ Gram30



ภาพที่ 11 การ  
microsatellite bands

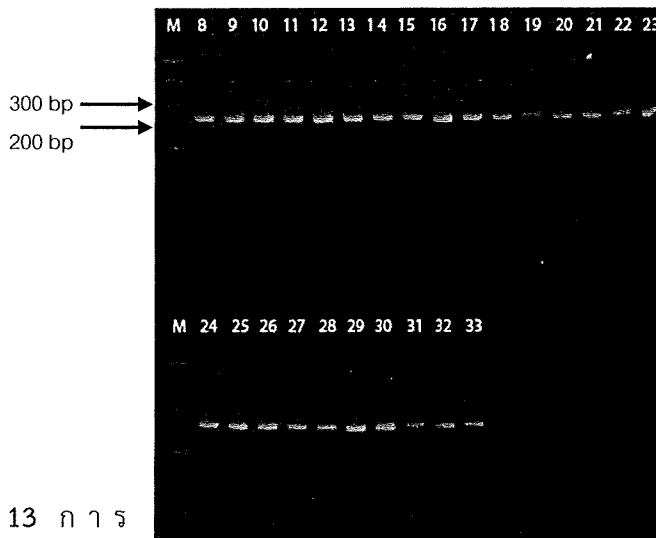
electrophoresis ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์นาน 120 นาที ของตัวอย่างนกระเรียนพันธุ์ไทยจากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว และสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงหมายเลข 17-33) โดยใช้

300 bp →  
200 bp →



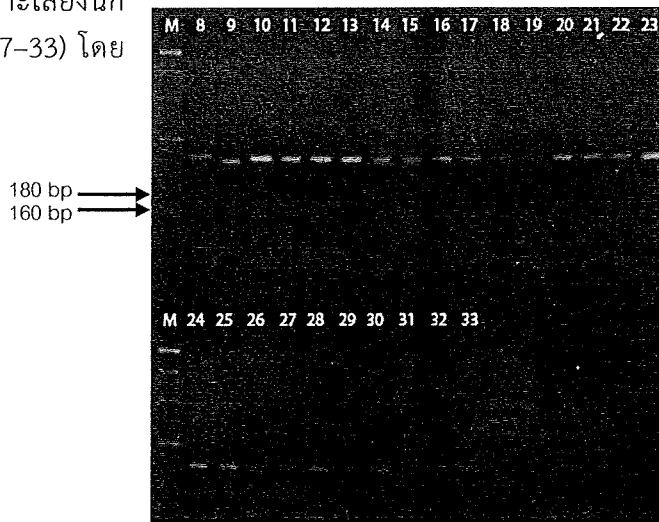
ตรวจ สอบ ขนาด  
ด้วยวิธี 3% agarose MS gel  
(ตัวอย่างหมายเลข 8-16)  
นกน้ำบางพระ (ตัวอย่าง  
ไพรเมอร์Gram31

ภาพที่ 12 การตรวจสอบขนาด microsatellite bands ด้วยวิธี 3% agarose MS gel electrophoresis ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์นาน 120 นาที ของตัวอย่างนกระเรียนพันธุ์ไทยจากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว (ตัวอย่างหมายเลข 8-16) และสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ (ตัวอย่างหมายเลข 17-33) โดยใช้ไพรเมอร์ Gram32a



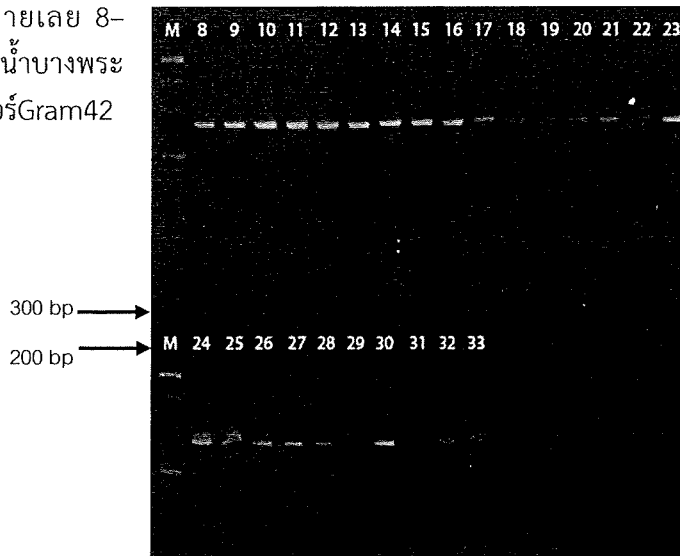
ภาพที่ 13 การตรวจสอบขนาด microsatellite bands ด้วยวิธี 3% agarose MS gel electrophoresis ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 120 นาที ของตัวอย่างนกกระเรียนพันธุ์ไทยจากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว (ตัวอย่างหมายเลข 8-16) และ สถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนก (หมายเลข 17-33) โดย

ตรวจสอบขนาด microsatellite bands ด้วยวิธี 3% agarose MS gel electrophoresis ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 120 นาที ของตัวอย่างนกกระเรียนพันธุ์ไทยจากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว (ตัวอย่างหมายเลข 8-16) และ สถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนก (ตัวอย่างหมายเลข 17-33) โดยใช้ไพรเมอร์ Gram41



ภาพที่ 14 การตรวจสอบขนาด microsatellite bands ด้วยวิธี 3% agarose MS gel electrophoresis ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 120 นาที ของตัวอย่างนกกระเรียนพันธุ์ไทยจากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว (ตัวอย่างหมายเลข 8-16) และ สถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ โดยใช้ไพรเมอร์ Gram42

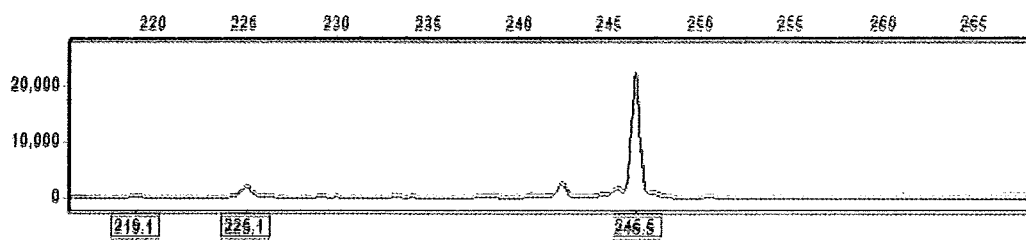
16) และ สถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ (ตัวอย่างหมายเลข 17-33)



**ภาพที่ 15** การตรวจสอบขนาด microsatellite bands ด้วยวิธี 3% agarose MS gel electrophoresis ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์นาน 120 นาที ของตัวอย่างนกกระเรียนพันธุ์ไทยจากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว (ตัวอย่างหมายเลข 8-16) และสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ (ตัวอย่างหมายเลข 17-33) โดยใช้ไพรเมอร์ Gram45

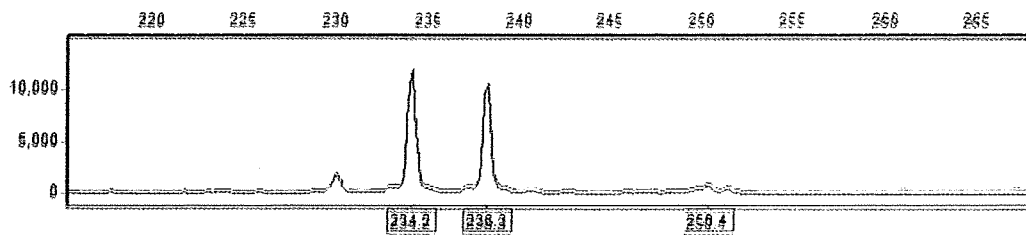
### 3.4. ผลการทำ genotyping ด้วยวิธี GeneScan

การทำ genotyping ครั้งนี้ใช้ไพรเมอร์เพียง 1 คู่เท่านั้น คือ Gram6 ผลของ electropherogram ที่ได้จะแสดงขนาดอัลลีลของ 26 ตัวอย่าง พบว่าขนาดอัลลีลของนกกระเรียนไทย 9 ตัวที่ได้ตัวอย่างมาจากสวนสัตว์เปิดเขาเขียวมี 4 ขนาด ได้แก่ 234, 238, 242 และ 246 bp (ตารางที่ 3 ตัวอย่างที่ 8-16) (ภาพที่ 16-24) และตัวอย่างจากสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ 17 ตัว มี 6 ขนาด ได้แก่ 234, 238, 242, 246, 250 และ 258 bp (ตารางที่ 3 ตัวอย่างที่ 17-33) (ภาพที่ 25-41) นอกจากนี้ยังพบว่ามี 6 ตัวอย่างที่แสดงรูปแบบอัลลีลแบบ homozygous และ 20 ตัวอย่าง แสดงอัลลีลแบบ heterozygous ดังแสดงในตารางที่ 3



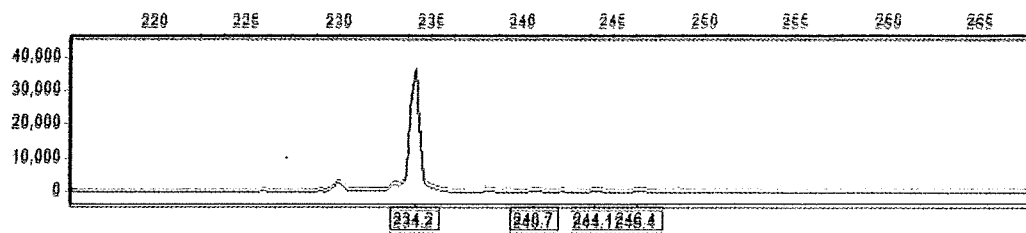
ภาพที่

16 electropherogram ของการทำ genotyping ด้วยวิธี GeneScan ของตัวอย่างที่ 8 ที่โลคัส Gram6



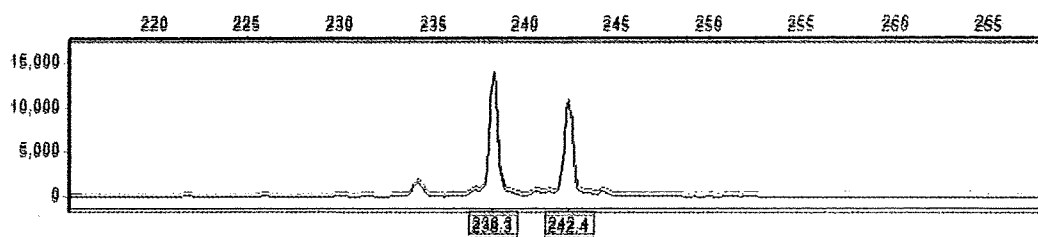
ภาพที่

17 electropherogram ของการทำ genotyping ด้วยวิธี GeneScan ของตัวอย่างที่ 9 ที่โลคัส Gram6

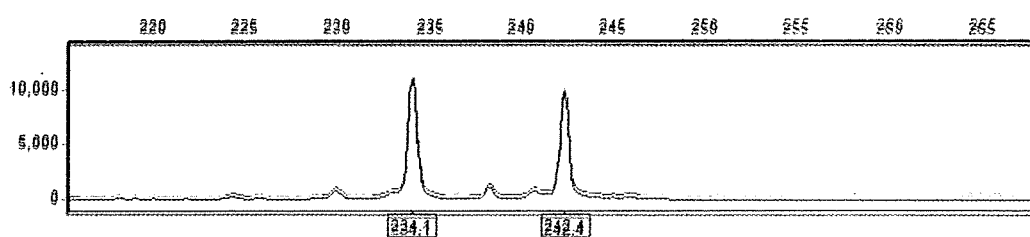


ภาพที่

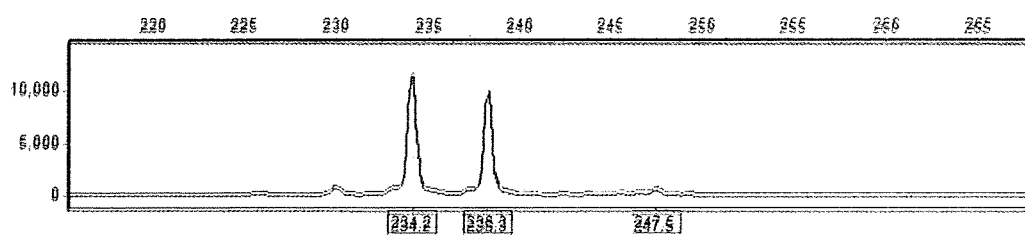
18 electropherogram ของการทำ genotyping ด้วยวิธี GeneScan ของตัวอย่างที่ 10 ที่โลคัส Gram6



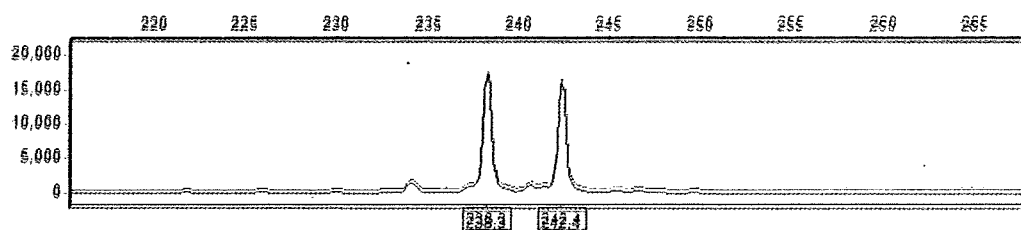
ภาพที่ 19 electropherogram ของการทำ genotyping ด้วยวิธี GeneScan ของตัวอย่างที่ 11 ที่โลคัส Gram6



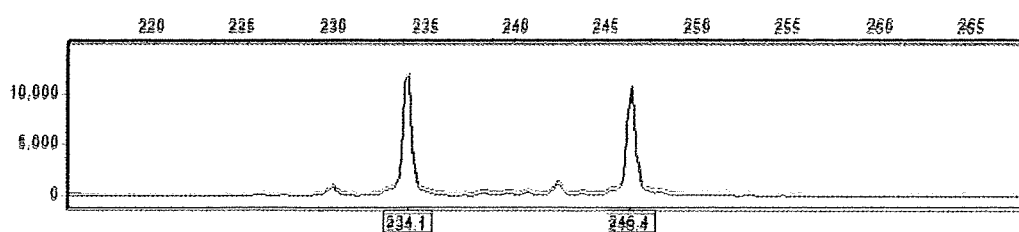
ภาพที่ 20 electropherogram ของการทำ genotyping ด้วยวิธี GeneScan ของตัวอย่างที่ 12 ที่โลคัส Gram6



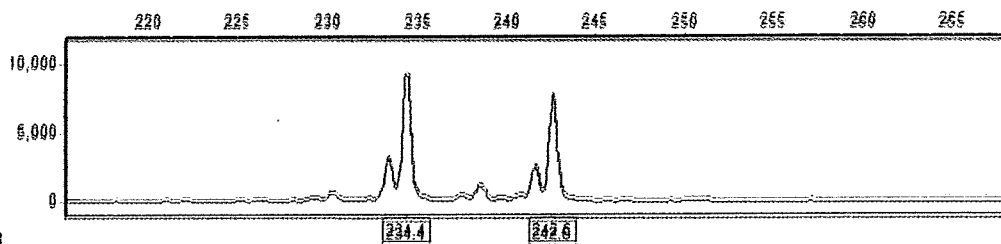
ภาพที่ 21 electropherogram ของการทำ genotyping ด้วยวิธี GeneScan ของตัวอย่างที่ 13 ที่โลคัส Gram6



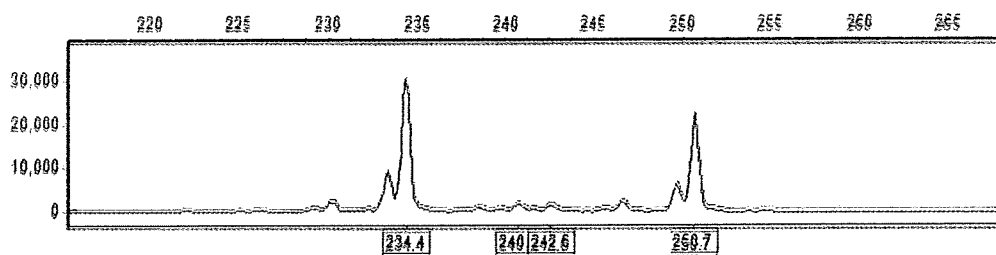
ภาพที่ 22 electropherogram ของการทำ genotyping ด้วยวิธี GeneScan ของตัวอย่างที่ 14 ที่โลคัส Gram6



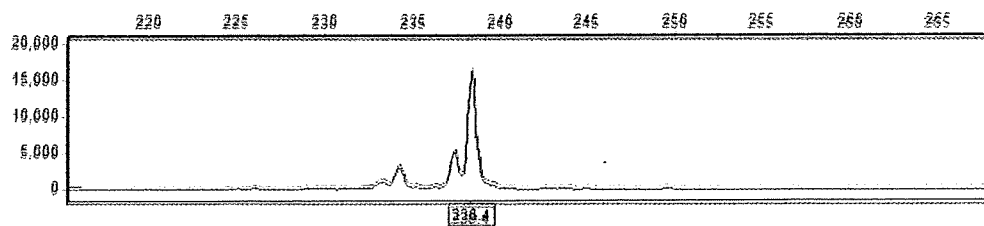
ภาพที่ 23 electropherogram ของการทำ genotyping ด้วยวิธี GeneScan ของตัวอย่างที่ 15 ที่โลคัส Gram6



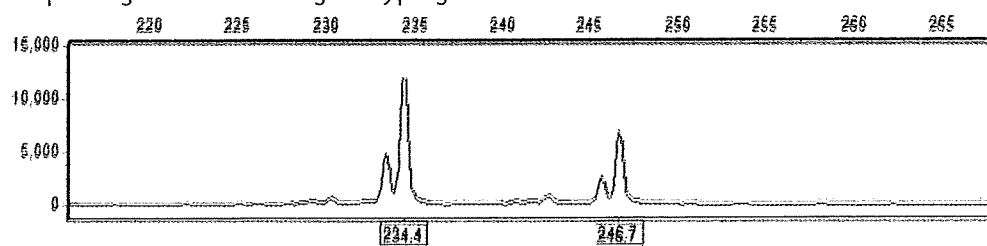
ภาพที่ 24 electropherogram ของการทำ genotyping ด้วยวิธี GeneScan ของตัวอย่างที่ 16 ที่โลคัส Gram6



ภาพที่ 25 electropherogram ของการทำ genotyping ด้วยวิธี GeneScan ของตัวอย่างที่ 17 ที่โลคัส Gram6

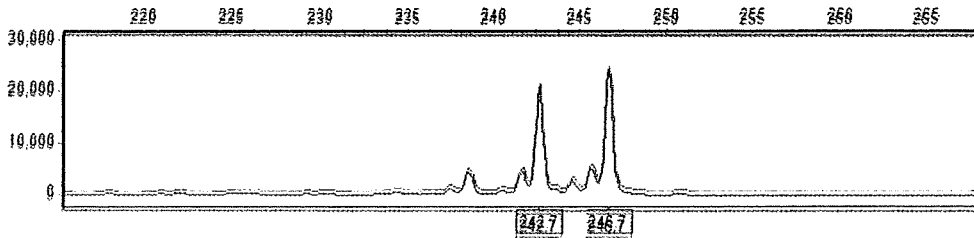


ภาพที่ 26 electropherogram ของการทำ genotyping ด้วยวิธี GeneScan ของตัวอย่างที่ 18 ที่โลคัส Gram6





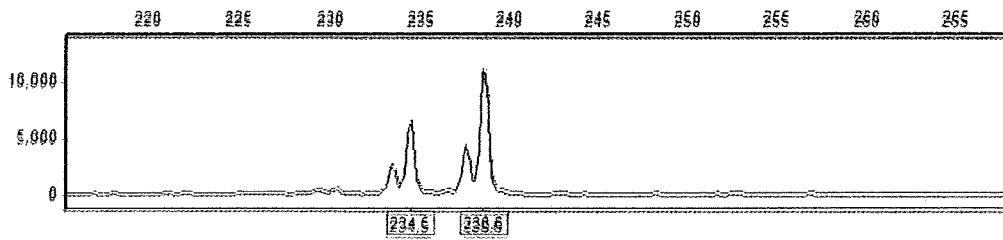
ภาพที่ 27 electropherogram ของการทำ genotyping ด้วยวิธี GeneScan ของตัวอย่างที่ 19 ที่ไลค์ส Gram6



ภาพ

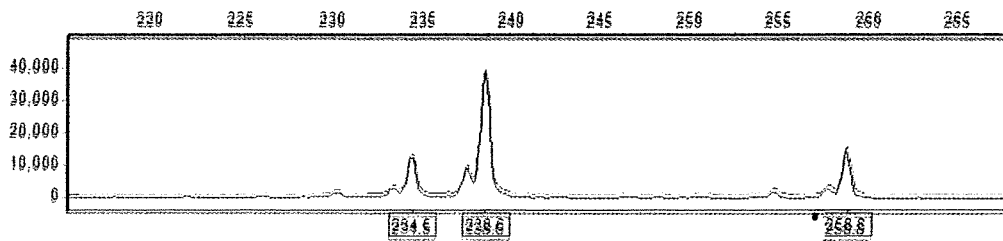
ที่ 28

electropherogram ของการทำ genotyping ด้วยวิธี GeneScan ของตัวอย่างที่ 20 ที่ไลค์ส Gram6



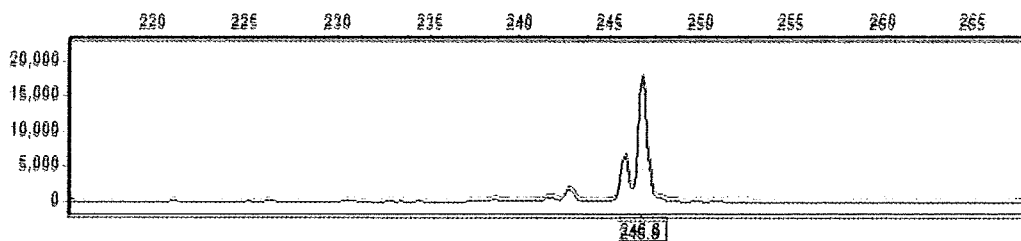
ภาพ

ที่ 29 electropherogram ของการทำ genotyping ด้วยวิธี GeneScan ของตัวอย่างที่ 21 ที่ไลค์ส Gram6



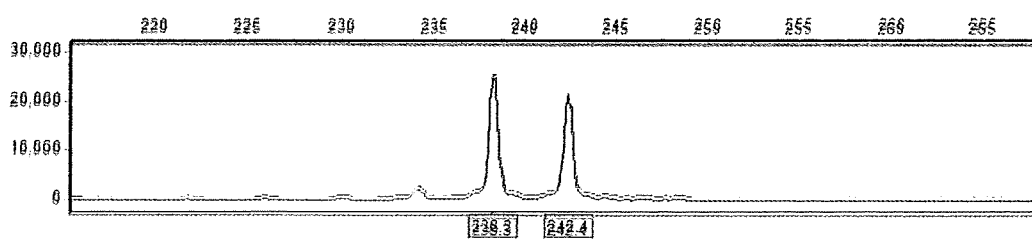
ภาพ

ที่ 30 electropherogram ของการทำ genotyping ด้วยวิธี GeneScan ของตัวอย่างที่ 22 ที่ไลค์ส Gram6

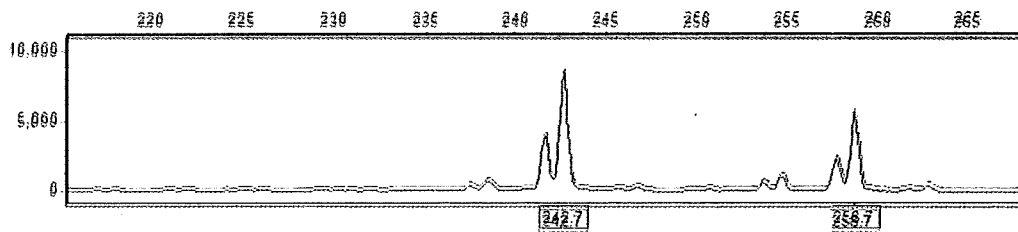


ภาพ

ที่ 31 electropherogram ของการทำ genotyping ด้วยวิธี GeneScan ของตัวอย่างที่ 23 ที่ไลค์ส Gram6



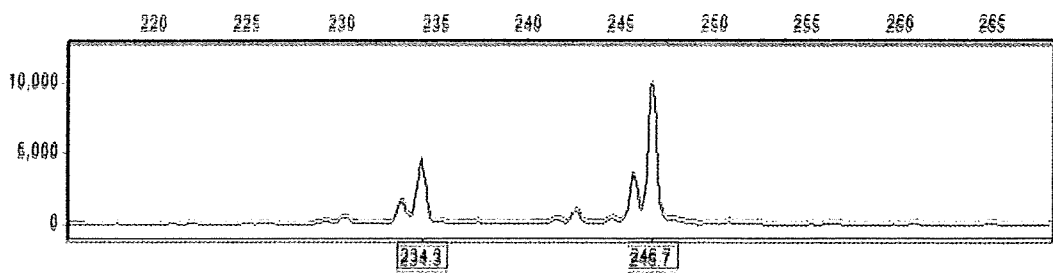
ภาพที่ 32 electropherogram ของการทำ genotyping ด้วยวิธี GeneScan ของตัวอย่างที่ 24 ที่โลคัส Gram6



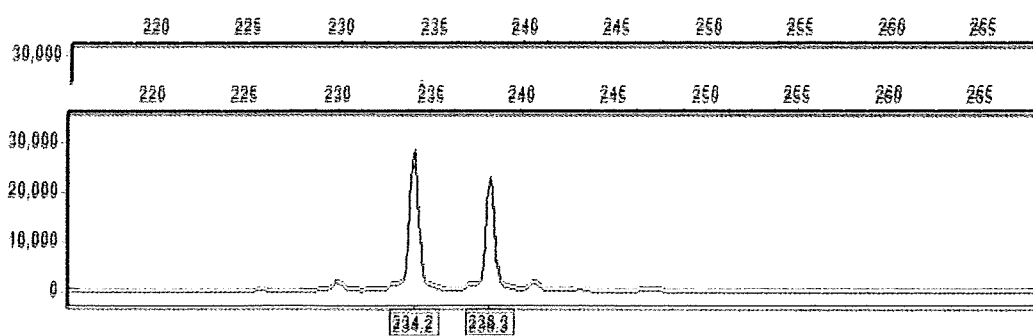
ภาพที่ 33 electropherogram ของการทำ genotyping ด้วยวิธี GeneScan ของตัวอย่างที่ 25 ที่โลคัส Gram6



ภาพที่ 34 electropherogram ของการทำ genotyping ด้วยวิธี GeneScan ของตัวอย่างที่ 26 ที่โลคัส



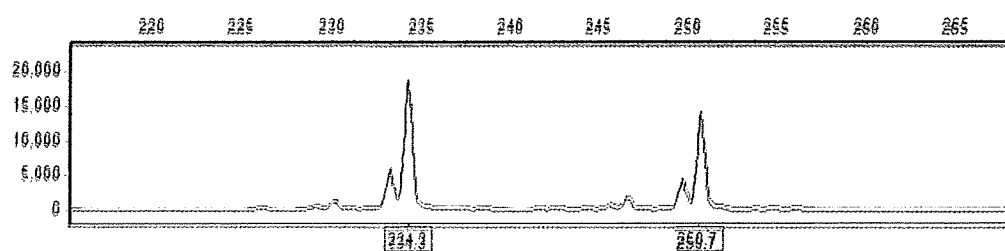
Gram6



ภาพที่ 35 electropherogram ของการทำ genotyping ด้วยวิธี GeneScan ของตัวอย่างที่ 27 ที่โลคัส Gram6

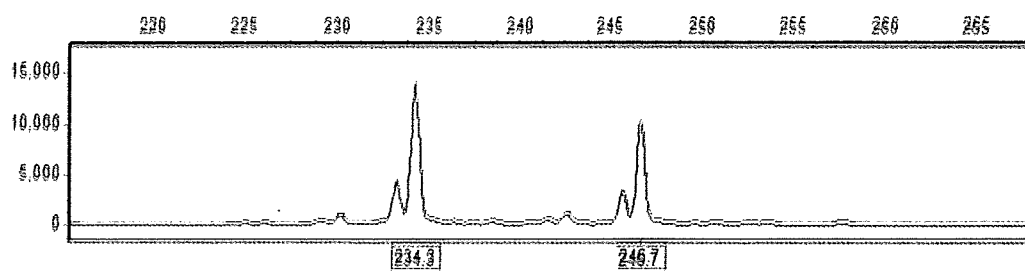
ภาพที่ 36 electropherogram ของการทำ genotyping ด้วยวิธี GeneScan ของตัวอย่างที่ 28 ที่โลคัส Gram6

ภาพที่ 37 electropherogram ของการทำ genotyping ด้วยวิธี GeneScan ของตัวอย่างที่ 29 ที่โลคัส Gram6



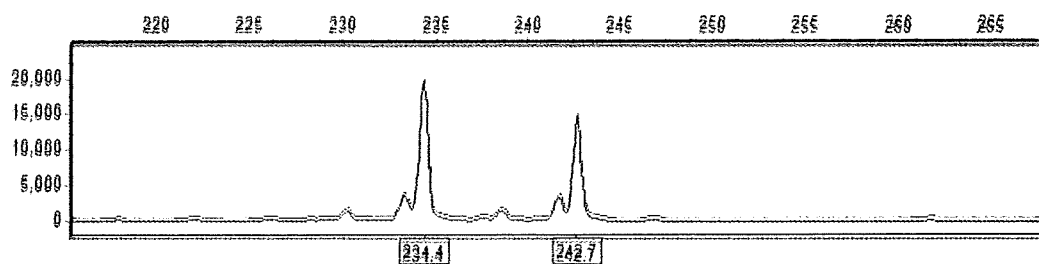
ภาพที่

38

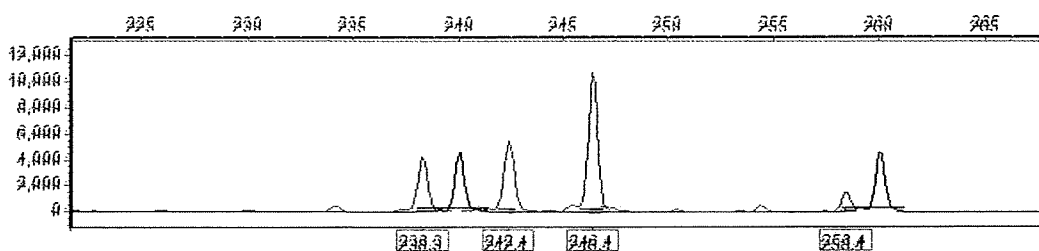


electropherogram ของการทำ genotyping ด้วยวิธี GeneScan ของตัวอย่างที่ 30 ที่โลคัส Gram6

ภาพที่ 39 electropherogram ของการทำ genotyping ด้วยวิธี GeneScan ของตัวอย่างที่ 31 ที่โลคัส Gram6



ภาพที่ 40 electropherogram ของการทำ genotyping ด้วยวิธี GeneScan ของตัวอย่างที่ 32 ที่โลคัส Gram6



ภาพที่ 41 electropherogram ของการทำ genotyping ด้วยวิธี GeneScan ของตัวอย่างที่ 33 ที่โลคัส Gram6

ตารางที่ 3 ขนาดและรูปแบบของอัลลีลของตัวอย่างนกกระเรียนพันธุ์ไทยทั้ง 26 ตัวอย่างที่โลคัส Gram6

หมายเลขตัวอย่าง	สถานที่เก็บตัวอย่าง	ขนาดอัลลีล (bp)		รูปแบบอัลลีล
8	เขาเขียว	246.5		Homozygous
9	เขาเขียว	234.2	238.3	Heterozygous
10	เขาเขียว	234.2		Homozygous
11	เขาเขียว	238.3	242.4	Heterozygous
12	เขาเขียว	234.1	242.4	Heterozygous
13	เขาเขียว	234.2	238.3	Heterozygous
14	เขาเขียว	238.3	242.4	Heterozygous
15	เขาเขียว	234.1	246.4	Heterozygous
16	เขาเขียว	234.4	242.6	Heterozygous
17	บางพระ	234.4	250.7	Heterozygous
18	บางพระ	238.4		Homozygous
19	บางพระ	234.4	246.7	Heterozygous
20	บางพระ	242.7	246.7	Heterozygous
21	บางพระ	234.5	238.6	Heterozygous
22	บางพระ	234.5	238.6	Heterozygous
23	บางพระ	246.8		Homozygous
24	บางพระ	238.3	242.4	Heterozygous
25	บางพระ	242.7	258.7	Heterozygous
26	บางพระ	246.6		Homozygous
27	บางพระ	234.3	246.7	Heterozygous
28	บางพระ	234.4		Homozygous
29	บางพระ	234.2	238.3	Heterozygous
30	บางพระ	234.3	250.7	Heterozygous
31	บางพระ	234.3	246.7	Heterozygous
32	บางพระ	234.4	242.7	Heterozygous
33	บางพระ	242.4	246.4	Heterozygous

### 3.5. ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ไมโครแซทเทลไลท์ (Microsatellite products)

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในการศึกษานี้ใช้ไพรเมอร์ 1 คู่ คือ Gram6 ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ซ้ำกันรวมถึงจำนวนชุดการซ้ำของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 8 ตัวอย่าง ได้แก่ ตัวอย่างหมายเลข 8, 10, 18, 23, 24, 25, 26 และ 28 พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ซ้ำกัน คือ  $(AGGT)_n(AGAT)_n$  ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ซ้ำกันและจำนวนชุดการซ้ำของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่โลคัส Gram6

หมายเลขตัวอย่าง	ลำดับการซ้ำและจำนวนชุดการซ้ำของลำดับนิวคลีโอไทด์	ขนาดของอัลลีล(bp)	
8	$(AGGT)_8(AGAT)_9$	246.5	
10	$(AGGT)_7(AGAT)_7$	234.2	
18	$(AGGT)_8(AGAT)_7$	238.4	
23	$(AGGT)_8(AGAT)_9$	246.8	
24	$(AGGT)_7(AGAT)_8$	238.3	242.4
25	$(AGGT)_{10}(AGAT)_9$	242.7	258.7
26	$(AGGT)_8(AGAT)_9$	246.6	
28	$(AGGT)_7(AGAT)_7$	234.4	

### 3.6. ผลการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม

จากการคำนวณค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกกกระเรียนพันธุ์ไทยในสภาพกรงเลี้ยงของสวนสัตว์เปิดเขาเขียวและสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกกน้ำบางพระทั้ง 26 ตัว ด้วยโปรแกรม Genepop เวอร์ชัน 4.3. ได้ค่าต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรนกกกระเรียนพันธุ์ไทยในสภาพกรงเลี้ยงของสวนสัตว์เปิดเขาเขียวและสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกกน้ำบางพระ เมื่อพิจารณาที่โลคัส Gram6

N	N <sub>a</sub>	p	H <sub>O</sub>	H <sub>E</sub>	F <sub>ST</sub>
26	6	0.6878	0.7692	0.7825	0.0274

หมายเหตุ: N คือ จำนวนตัวอย่าง  
 N<sub>a</sub> คือ จำนวนของอัลลีล  
 H<sub>O</sub> คือ ค่า observed heterozygosity  
 H<sub>E</sub> คือ ค่า expected heterozygosity  
 p คือ ค่าแนวโน้มการเข้าสู่สมดุล Hardy-Weinberg  
 F<sub>ST</sub> คือ ค่าความแตกต่างอัลลีลของประชากร 2 กลุ่ม

1. ค่าจำนวนอัลลีล (N<sub>a</sub>) เท่ากับ 6 ได้แก่ อัลลีลขนาด 234, 238, 242, 246, 250 และ 258 bp

2. ค่า  $p$  เท่ากับ 0.6878 ซึ่งเป็นค่าที่มากกว่า 0.05 แสดงว่าประชากรนกระเรียนไทยของ 2 พื้นที่ การศึกษาอยู่ในสมดุล Hardy-Weinberg

3. ค่า  $H_0$  เท่ากับ 0.769

4. ค่า  $H_E$  เท่ากับ 0.783

ทั้งค่า  $H_0$  และ  $H_E$  แสดงให้เห็นว่าประชากรนกระเรียนไทยของ 2 พื้นที่การศึกษายังคงรักษาอัลลีลแบบ heterozygous ไว้ได้มากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งนั่นทำให้เห็นว่ากลุ่มประชากรเหล่านี้ยังคงมีความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ค่อนข้างสูง

5. ค่า  $F_{ST}$  เท่ากับ 0.0274 ซึ่งเป็นค่าที่เข้าใกล้ 0 แสดงว่าประชากรนกระเรียนไทยของ 2 พื้นที่ การศึกษามีอัลลีลร่วมกัน (shared allele)

## วิจารณ์และสรุปผลการศึกษา

### 4.1. วิจารณ์ผลการศึกษา

#### 4.1.1. การสกัดดีเอ็นเอ

ดีเอ็นเอที่สกัดได้ในแต่ละตัวอย่างมีปริมาณไม่เท่ากัน โดยสังเกตได้จากความเข้มของแถบ microsatellite band บนแผ่นเจล ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการใช้กรรไกรตัดโคนขนไม่ละเอียดมากพอทำให้สารเคมีของชุดสารเคมีสำเร็จรูปสำหรับสกัดดีเอ็นเอในชั้น lysis ไม่สามารถแทรกซึมได้อย่างทั่วถึง

#### 4.1.2. การคัดเลือกเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์

เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ที่สามารถนำมาใช้ตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรนกกระเรียนไทยในสภาพกรงเลี้ยงได้นั้นต้องแสดงความเป็น polymorphism เท่านั้น ซึ่งจะทราบได้จากการตรวจสอบขนาดด้วย agarose MS gel electrophoresis แล้วได้ขนาดของอัลลีลในแต่ละตัวอย่างที่แตกต่างกันตั้งแต่ 2 ขนาดขึ้นไปจากนั้นจะนำค่าขนาดของอัลลีลเหล่านั้นไปประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมต่อไป แต่อย่างไรก็ตามการตรวจสอบขนาดด้วยวิธีข้างต้นสามารถบอกขนาดของอัลลีลได้คร่าวๆ เท่านั้น หากต้องการทราบค่าขนาดของอัลลีลที่ชัดเจนต้องมีการทำ genotyping เพิ่มเติม

#### 4.1.3. การทำ genotyping ด้วยวิธี GeneScan

ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยทำ genotyping ได้เพียงแคโลคัส gram6 เท่านั้น ผลของขนาดอัลลีลในแต่ละตัวอย่างมีขนาดที่แตกต่างกันไปและค่าที่ได้จะให้ตัวเลขที่ไม่ใช่จำนวนเต็ม นั่นเป็นเพราะการจะทราบขนาดอัลลีลของ PCR product ต้องเทียบกับ peak ของ size standard ซึ่งหากจุดตัดของ PCR product ไปตกที่ค่าของ size standard ค่าใดโปรแกรมจะบันทึกค่านั้นๆ ทันทึโดยไม่ได้ทำเป็นเลขจำนวนเต็ม ขนาดของอัลลีลที่ได้หากมีตัวเลขที่มีทศนิยมที่มากกว่า 0.5 จะไม่มีการปัดเศษขึ้นเพราะการจะเปลี่ยนค่าขนาดของอัลลีลเป็นค่าอื่นๆ ได้นั้นจะขึ้นอยู่กับจำนวนเท่าของลำดับการซ้ำของนิวคลีโอไทด์ของแต่ละไพรเมอร์ เช่นที่ไพรเมอร์ Gram6 มีลำดับการซ้ำคือ (AGGT)<sub>n</sub>(AGAT)<sub>n</sub> ดังนั้นตัวอย่างจะมีขนาดอัลลีลที่ต่างกันได้ที่ไพรเมอร์นี้ต้องมีความแตกต่างของจำนวนนิวคลีโอไทด์ที่เป็นจำนวนเท่าของ 4 นั่นคือหากตัวอย่างที่ 8 มีขนาดอัลลีลเท่ากับ 246.5 ค่านี้จะไม่สามารถปัดเป็น 247 ได้เพราะมีความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ซ้ำกันเพียง 1 ตำแหน่งเท่านั้นซึ่งไม่ตรงกับลำดับการซ้ำของไพรเมอร์ Gram6 ที่ต้องมีความแตกต่างกันถึง 4 ตำแหน่ง

#### 4.1.4. การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม

จากการคำนวณความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรม Genepop เวอร์ชัน 4.3. ได้ค่าจำนวนของอัลลีลตั้งแต่ 234–258 bp ซึ่งประชากรของนกกระเรียนพันธุ์ไทยทั้ง 2 พื้นที่การศึกษามีอัลลีลร่วมกันมากที่สุดที่ขนาด 234 bp ค่าการเข้าสู่สมดุลของ Hardy–Weinberg ได้ค่าเท่ากับ 0.6878 ( $p > 0.05$ ) นั้นหมายถึงที่โลคัส Gram6 บอกได้ว่าประชากรนกกระเรียนที่ศึกษามีแนวโน้มอยู่ในสมดุลของ Hardy–Weinberg ซึ่งจะทำให้คาดเดาได้ว่าค่า observed heterozygosity และ expected heterozygosity ของประชากรนี้ต้องมีค่าที่ใกล้เคียงกัน ซึ่งตรงกับผลการศึกษาที่ได้ค่า observed heterozygosity เท่ากับ 0.7692 และค่า expected heterozygosity เท่ากับ 0.7825 หากประชากรเข้าสู่สมดุลของ Hardy–Weinberg อย่าง



แท้จริงแล้วนั้นจะต้องได้ค่า observed heterozygosity และ expected heterozygosity ที่เท่ากัน จากค่า heterozygosity ที่ได้แสดงให้เห็นว่าประชากรนกกระเรียนไทยของทั้ง 2 พื้นที่การศึกษามีความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ค่อนข้างสูง ดังนั้นกลุ่มประชากรเหล่านี้สามารถนำไปเป็นพ่อพันธุ์แม่พันธุ์ในการเพิ่มปริมาณนกกระเรียนไทยเพื่อนำไปปล่อยสู่ธรรมชาติได้ แต่อย่างไรก็ตามการวางแผนการอนุรักษ์จะไม่สามารถดำเนินการต่อไปได้ในระยะยาวหากใช้ประชากรตั้งต้นกลุ่มเดิมผสมพันธุ์กันและเพิ่มจำนวนลูกหลานต่อไป เพราะแม้ว่ากลุ่มประชากรนี้จะมีหลากหลายทางพันธุกรรมที่ค่อนข้างสูงแต่หากใช้พ่อพันธุ์แม่พันธุ์เหล่านี้ผสมพันธุ์กันต่อไปเรื่อยๆ กลุ่มประชากรลูกหลานจะมีโอกาสเพิ่มการผสมพันธุ์กันภายในหมู่เครือญาติมากขึ้น จนสุดท้ายความหลากหลายทางพันธุกรรมก็จะลดลงจนถึงขั้นที่อาจจะทำให้นกกระเรียนไทยสูญพันธุ์ไปอีกครึ่งหนึ่งได้ แนวทางแก้ไขสำหรับปัญหานี้คือต้องมีการตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากรอย่างสม่ำเสมอและอาจนำประชากรนกกระเรียนไทยในพื้นที่อื่นๆ เข้ามาแลกเปลี่ยนพันธุกรรมกับกลุ่มประชากรเดิมเพื่อให้สามารถคงความหลากหลายทางพันธุกรรมในรุ่นต่อไปได้ และค่าสุดท้ายที่จะกล่าวถึงคือค่า  $F_{ST}$  มีค่าเท่ากับ 0.0274 ( $p < 0.05$ ) เมื่อได้ค่าที่เข้าใกล้ 0 แสดงให้เห็นว่ากลุ่มประชากรนกกระเรียนไทยจากสวนสัตว์เปิดเขาเขียวและสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระมีอัลลีลร่วมกัน นั่นอาจหมายถึงกลุ่มประชากรทั้ง 2 พื้นที่การศึกษามีต้นกำเนิดมาจากกลุ่มประชากรนกกระเรียนไทยที่อยู่ในประเทศกัมพูชากลุ่มเดียวกัน

#### 4.2. สรุปผลการศึกษา

ไพรเมอร์ที่นำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้ด้วยวิธี cross-species amplification มีจำนวน 14 คู่ ซึ่งสามารถเพิ่มปริมาณไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอของนกกระเรียนพันธุ์ไทยได้ทั้งหมด ไพรเมอร์ที่แสดงความเป็น polymorphism มีจำนวน 9 คู่ ได้แก่ Gram6, Gram8, Gram11, Gram17, Gram20, Gram22, Gram25, Gram30 และ Gram32a และไพรเมอร์ที่แสดงความเป็น monomorphism มีจำนวน 5 คู่ ได้แก่ Gram24, Gram31, Gram41, Gram42 และ Gram45 จากผลการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกกระเรียนพันธุ์ไทยในสภาพกรงเลี้ยงของสวนสัตว์เปิดเขาเขียวและสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระที่บริเวณโลคัส Gram6 พบว่าประชากรมีแนวโน้มเข้าสู่สมดุล Hardy-Weinberg ( $p > 0.05$ ) และมีค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ค่อนข้างสูง ( $H_O = 0.7692$ ,  $H_E = 0.7825$ ) นอกจากนี้ค่า  $F_{ST}$  ยังสามารถบอกได้ว่าประชากรนกกระเรียนพันธุ์ไทยของทั้ง 2 พื้นที่การศึกษามีอัลลีลร่วมกัน ( $F_{st} = 0.0274$ ,  $p < 0.05$ )

## เอกสารอ้างอิง

- กรมป่าไม้ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2527. ประวัติการอนุรักษ์นกกระเรียนในพระบรมราชูปถัมภ์. กรุงเทพมหานคร: กรมป่าไม้. นุชจรี พีชคุณ. 2556. นกกระเรียนพันธุ์ไทย. วารสารธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม. ปีที่ 2: 6–15.
- ทรงกลด ภูทอง. หัวหน้าสถานีวิจัยเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ. สัมภาษณ์, 29 พฤศจิกายน 2557.
- ธวัชชัยธานี. 2552. ความหลากหลายทางชีวภาพและการจัดการ: กรณีศึกษานกกระเรียนไทย. ก้าวทันโลกวิทยาศาสตร์. ปีที่ 9: 117–119.
- ภูวดล โกมณเตียร. 2555. นกกระเรียนพันธุ์ไทยคืนถิ่น: ข้อกำหนดและตัวชี้วัดสำหรับการประเมินพื้นที่ชุ่มน้ำที่เหมาะสม. วารสารวิทยาศาสตร์ มข. 40: 1013–1024.
- องค์การสวนสัตว์ ในพระบรมราชูปถัมภ์. 2013. ฤๅเจ้าจะกลับมา...สู่ฟ้าเมืองไทย. Inside Thai Zoos. 1 : 1–34.
- Archibald G.W., GopiSundar K.S. and Barzen J. 2003. A review of the three subspecies of sarus cranes *Grus antigone*. Journal of Ecological Society. 16: 5–15.
- Brzeski K.E., Rabon Jr D.R., Chamberlain M.J., Waits L.P. and Taylor S.S. 2014. Inbreeding and inbreeding depression in endangered red wolves (*Canis rufus*). Molecular Ecology. 23 : 4241–4255.
- Forcina G., Panayides P., Kassinis N., Guerrini M. and Barbanera F. 2014. Genetic characterization of game bird island populations: The conservation of the black francolin (*Francolinus francolinus*) of Cyprus. Journal for Nature Conservation. 22 : 15–22.
- 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.
- Hongfei Z., Haiyan D., Weiyao K., Jianhua M. and Jihong L. 2010. Characterization of 18 polymorphic microsatellite loci in the red-crowned crane (*Grus japonensis*), an endangered bird. Animal Science Journal. 81 : 519–522.
- Hopken M.W., Lum T.M., Meyers P.M. and Piaggio A.J. 2015. Molecular assessment of translocation and management of an endangered subspecies of white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). Conservation Genetics. 16 : 635–647.
- Huang Y. and Zhou L. 2011. Screening and application of microsatellite markers for genetic diversity analysis of Oriental White Stork (*Ciconia boyciana*). Chinese Birds. 2 : 33–38.
- Inoue K., Lang B.K. and Berg D.J. 2015. Past climate change drives current genetic structure of an endangered freshwater mussel species. Molecular Ecology. 24 : 1910–1926.

- 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. and Nicolich J.M. 2001. Artificial insemination in captive whooping crane: results from genetic analyses. Zoo Biology. 20 : 331–342.
- 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.
- Jones K.L., Henkel J.R., Howard J.J., Lance S.L., Hagen C. and Glenn T.C. 2010. Isolation and characterization of 14 polymorphic microsatellite DNA loci for the endangered whooping crane (*Gru samericana*) 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. 2010. 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.
- Krajewski C., Sipiorski J.T. and Anderson F.E. 2010. Complete mitochondrial genome sequences and the phylogeny of cranes (Gruifomes: Gruidae). The Auk. 127 : 440–452.
- Lee H.R., Kim K.S. and Bang I.C. 2014. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite DNA markers for an endangered freshwater fish in Korea, the bull–head torrent catfish *Liobagrus obesus*. Conservation Genetics Resources. 6 : 241–243.
- Mearns K., Dawson D.A., Horsburgh G.J., Perrin M.R., Burke T. and Taylor T.D. 2008. Characterisation of 14 blue crane *Grus paradise* (Gruidae, AVES) microsatellite loci for use in detecting illegal trade. Conservation Genetics. 9 : 1363–1367.
- 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.
- Meine C. and Archibald G. 1996. The crane: status survey and conservation action plan. 1<sup>st</sup> Edn. IUCN, Gland.
- Nei M. and Roychoudhury A.K. 1974. Sampling variances of heterozygosity and genetics distance. Genetics. 76: 379–390.
- Raymond M. and Rousset F. 1995. GENEPOP (version 1.2): Population genetic software for exact tests and ecumenicism. Journal of Heredity. 86: 248–249.
- Rousset F. 2014. Genepop 4.3. Available:

- <http://kimura.univmontp2.fr/%7Erousset/Genepop.htm>. (July 2014).
- Sanguansombat W. 2005. Thailand red data: Birds. Office of Natural Resources and Environmental Policy and Planning Bangkok, Thailand.
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M. and Kumar S. 2011. Mega5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony method. Molecular Biology and Evolution. 28 : 2731–2739.
- Tanee T., Chaveerach A., Anuniwat A., Tanomtong A., Pinthong K., Sudmoon R. and Mookamul 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.
- Wood T.C. and Krajewski C. 1996. Mitochondrial DNA sequence variation among the subspecies of sarus crane (*Grus antigone*). The Auk. 113: 655–663.